

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

VANESSA DUARTE ORTIZ

**INFLUÊNCIA DO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO E DO TRATAMENTO COM
HORMÔNIOS DA TIREOIDE SOBRE A VASCULATURA PERIFÉRICA**

Porto Alegre

MAIO/2015

VANESSA DUARTE ORTIZ

**INFLUÊNCIA DO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO E DO TRATAMENTO COM
HORMÔNIOS DA TIREOIDE SOBRE A VASCULATURA PERIFÉRICA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araujo

Porto Alegre

MAIO/2015

Agradecimentos

Dedico um agradecimento especial ao doutorando Alexandre Luz de Castro que me deu apoio fundamental desde o início deste projeto, tanto na parte teórica quanto experimental, sempre dispondo seu tempo e paciência para ajudar em todos os momentos.

Agradeço ao meu grande orientador Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araujo pelo apoio e orientação inigualável, pela enorme paciência, pela confiança e pela oportunidade que me foi dada desde o momento em que pude trabalhar no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular. Além de grande orientador, é uma pessoa maravilhosa e um grande exemplo de professor.

Agradeço a minha co-orientadora Prof. Dra. Adriane Klein-Belló pelo seu auxílio, sua confiança, seus ensinamentos, pela pessoa e grande pesquisadora que és. À técnica do laboratório Tânia Regina Gatelli Fernandes. Aos meus colegas de trabalho: Giana, Ricardo, Jéssica, Colombo, Rafaela, Bruna, Rayane, Ângela, Luiza, Carolina, Dalvana, Patrick, Carla e Adriana. A todos do laboratório, muito obrigado pela convivência e por serem esse grupo maravilhoso, o qual posso dizer que me orgulho de fazer parte.

Em especial, agradeço minha mãe Eliane pelo exemplo de vida que és e pelo apoio e amor incondicional ao longo dessa trajetória, sendo grande parte do meu esforço graças à força que me passou ao longo de todo esse tempo. A meu pai Ademar e minha irmã Andressa também agradeço a paciência e o carinho. Aos meus amigos e colegas de curso, pelo apoio e convivência ao longo desses anos.

Por mim, agradeço o auxílio financeiro das entidades CNPq, Capes e FAPERGS.

Sumário

Resumo	5
1. Introdução compreensiva	6
1.1. Infarto agudo do miocárdio	6
1.2. Homeostase redox.....	7
1.3. Homeostase redox na vasculatura periférica	9
1.4. Hormônios da tireoide.....	12
1.5. Hormônios da tireoide, infarto e vasculatura periférica	13
1.6. Angiogênese	15
1.7. Angiogênese e hormônios da tireoide	20
2. Artigo.....	23
Resumo.....	24
1. Introdução	25
2. Materiais e métodos.....	27
2.1. Animais.....	27
2.2. Grupos experimentais	27
2.3. Desenho Experimental	28
2.4. Procedimento cirúrgico.....	28
2.5. Administração dos hormônios tireoide.....	29
2.6. Dosagem dos níveis séricos de T4.....	29
2.7. Análises ecocardiográficas.....	29
2.8. Preparação do tecido	30
2.9. Determinação da concentração proteica	30
2.10. Determinação das espécies reativas de oxigênio totais.....	30
2.11. Determinação da atividade da NADPH oxidase	31
2.12. Análise da expressão proteica por Western Blot	31
2.13. Análise estatística.....	31
3. Resultados.....	32
3.1. Níveis dos hormônios da tireoide no plasma	32
3.2. Análises ecocardiográficas.....	32
3.3. Expressão de marcadores de angiogênese e do HIF-1 α	32
3.4. Expressão dos receptores dos hormônios da tireoide – TR α e TR β	33
3.5. Parâmetros de estresse oxidativo	33
3.6. Expressão da enzima óxido nítrico sintase	33
4. Discussão	34
Referências.....	40

Legendas	44
Tabela 1.....	45
Figura 1.....	46
Figura 2.....	47
Figura 3.....	48
Figura 4.....	49
Conclusões e perspectivas.....	50
Referências gerais.....	52
Anexo	60

Resumo

Estudos vêm demonstrando um papel cardioprotetor dos hormônios da tireoide (HT) sobre o remodelamento cardíaco após o infarto agudo do miocárdio (IM). Entretanto, não há dados na literatura sobre a influência do próprio IM e do tratamento com HT sobre a vasculatura periférica em modelo animal de IM. Por esse motivo, este estudo tem como objetivo avaliar a influência desses fatores, modelo e tratamento, sobre a vasculatura periférica através de parâmetros de estresse oxidativo, da angiogênese e da expressão dos receptores dos HT ($TR\alpha$ e $TR\beta$) e da enzima óxido nítrico sintase (eNOS). Ratos Wistar machos foram divididos em quatro grupos: grupo sham (SHAM), grupo infarto (IAM), grupo sham + HT (SHAMT) e grupo infarto + HT (IAMT). Após o IM, os animais receberam T3 e T4 (2 e 8 $\mu\text{g}/100\text{g}$ por dia, respectivamente) por gavagem durante 12 dias. Após esse período, os animais foram submetidos à ecocardiografia e eutanasiados, sendo a aorta coletada para posteriores análises moleculares e bioquímicas. A expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), do fator induzido por hipóxia 1α (HIF- 1α) e dos receptores $TR\alpha$ e $TR\beta$ aumentou no grupo IAMT em relação ao grupo IAM. Já a produção de espécies reativas de oxigênio totais, a atividade da NADPH oxidase e a expressão da eNOS diminuíram nos grupos IAM e SHAMT em relação ao grupo SHAM, enquanto não houve diferença entre o grupo IAMT em comparação ao grupo IAM. Os HT, portanto, apresentaram ação sobre angiogênese e sobre a expressão dos receptores $TR\alpha$ e $TR\beta$ na vasculatura periférica em um período pós-IM. Isso pode indicar uma possível melhora da sinalização angiogênica na vasculatura periférica, o que indiretamente pode vir a favorecer o miocárdio em termos de perfusão, e uma maior responsividade do tecido vascular periférico aos HT.

1. Introdução abrangente

1.1. Infarto agudo do miocárdio

De acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde (2004), as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo todo, constituindo cerca de 30% de todas as causas. Considerando apenas as doenças isquêmicas do coração, como o infarto agudo do miocárdio (IM), a contribuição é de aproximadamente 13% (OMS, 2004).

O IM é uma cardiopatia isquêmica decorrente de uma deficiência perfusional do tecido cardíaco, responsável por levar à diminuição ou impedimento da chegada de nutrientes aos cardiomiócitos, levando estes à morte celular por necrose. A causa mais comum dessa patologia é a trombose coronária decorrente da ruptura de uma placa aterosclerótica (Libby et al., 2007). Outras causas menos comuns também podem ser citadas: embolia coronariana, trombo intracardíaco, uso de cocaína e dissecação da artéria coronária (Boateng e Sanborn, 2013).

Em resposta a lesão isquêmica, ocorre a substituição do miocárdio lesado por tecido cicatricial, fazendo com que as células musculares cardíacas saudáveis remanescentes sejam expostas a uma maior carga de trabalho. Por conseguinte, devido a essa exposição, os cardiomiócitos podem apresentar uma resposta adaptativa de hipertrofia (Libby et al., 2007). A resposta hipertrofica dos cardiomiócitos, após o IM, visa à manutenção do débito cardíaco e, inicialmente, pode ser considerada como um processo benéfico, visto que permite ao coração se adaptar ao aumento do estresse de parede ocasionado pela sobrecarga mecânica (Francis et al., 2001). Entretanto, após um longo período de exposição a essa hipertrofia cardíaca pós-infarto, o coração passa a apresentar uma predisposição à disfunção ventricular (Baines et al., 2005), uma vez que o ventrículo esquerdo sofre modificações na sua geometria, tornando-se mais esférica, e no remodelamento cardíaco. Este processo resulta em problemáticas alterações no músculo cardíaco, como o aumento do estresse de parede e da necessidade energética (Dorn, 2007). As principais complicações do IM incluem: a disfunção contrátil do ventrículo esquerdo, a disfunção dos músculos papilares, o tromboembolismo, as arritmias e a insuficiência cardíaca congestiva (Libby et al. 2007).

Embora o mecanismo responsável pela progressão da hipertrofia para a insuficiência cardíaca não esteja plenamente esclarecido, vários fatores contribuem para esta progressão, os quais podem ser citados: o tempo de oclusão coronariana, o tamanho da área do infarto e o estímulo neurohumoral (Singal et al., 1999). Esses fatores podem levar à geração de estresse oxidativo no tecido cardíaco. Nesse contexto, estudos demonstram que, em um estágio compensado da hipertrofia cardíaca, a reserva antioxidante tecidual é aumentada, enquanto que, em um estágio descompensado/insuficiente do músculo cardíaco, essa reserva encontrasse reduzida e, devido a isso, acaba por contribuir para o desequilíbrio redox, estabelecendo o estresse oxidativo (Singal et al., 1999). Todavia, não há estudos na literatura que retratem sobre as consequências que o IM acarreta sobre vasculatura periférica.

1.2. Homeostase redox

Os radicais livres são espécies químicas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados, sendo capazes de existir de forma independente. Devido a isso, essas espécies sofrem uma atração para um campo magnético, o que pode torná-las altamente reativas, capazes de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa, tendo uma função oxidante ou redutora (Halliwell e Gutteridge, 2006). Os radicais livres podem ser formados pela adição de um elétron a um elemento não-radical ou através da quebra de uma ligação covalente (Symons, 1996). Essas espécies são continuamente produzidas no organismo durante o metabolismo celular e podem desempenhar funções fisiológicas importantes quando em concentrações baixas ou moderadas (Halliwell e Gutteridge, 2006).

As principais fontes de radicais livres são as organelas citoplasmáticas que metabolizam o oxigênio, o nitrogênio e o cloro. As espécies químicas geradas a partir do oxigênio são coletivamente denominadas espécies reativas de oxigênio (ERO). A molécula de oxigênio é considerada um radical livre, pois possui dois elétrons desemparelhados, os quais estão em spins paralelos. Devido a sua configuração eletrônica, a molécula de oxigênio é muito eletronegativa, ou seja, possui uma tendência maior de atrair elétrons para si. Na respiração celular, os elétrons são recebidos um de cada vez pelo oxigênio, e o processo de formação da água inclui a

produção de espécies intermediárias. O metabolismo mitocondrial é uma das principais fontes de ERO nas células, exatamente pelo fato da cadeia transportadora de elétrons ser a principal etapa responsável por contribuir na formação dessas espécies. Especificamente, a origem das ERO ocorre a partir da captura de elétrons que escapam da cadeia transportadora de elétrons, por moléculas de oxigênio circulantes (Halliwell e Gutteridge, 2006).

O oxigênio pode sofrer uma redução univalente, recebendo apenas um elétron. Nesse processo, pode ocorrer a formação de outra forma de ERO, o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). A adição de outro elétron a esse ânion leva, por sua vez, à formação do íon peróxido (O_2^{2-}), gerando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esta reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). O peróxido de hidrogênio, na presença de metais, tais como os íons Fe^{+2} , pode sofrer uma reação não enzimática chamada reação de Fenton, gerando uma das mais potentes espécies reativas de oxigênio, o radical hidroxila (OH^{\bullet}) (Fridovich, 1995). Além das espécies oriundas do oxigênio, existem também as espécies reativas de nitrogênio (ERN), oriundas do metabolismo do óxido nítrico (Beckman e Koppenol, 1996).

Considerando que aproximadamente 5% do oxigênio consumido para a formação de energia é transformado em ERO, e que estas espécies podem reagir com outras biomoléculas levando a danos celulares por processos oxidativos, foi preciso que os organismos aeróbicos passassem a desenvolver um sistema de defesa antioxidante para controlar essas reações e reparar ou substituir as moléculas danificadas. As defesas antioxidantes existentes são constituídas por mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos (Dean e Jones, 2006; Sies, 1991). Dentre os antioxidantes enzimáticos, podemos destacar a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx) (Tsutsui et al., 2001). Entre as defesas antioxidantes não-enzimáticas, o tripeptídeo glutathione é um dos principais mecanismos de remoção do peróxido de hidrogênio e de outros radicais livres; e, além da glutathione, outras defesas não enzimáticas incluem a vitamina C e a vitamina E (Smirnoff, 2001; Halliwell e Gutteridge, 2006).

Dentro deste contexto, o estresse oxidativo é caracterizado pelo aumento significativo da concentração intracelular de espécies oxidantes, como as ERO e ERN, acompanhadas simultaneamente pela diminuição das defesas antioxidantes (Halliwell e Gutteridge, 2007). O mesmo pode ser definido como um desequilíbrio entre fatores pró-oxidantes e antioxidantes, com um aumento dos primeiros, levando a um potencial

dano à célula (Sies, 1991). Diferentes estudos mostram que as alterações no estado redox contribuem para muitas conseqüências do envelhecimento e para muitos processos patológicos, incluindo doenças cardiovasculares (Araujo et al. 2006; Stocker e Keaney, 2004), doenças pulmonares (Cantin, 2004), diabetes (Bonnetfont-Rousselot, 2004), doenças neurodegenerativas (Vina et al., 2004) e câncer (Van Remmen et al., 2003).

1.3. Homeostase redox na vasculatura periférica

A produção de ERO vasculares é essencial para a manutenção da homeostase vascular, embora também seja capaz de exercer um papel crítico nas doenças vasculares. Na vasculatura, existem várias enzimas que contribuem para a formação de ERO, incluindo a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase e a xantina oxidase (XO). Entretanto, é a NADPH oxidase (Nox), a principal fonte formadora de ERO nos vasos (Konior et al., 2014), sendo responsável pela produção de ânion superóxido, usando o oxigênio e NADPH como catalisadores da reação (Bir et al., 2012a).

Os homólogos da Nox são expressos de formas diferentes na vasculatura, incluindo células endoteliais, células musculares lisas vasculares (VSMC), fibroblastos e células imunes. No geral, a Nox vascular tem relativamente um baixo nível de atividade constitutiva. Todavia, sua atividade enzimática pode aumentar conforme a resposta a estímulos como citocinas, fatores de crescimento, hiperlipidemia e altos níveis de glicose, levando ao rompimento da homeostase vascular e contribuindo para o estado patológico (Konior et al., 2014). Na vasculatura, as ERO derivadas da Nox contribuem para a manutenção da homeostase vascular através da manutenção do tônus vascular e regulam importantes processos como o crescimento celular, proliferação, diferenciação, apoptose, organização do citoesqueleto e migração celular. Entretanto, em situações patológicas, a formação excessiva do ERO derivado da Nox, induz a desregulação no sistema de controle redox, promovendo o dano oxidativo. O aumento da atividade das isoformas vasculares da Nox, juntamente a alterações no sistema antioxidante, desencadeiam uma disfunção endotelial induzida por estresse oxidativo. Isso dá início a uma cadeia de eventos que contribuem para

estados patológicos cardiovasculares como aterosclerose, hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva, dano pelo processo de isquemia/reperfusão e complicações vasculares associadas a diabetes (Manea, 2010).

A xantina oxidase é outra importante fonte de produção de ERO nas células dos vasos sanguíneos. Essa enzima utiliza o oxigênio como um aceptor de elétron para catalisar a oxidação de hipoxantina em xantina e, com isso, levando a formação de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 . A ativação da XO é induzida por citocinas inflamatórias e hipóxia, o que ocorre, em parte, devido ao H_2O_2 mediado pela Nox. A Nox aumenta a ativação da XO nas células endoteliais, o que pode modular a produção de ERO em resposta à oscilação do estresse de cisalhamento das células endoteliais. Ainda, a XO tem um importante papel na sinalização da sobrevivência das células endoteliais. Essa sinalização depende da quantidade de ERO produzidas, de tal modo que baixas quantidades de ERO ($O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2) podem agir como segundos mensageiros promovendo crescimento vascular. Entretanto, a alta produção de ERO pela XO pode prejudicar a função endotelial e o crescimento vascular (Bir et al., 2012a).

Um espécie reativa também considerada importante dentro da homeostase redox do sistema vascular, é o óxido nítrico (NO). Este é um radical livre que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado. A síntese desse radical é resultante da oxidação do terminal guanidino nitrogenado da L-arginina, a partir da qual gera-se o radical livre gasoso, NO, e L-citrulina. A enzima óxido nítrico sintase (NOS) é responsável por catalisar esta reação. Essa enzima possui isoformas que são divididas em duas categorias: a NOS constitutiva (cNOS), que é dependente de íons cálcio e de calmodulina e está envolvida na sinalização celular, e a NOS induzível (iNOS), que é produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas. Ainda, a isoforma cNOS compreende outras duas isoformas: a NOS neuronal (nNOS, tipo I), presente normalmente nos neurônios, e a NOS endotelial (eNOS, tipo III), presente geralmente nas células endoteliais vasculares e nas plaquetas (Dusse, Vieira e Carvalho, 2003).

O NO produzido pelas células endoteliais é fundamental no mecanismo de relaxamento vascular. Em condições fisiológicas, esse relaxamento ocorre quando receptores de membrana das células endoteliais são ativados por estímulos solúveis (p.ex.: acetilcolina, bradicinina, entre outros) ou quando existe um aumento do atrito exercido pelas células circulantes sobre a camada endotelial do vaso. Essas situações

levam à ativação da eNOS presentes nessas células, o que acarreta consequentemente na produção do NO. A eNOS fica ancorada à membrana plasmática da célula endotelial do vaso, favorecendo dessa maneira a presença de grandes quantidades de NO próximo à camada vascular e às células sanguíneas circulantes. Quando ativada, ocorre sua fosforilação e translocação para o citosol. O NO produzido na célula endotelial difunde-se rapidamente para a célula muscular e para o lúmen do vaso. Na célula muscular, o NO interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase, o que leva a sua ativação. Uma vez ativa, esta enzima catalisa a retirada de dois fosfatos da molécula de guanosina trifosfato, gerando a guanosina monofosfato cíclica (GMPc). Com o aumento de GMPc na célula muscular, ocorre a redução da entrada de cálcio, a inibição da liberação de cálcio do retículo endoplasmático e o aumento do sequestro de cálcio para o retículo endoplasmático. Consequentemente, esses mecanismos levam ao relaxamento da célula muscular do vaso sanguíneo, desencadeando a vasodilatação, processo este que contribui para a redução da pressão sanguínea (Dusse, Vieira e Carvalho, 2003).

Já é bem estabelecido na literatura o papel fundamental do NO, produzido através da eNOS, na vasoproteção. Essa finalidade está associada a vários fatores como: a manutenção do tônus vascular (a constante liberação de NO, sempre quando há atrito na camada endotelial vascular, permite manter o tônus vascular), regulação da pressão sanguínea, prevenção da agregação plaquetária, inibição da adesão de monócitos e neutrófilos no endotélio vascular (doadores de NO são potentes inibidores de moléculas de adesão da superfície endotelial, que são expressas quando há aumento do estresse oxidativo na célula endotelial), ação antiproliferativa (o NO produzido no endotélio vascular ou derivado de doadores exógenos é capaz de inibir a proliferação da camada muscular do vaso, evitando o estreitamento da luz vascular) e efeito antioxidante (Dusse, Vieira e Carvalho, 2003). Em relação a este último fator, o NO produzido pela eNOS, é capaz de induzir a produção da enzima superóxido dismutase (SOD) na camada muscular do vaso e extracelular, diminuindo o ânion superóxido (O_2^-) disponível e, consequentemente, a produção de peroxinitrito ($ONOO^-$), permitindo desta forma a maior biodisponibilidade do NO (Dusse, Vieira e Carvalho, 2003).

1.4. Hormônios da tireoide

A tireoide é uma glândula endócrina responsável pela síntese de três hormônios: T4 (tiroxina ou tetraiodotironina), T3 (triiodotironina) e a calcitonina. A tiroxina é o principal hormônio liberado por essa glândula, apesar de possuir uma potência biológica inferior ao T3 (Ganong, 2003). Por esse motivo, parte do T4 liberado é transformada periféricamente em T3 através das enzimas deiodinases presentes nas células-alvo desses hormônios. É necessário que essa glândula receba um aporte de nutrientes, como iodo e selênio para que ocorra a síntese dos hormônios da tireoide (Kohrle, 2000).

Uma vez que os hormônios da tireoide apresentam uma natureza lipofílica e, com isso, demonstram-se capazes de atravessar a membrana plasmática. Seu mecanismo de ação começa a partir da interação dos mesmos com receptores nucleares das células-alvo. A ligação do T3, forma ativa do hormônio da tireoide, a esses receptores leva ao recrutamento de proteínas co-ativadoras da transcrição gênica, levando ao aumento na expressão de inúmeros genes (Yen et al., 2006). Os genes responsivos a esses hormônios possuem sequências de nucleotídeos em sua região promotora, denominadas elementos de resposta aos hormônios da tireoide (TRE). Os receptores nucleares dos hormônios da tireoide (TRs) são codificados por dois genes, TR α e TR β (Basset et al., 2003). Esses genes levam a síntese de diferentes isoformas do receptor nuclear (α 1, β 1, β 2 e β 3) que variam conforme o tecido em que estão sendo expressas (Basset et al. 2003). Além de sua ação através de receptores nucleares, foi descrito, para os hormônios da tireoide, um mecanismo de ação não clássico, baseado na ligação dos mesmos a receptores localizados na membrana plasmática (receptor integrina do tipo α v β 3) (Cody et al. 2007; Davis et al. 2008). As ações dos hormônios da tireoide independentes da sua ligação aos seus receptores nucleares, são chamadas de ações não-genômicas. Os efeitos não-genômicos dos hormônios da tireoide são iniciados fora do núcleo celular, podendo incluir mudanças na atividade de bombas de íons na membrana plasmática, na sinalização citosólica e na estimulação do tráfico de proteínas do citosol para o núcleo, ou seja, também podem culminar em eventos celulares complexos que são mediados no núcleo. A iniciação das ações não-genômicas incluem o receptor de membrana plasmática para T3 e T4 na integrina α v β 3, que está ligado a uma proteína cinase ativada por mitógeno

(MAPK), a cinase extracelular regulada por sinal (ERK 1/2), para a transdução do sinal hormonal. No entanto, além da ativação da via MAPK/ERK1/2, a ativação da via da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) parece ter um papel tanto na ação não-genômica quanto na ação genômica dos hormônios da tireoide, embora o significado e o mecanismo molecular de muitas dessas ações não-genômicas ainda não sejam completamente compreendidos. Lin et al. compararam a habilidade do T3 e T4 de ativarem a ERK1/2, a cinase Src e a PI3K, através da sua ligação ao receptor integrina $\alpha\beta3$. Através deste estudo foi possível propor a existência de dois domínios para os hormônios da tireoide no receptor integrina $\alpha\beta3$, um no qual apenas o T3 se liga exclusivamente, ativando a PI3K via ativação da cinase Src, estimulando o tráfico do TR α do citoplasma para o núcleo e a expressão do fator induzido por hipóxia 1 α (HIF-1 α), enquanto no outro domínio se ligam tanto o T3, que leva à estimulação da proliferação celular, quanto o T4, que acarreta no tráfico do TR β do citosol para o núcleo, ambas ações desencadeadas via ativação da ERK1/2 (Lin et al., 2009).

Dentre as principais ações hormonais da tiroxina estão os processos de regulação da taxa metabólica basal e do metabolismo geral, a termogênese, a manutenção da homeostase energética e da atividade mitocondrial, assim como o crescimento celular (Brix et al. 2011). Além desses efeitos, T3 e T4 possuem importantes ações no sistema nervoso central (Bauer et al. 2008) e no sistema cardiovascular (Klein, Ojamaa 2001; Hu et al., 2003; Araujo et al., 2008).

1.5. Hormônios da tireoide, infarto e vasculatura periférica

Em relação ao sistema cardiovascular, existem estudos que verificaram uma redução dos níveis dos hormônios da tireoide em situações patológicas como no infarto agudo do miocárdio (Franklyn et al. 1984) e na insuficiência cardíaca (Hamilton et al. 1998). No caso do IM, há evidências que o remodelamento cardíaco pós-infarto pode resultar em um coração com fenótipo hipotireoideo, e dados que comprovam isso revelam uma redução nos níveis de expressão do TR α e do TR β no coração de ratos infartados, ou seja, ocorre um mecanismo de *downregulation* desses receptores (Pantos et al., 2005a).

Vários genes responsivos ao hormônio da tireoide, que codificam proteínas importantes no processo de contração muscular, deixam de ser codificadas devido à falta da sinalização do hormônio da tireoide obviamente em decorrência da redução dos níveis de seus receptores nucleares (Pantos et al., 2005a). No entanto, embora estudos comprovem que o hipotireoidismo tecidual induza cardioproteção contra a injúria isquêmica, justamente pelo fato de ser uma resposta adaptativa do organismo em busca da preservação de energia e do aumento da tolerância a recorrentes insultos isquêmicos, isso ocorre às custas de uma função miocárdica prejudicada (Pantos et al., 2003; Pantos et al., 2005b). Entretanto, posteriores estudos demonstraram a existência de uma ação positiva dos hormônios da tireoide, usados como tratamento sobre o remodelamento cardíaco pós-infarto agudo do miocárdio (Pantos et al. 2008; Pantos et al. 2010). Animais submetidos ao IM tratados com tais hormônios, parecem apresentar uma melhora dos parâmetros morfológicos e funcionais do coração, bem como uma alteração na expressão proteica tecidual dos mesmos e, com isso, esses efeitos acabam por contribuir para a preservação da função cardíaca (Pantos et al. 2007; Pantos et al. 2008; Makino et al. 2009).

Há dados na literatura que indicam, também, a capacidade dos hormônios da tireoide exercerem efeitos tanto sobre o coração quanto sobre o sistema vascular periférico (Kahaly e Dillmann, 2005). Tais efeitos incluem a redução da resistência vascular, bem como uma ação sobre as células musculares lisas dos vasos, promovendo um relaxamento vascular (Grais e Sowers, 2014). A tiroxina é capaz de provocar essa diminuição da resistência vascular periférica, através do seu efeito direto sobre as células musculares lisas vasculares de arteríolas da circulação periférica, permitindo dessa forma a realização do processo de relaxamento vascular (vasodilatação). Em situações patológicas, como no hipertireoidismo, é possível observar uma notória diminuição dessa resistência, o que leva à diminuição do volume de sangue arterial eficaz (VSAE), causando um aumento da liberação de renina e da ativação do eixo angiotensina-aldosterona. Isso, conseqüentemente, estimula a reabsorção renal de sódio, levando ao aumento do aumento volume sanguíneo e o retorno venoso, o que, por fim, contribui para uma sobrecarga de pressão e volume. Entretanto, no caso do hipotireoidismo ocorre efeitos opostos tanto no sistema cardiovascular quanto na vasculatura. Sobre esta ocorre um aumento em torno de 50% da resistência vascular (Klein e Ojamaa, 2001).

No entanto, não há dados na literatura sobre ação dos hormônios da tireoide, usados em concentrações terapêuticas, sobre a vasculatura periférica quando a patologia em questão se trata do infarto agudo do miocárdio.

1.6. Angiogênese

A angiogênese é o processo de formação de vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, que ocorre em condições fisiológicas e patológicas. Em um organismo normal, é regulada localmente para encontrar necessidades impostas por mudanças no tamanho de tecidos e órgãos, com ou sem hipóxia, e em processo de cicatrização (Luidens et al., 2010).

A formação de novos vasos pode ser dada a partir de três processos distintos: angiogênese, arteriogênese e vasculogênese. A angiogênese é um processo que envolve a formação de capilares a partir da vasculatura pré-existente, envolvendo a migração e proliferação de células endoteliais presentes dentro dos vasos existentes em resposta a estímulos como a hipóxia tecidual, estresse mecânico e inflamação (Taimeh et al., 2013). Em situações fisiológicas, a angiogênese procede através da desestabilização do vaso, da migração e proliferação de células endoteliais e do processo de ramificação. Esses eventos são seguidos pela fase de resolução, na qual há a redução da proliferação das células endoteliais e a estabilização do novo vaso formado pela presença dos pericitos e células musculares lisas (Fagiani e Christofori, 2013). Já a arteriogênese é um processo de alargamento de vasos colaterais, causado pelo remodelamento ou crescimento das conexões colaterais artereriolares pré-existentes. Os principais estímulos para este processo é a mudança no estresse dentro do vaso ocluído e a interconexão arteriolar causada pela mudança na pressão e no fluxo sanguíneo associados com a obstrução mecânica. Por último, a vasculogênese é definida como sendo a formação de novas redes vasculares primitivas a partir da diferenciação de células precursoras mesodermiais, tais como as células progenitoras endoteliais, na ausência de vasculatura pré-existente (Taimeh et al., 2013).

Em situações patológicas, como no caso do IM, existe uma série de linhas de pesquisas em torno do desenvolvimento de terapias pró-angiogênicas (Cochain et al., 2013). Isso ocorre exatamente pelo fato de o mecanismo da angiogênese, em condições patológicas (inflamação, aterosclerose, vasculopatias, etc), ser caracterizado tanto pela falha na fase de resolução, ou seja, na fase de estabilização do vaso formado, como pela geração de uma rede vascular desorganizada. Isso procede dessa forma embora essa angiogênese em condições patológicas esteja compartilhando praticamente os mesmos processos celulares e moleculares da angiogênese em condições fisiológicas (Fagiani e Christofori, 2013).

A presença de um processo de angiogênese adequado é essencial tanto na resposta do miocárdio à isquemia nas fases iniciais pós-IM, como no remodelamento cardíaco em virtude de prevenir a transição para o quadro de insuficiência cardíaca. Isso ocorre devido ao fato de que uma baixa reperfusão do miocárdio viável e hipertrófico, junto à disfunção microvascular e ao aumento da demanda metabólica devido à sobrecarga mecânica, pode levar a uma diminuição da função contrátil e consequente colaboração para essa transição. Por isso, uma eficiente perfusão dos cardiomiócitos hipertróficos permite um maior aporte sanguíneo e a chegada de nutrientes e oxigênio para servir de substrato a essas células. Isso permite que ocorra a prevenção da morte desses cardiomiócitos, da dilatação ventricular esquerda e da transição para o quadro de insuficiência cardíaca (Cochain et al., 2013).

A modulação endógena da angiogênese é complexa e, em parte, é alcançada por fatores induzidos por hipóxia, como o fator induzido por hipóxia 1α (HIF-1 α), e fatores de crescimento vascular específicos, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), com contribuições de agentes tróficos específicos menores, como fator de crescimento epidermal (EGF) (Luidens et al., 2010).

O VEGF, uma glicoproteína de 45 kDa também considerada uma citocina, exerce várias funções, dentre as quais se destaca a formação de novos vasos. Existem cinco subtipos de VEGF identificados nos mamíferos: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e PlGF (fator de crescimento placentário). VEGF-A e VEGF-B ligam-se aos receptores VEGFR-2 e VEGFR-1, respectivamente, e são os subtipos com maior influência sobre a neovascularização dentre os cinco (Taimeh et al., 2013).

O VEGF-A é secretado a partir de vários tipos de células, incluindo células endoteliais, células tronco multipotentes e cardiomiócitos maduros. Exibe várias funções durante a resposta de reparação à injúria miocárdica. Além de provocar a iniciação da formação de novos vasos, incluindo a angiogênese, a arteriogênese e a vasculogênese, também participa de outros mecanismos como: redução da apoptose, vasodilatação, migração e proliferação celular, aumento da permeabilidade vascular da microvasculatura no miocárdio com hipóxia tecidual, promoção de efeito neurohumorais e do recrutamento de células tronco. A sinalização do VEGF-A tem papel fundamental na promoção da proliferação e diferenciação de todas as linhagens celulares envolvidas na formação de vasos sanguíneos desde os primeiros estágios de desenvolvimento, bem como na restauração do suprimento sanguíneo ao tecido isquêmico em vários estados patológicos, incluindo aqueles que levam ao quadro de insuficiência cardíaca (Taimeh et al., 2013).

Vários mecanismos têm-se mostrados responsáveis pela regulação da expressão do VEGF, porém a tensão de oxigênio vem demonstrando-se um dos principais reguladores dessa expressão (Maulik, 2004). O estado de hipóxia é capaz de induzir um aumento da expressão do VEGF-A em ambos níveis de transcrição e tradução (Taimeh et al., 2013). Após o IM, o VEGF é rapidamente induzido no coração isquêmico em humanos e roedores, mas não apenas devido à hipóxia, mas também pelo estiramento mecânico. Vários estudos já foram capazes de demonstrar que a administração do VEGF, em modelos suínos e roedores para o IM, é capaz de desencadear uma atividade pró-angiogênica juntamente a efeitos benéficos na função cardíaca, tais efeitos não observados nos animais infartados (Cochain et al., 2013).

O HIF-1 α é um fator de transcrição que medeia a adaptação celular à hipóxia e controla a angiogênese pós-natal. Sua ativação é desencadeada pela presença de um quadro de hipóxia, o que leva conseqüentemente à transcrição de genes associados à atividade pró-angiogênica, como o gene do VEGF. O HIF-1 α é uma proteína expressa nos cardiomiócitos, nas células endoteliais e nas células do processo inflamatório após o IM (Cochain et al, 2013). O papel do via do HIF-1 α na angiogênese pós-isquemia ocorre através da inativação indireta das proteínas com domínio prolil hidroxilase (PHDs) e do fator inibidor do HIF (FIH), que em um estado de normóxia atuam na hidroxilação de alguns resíduos do HIF-1 α , levando essa proteína a ser reconhecida pela proteína de von Hippel-Lindau que conseqüentemente

induz a ubiquitinação e subsequente degradação proteossomal do HIF-1 α . Porém, em um estado de hipóxia, essa hidroxilação não é possível devido à falta do oxigênio, permitindo que o HIF-1 α seja, então, internalizado para dentro do núcleo e, assim, possa se complexar ao seu coativador p300 e ao HIF-1 β . Após a formação deste complexo, este liga-se na região de elementos responsivos à hipóxia (HRE) no DNA para promover a transcrição dos genes alvo (Cochain et al., 2013). Kido e colaboradores foram capazes de mostrar que a superexpressão constitutiva do HIF-1 α , em cardiomiócitos de camundongos submetidos ao IM, atenuou a progressão da disfunção cardíaca, e isso foi acompanhado do aumento da expressão do VEGF e da angiogênese no miocárdio (Kido et al., 2005).

Outro fator importante na sinalização angiogênica são as angiopoetinas. Estas são consideradas glicoproteínas que agem através da sua ligação ao receptor tirosina cinase 2 (Tie-2), agindo primeiramente na vasculatura para controlar o desenvolvimento do vaso sanguíneo e sua estabilidade. Existem quatro subtipos de angiopoetinas (Ang) descritos: Ang-1, Ang-2, Ang-3 e Ang-4. A Ang-1 é predominantemente expressa nas células perivasculares (pericitos, células musculares lisas vasculares e fibroblastos). A hipóxia, VEGF-A e PDGF-B (fator de crescimento derivado de plaquetas) já foram retratados por sua capacidade de elevar a expressão da Ang-1 em pericitos e células musculares lisas, embora sua expressão seja suprimida por outros fatores de crescimento em outros tipos celulares. Através da sua ligação ao receptor Tie-2, ocorre a auto-fosforilação do mesmo, tornando-o ativo. O receptor Tie-2 ativado estimula várias vias de sinalização intracelulares, principalmente a via da PI3K, que promove a sobrevivência das células endoteliais e a síntese do NO através das vias da proteína quinsase B (PKB)/Akt, da eNOS, da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) e da Dok-R/Nck/Pak (Fagiani e Christofori, 2013).

A Ang-1, agonista do receptor Tie-2, possui grande importância para a sobrevivência e proliferação das células endoteliais, para manutenção da barreira endotelial e, principalmente, para a maturação do vaso sanguíneo recém formado. Ang-1 e VEGF regulam a angiogênese em níveis distintos. O VEGF age na indução da formação e crescimento do vaso sanguíneo, enquanto a Ang-1 medeia o remodelamento e a maturação desse vaso. A manutenção vascular pelo sistema Ang-1/Tie-2 é obviamente importante para a estabilidade normal dos vasos sanguíneos.

Entretanto, é também necessário que o endotélio responda aos sinais de desestabilização vascular sob condições patológicas como, por exemplo, na resposta inflamatória local ou quando uma formação de novos vasos ou remodelamento vascular são requeridos. Sob tais condições, o efeito pró-estabilização da via de sinalização constitutiva da Ang-1 irá potencialmente antagonizar essas respostas. É necessário, então, a existência de um mecanismo que regule a sinalização da Ang-1 e permita as células endoteliais responderem a outros sinais dos seus microambientes. O controle da sinalização da Ang-1 é praticamente exercido pelo antagonista do receptor Tie-2, a Ang-2. Nos vasos que estão sob efeitos do processo de angiogênese, a Ang-2 é liberada dos corpos Weibel-Palade presentes nas células endoteliais, e isso leva à diminuição da relação Ang-1/Ang-2, desencadeando a supressão da sinalização da Ang-1 e, dessa forma, permitindo o endotélio responder à desestabilização vascular e aos sinais angiogênicos (Fagiani e Christofori, 2013).

A Ang-2 é expressa pelas células endoteliais, e sua produção é regulada à nível transcricional por vários fatores de crescimento e condições fisiológicas, incluindo VEGF-A e hipóxia tecidual. Enquanto, é praticamente ausente na vasculatura quiescente, sua expressão é elevada quando ocorre ativação angiogênica no endotélio. Embora seja considerada antagonista do receptor Tie-2, estudos demonstram que a Ang-2 também apresenta uma atividade como agonista do receptor Tie-2, ainda que seja bem menor em comparação a Ang-1, sendo por isso considerada apenas um agonista parcial desse receptor. Portanto, ressalta-se que a Ang-2 age principalmente como antagonista do receptor Tie-2 (Fagiani e Christofori, 2013).

O mecanismo angiogênico além de ser mediado pelos fatores de crescimento, pelos fatores induzidos por hipóxia e pelas angiopoetinas, existe um outro componente que é capaz de mediar a resposta angiogênica, o óxido nítrico (NO). O NO derivado do endotélio apresenta um papel fundamental na manutenção do tônus vascular através da indução do relaxamento da musculatura lisa do vaso, bem como em outros processos patofisiológicos das células endoteliais, como, por exemplo, na resposta angiogênica. Durante condições isquêmicas, o NO modula a atividade angiogênica através da interação direta do NO via S-nitrosilação de várias proteínas, incluindo o HIF-1 α . Ainda, a produção do NO contribui para propriedades angiogênicas do VEGF nas células endoteliais humanas. Entretanto, o mecanismo preciso da angiogênese mediada pelo NO ainda não é completamente compreendido,

embora estudos suportam a hipótese que o NO estimula tanto a proliferação quanto a migração endotelial. Para isso, é proposto que o NO, uma vez capaz de provocar a ativação da enzima guanilato ciclase, leva ao aumento da formação de GMPc, da atividade da proteína cinase G (PKG) e da cascata MAPK (via Ras-Raf-MEK-ERK1/2), desencadeando a proliferação e migração das células endoteliais, evento que contribui para o processo angiogênico (Bir et al., 2012b).

1.7. Angiogênese e hormônios da tireoide

Na literatura, já é possível encontrar estudos que envolvem a capacidade de alguns hormônios de influenciar a angiogênese de forma negativa ou positiva, dentre os quais podem ser citados os hormônios da tireoide. As bases moleculares da atividade pró-angiogênica dos hormônios da tireoide ainda não são completamente compreendidas, mas vários estudos recentes tem providenciado novos mecanismos envolvidos. O bFGF ou ambos, bFGF e VEGF, são apontados como os principais mediadores da angiogênese induzida pelos hormônios da tireoide no coração (Luidens et al., 2010).

Os hormônios da tireoide apresentam sua função pró-angiogênica através do receptor de superfície na integrina $\alpha\beta3$, uma proteína estrutural da membrana plasmática que está presente em várias células, como nas células endoteliais e nas células musculares lisas vasculares. Foi através dos resultados de estudos em modelo CAM (*chick chorioallantoic membrane* – um modelo de angiogênese) com hormônios da tireoide, que levaram à descrição da integrina $\alpha\beta3$ como um receptor de superfície celular para o hormônio da tireoide. Neste modelo, o sinal pró-angiogênico desses hormônios é transduzido pela via MAPK/ERK1/2, que já é conhecida por estar envolvida tanto na expressão do VEGF quanto no controle da proliferação de células vasculares endoteliais (Mousa et al., 2006). Para suportar esses achados, o uso de tetrac (ácido tetraiodotiroacético), um inibidor da ligação de análogos ativos ao receptor integrina, é capaz de inibir a atividade angiogênica dos análogos dos hormônios da tireoide mediada pela via MAPK (Bergh et al., 2005).

As concentrações de T4 que são pró-angiogênicas nos modelos usados são fisiológicas (10^{-10} M) (Bergh et al., 2005). Já o T3 induz a neovascularização em concentrações suprafisiológicas, mas ainda um tanto que baixas (10^{-9} M) (Luidens et al., 2010). Os receptores nucleares dos hormônios da tireoide (TRs) podem também contribuir para angiogênese em modelo de camundongos com hipertrofia cardíaca induzida pela constrição da aorta. Animais knockout para o TR β ou para ambos (TR β e TR α) foram associados com a redução da densidade capilar nos ventrículos hipertrofiados (Makino et al., 2009).

A atividade pró-angiogênica do T4 e do DITPA (ácido diiodotiropropionico – análogo do hormônio da tireoide) também tem sido reportada em modelos animais sem nenhuma patologia induzida (Tomanek; Busch, 1998). Em modelo de coelhos com isquemia no membro superior, El Eter et al. descreveu a formação de novos ramos arteriais através da análise angiográfica e um aumento do número de vasos por fibra muscular na histologia (El Eter et al., 2007). Estes estudos da vascularização no membro superior são consistentes com resultados em modelos animais com isquemia do miocárdio, que também apresentaram uma melhora da angiogênese no coração pós-IM (Tomanek et al., 1998).

A transdução do sinal de baixa tensão de oxigênio, que ocorre durante o quadro de hipóxia, para ações na célula endotelial e na célula muscular lisa vascular envolve a expressão do HIF-1 α , que conseqüentemente está envolvido na expressão do VEGF. Já foi possível verificar que através da transfecção do gene HIF-1 α para o miocárdio em modelo suíno de oclusão da artéria coronária foi capaz de induzir um aumento na perfusão e melhorar a função ventricular esquerda (Heinl-Green et al., 2005). Similarmente, a superexpressão do HIF-1 α no miocárdio em modelo de infarto em ratos resultou na redução da área de infarto e na neovascularização (Shyu et al., 2002). É interessante ressaltar que o T3 tem-se mostrado capaz de induzir a expressão do HIF-1 α através de um mecanismo dependente sobre a ativação da PI3K, em vez da transdução pela ERK 1/2 (Moeller et al., 2005). Há evidências mais recentes que a ativação da PI3K, que leva à expressão do gene HIF-1 α , pode envolver o receptor integrina para o hormônio da tireoide (Lin et al., 2009). Assim, além dos seus efeitos sobre a angiogênese que envolve o bFGF, VEGF e o EGF, o hormônio da tireoide pode também agir sobre a rede vascular coronariana através do HIF-1 α .

Isso pode ser útil para determinar se as ações da hipóxia e do T3 sobre a expressão do gene HIF-1 α são aditivas, e juntas são capazes de suportar o resgate angiogênico do miocárdio infartado (Luidens et al., 2010).

Além de estimular o bFGF e o VEGF, na literatura é possível verificar que os hormônios da tireoide também estimulam a expressão da angiopoetina-1 (Ang-1) em corações não-isquêmicos (Wang et al., 2002). Zheng e colaboradores, embora tenham verificado o aumento da expressão da Ang-1 e Ang-2 em corações que sofreram o processo de infarto, o tratamento com DITPA não foi capaz de influenciar no aumento da expressão dessas proteínas nos corações infartados (Zheng et al., 2003).

Outro componente envolvido indiretamente na angiogênese, que também sofre a ação dos hormônios da tireoide, é a eNOS. Spooner et al. utilizaram DITPA, como análogo dos hormônios da tireoide, para verificar alterações na função endotelial após o IM em ratos. Além deles verificarem o aumento no relaxamento vascular, também observaram um aumento da expressão da eNOS no tecido aórtico de ratos controles e infartados tratados com DITPA. Portanto, estes resultados permitiram aos autores sugerirem que o análogo tireoidiano, DITPA, foi capaz de aumentar a eNOS e o relaxamento vascular através do aumento do NO na vasculatura (Spooner et al., 2004).

O papel dos hormônios da tireoide na angiogênese já está relativamente bem retratado na literatura, principalmente em relação a modelos de isquemia tecidual. Entretanto, ainda não é possível encontrar dados que relatem a influência dos hormônios da tireoide sobre a vasculatura periférica em modelo animal para isquemia miocárdica que abrangem uma gama de fatores envolvidos na angiogênese e, ainda, ofereçam uma discussão a respeito de que forma a alteração desses fatores poderia influenciar na vasculatura, e como isso poderia repercutir no tecido cardíaco que sofrera o processo de isquemia.

2. Artigo

Efeitos dos hormônios da tireoide sobre a vasculatura periférica em modelo animal de infarto agudo do miocárdio

V.D. Ortiz¹, A.L. de Castro¹, J.H.P. Bonetto¹, R. Siqueira¹, A. Conzatti¹, T.R.G. Fernandes¹, A. Belló-Klein¹ e A.S. Araujo¹

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

Correspondente: Alex Sander da Rosa Araujo. Laboratório de Fisiologia Cardiovascular. Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmento Leite 500, sala 01. CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil. Tel: +55 (51) 3308 3621. Email: alsanderaraujo@hotmail.com.

Resumo

Estudos demonstram um papel cardioprotetor dos hormônios da tireoide (TH) no remodelamento cardíaco após o infarto agudo do miocárdio (IM). Entretanto, não há dados na literatura sobre a influência do próprio IM e do tratamento com HT sobre a vasculatura periférica em modelo animal de IM. Por esse motivo, este estudo tem como objetivo avaliar a influência desses fatores sobre a vasculatura periférica através de parâmetros de estresse oxidativo, da angiogênese e da expressão dos receptores dos HT ($TR\alpha$ e $TR\beta$) e da enzima óxido nítrico sintase (eNOS). Ratos Wistar machos foram divididos em: grupo sham (SHAM), grupo infarto (IAM), sham+HT (SHAMT) e infarto+HT (IAMT). Pós-IM, os animais receberam T3 e T4 (2 e 8 $\mu\text{g}/100\text{g}/\text{dia}$, respectivamente) por gavagem durante 12 dias. Após, os animais foram submetidos à ecocardiografia e eutanasiados. A aorta foi coletada para análises moleculares e bioquímicas. A expressão do fator de crescimento vascular endotelial, do fator induzido por hipóxia 1α e dos receptores $TR\alpha$ e $TR\beta$ aumentou no IAMT em relação ao IAM. A produção de espécies reativas de oxigênio totais, a atividade da NADPH oxidase e a expressão da eNOS diminuíram no IAM e SHAMT em relação ao SHAM, enquanto não houve diferença entre o IAMT em relação ao IAM. Os HT, portanto, agem sobre a angiogênese e sobre a expressão dos receptores $TR\alpha$ e $TR\beta$ na vasculatura periférica em um período pós-IM. Isso pode sugerir uma melhora da sinalização angiogênica na vasculatura, o que pode indiretamente vir a favorecer o miocárdio em termos de perfusão, e uma maior responsividade do tecido vascular periférico aos HT.

Palavras-chave: T3; T4; angiogênese; $TR\alpha$; $TR\beta$; aorta; infarto.

1. Introdução

O infarto agudo do miocárdio (IAM) constitui cerca de 13% das causas de morte no mundo todo (1). É considerada uma cardiopatia isquêmica decorrente de uma deficiência perfusional do tecido cardíaco, responsável por levar à diminuição ou impedimento da chegada de nutrientes aos cardiomiócitos, levando estes à morte celular por necrose. A causa mais comum dessa patologia é a trombose coronária decorrente da ruptura de uma placa aterosclerótica (2). Muitas são as propostas terapêuticas para enfrentar as consequências de tal patologia, sendo o tratamento com hormônios da tireoide considerado como uma delas.

Existem estudos que verificaram uma redução dos níveis dos hormônios da tireoide (T4 – tiroxina ou tetraiodotironina; T3 – triiodotironina) em situações patológicas como no IAM e na insuficiência cardíaca. No caso do IAM, há evidências que o remodelamento cardíaco pós-infarto pode resultar em um coração com fenótipo hipotireoideo. Dados que comprovam isso revelam uma *downregulation* dos receptores dos hormônios da tireoide alfa (TR α) e beta (TR β) no coração de ratos infartados (3). Entretanto, posteriores estudos demonstraram a existência de uma ação positiva dos hormônios da tireoide, usados como tratamento sobre o remodelamento cardíaco pós-infarto agudo do miocárdio (4,5). Além disso, existem estudos que relatam a capacidade dos hormônios da tireoide exercerem efeitos tanto sobre o coração quanto sobre o sistema vascular periférico (6). Tais efeitos incluem a redução da resistência vascular, bem como uma ação sobre as células musculares lisas dos vasos, promovendo um relaxamento vascular (7). Ainda, há relatos que incluem a ação dos hormônios da tireoide sobre fatores envolvidos na angiogênese (8), sobre a expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (9), sobre o receptor TR β (10), bem como sobre a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (10).

A produção de ERO vasculares, em situações patológicas, causa a desregulação no sistema de controle redox, promovendo o dano oxidativo, o que pode exercer um papel crítico nas doenças vasculares (11). Embora a enzima xantina oxidase contribua para a produção de ERO no vaso, é a NADPH oxidase considerada a principal fonte formadora (12). Portanto, a análise da produção de ERO totais e da expressão dessas

enzimas é importante para avaliar a situação da homeostase redox vascular periférica após o IM. Ainda, outro fator importante na homeostase vascular é o óxido nítrico (NO), composto cuja produção é mediada pela eNOS, já bem conhecido por estar relacionado à vasoproteção. Essa finalidade está associada a vários fatores como a manutenção do tônus vascular, a regulação da pressão sanguínea, a prevenção da agregação plaquetária, a inibição da adesão de monócitos e neutrófilos no endotélio vascular, a ação antiproliferativa e efeito antioxidante (13). Por isso, é interessante avaliar a expressão da eNOS como uma forma de verificar indiretamente a biodisponibilidade do NO e, com isso, discutir a questão da vasoproteção.

Como neste estudo se utilizou a aorta como vaso representante da vasculatura periférica, a avaliação da presença de fatores envolvidos no processo angiogênico é fundamental, uma vez que é a partir da aorta que partem ramos colaterais responsáveis por irrigar o tecido cardíaco (14). Dentre esses fatores, inclui-se o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), considerado um dos principais marcadores angiogênicos, visto que a sinalização do VEGF tem papel fundamental na promoção da proliferação e diferenciação de todas as linhagens celulares envolvidas na formação de vasos sanguíneos, bem como na restauração do suprimento sanguíneo ao tecido isquêmico em vários estados patológicos (15). A expressão proteica desse marcador angiogênico é regulada principalmente pelo fator induzido por hipóxia 1α (HIF- 1α), um fator de transcrição que medeia a adaptação celular à hipóxia e controla a angiogênese pós-natal. O HIF- 1α é considerado uma proteína expressa nos cardiomiócitos, nas células endoteliais e nas células do processo inflamatório após o IM, sendo sua ativação desencadeada pela presença de um quadro de hipóxia, o que leva consequentemente à transcrição de genes associados à atividade pró-angiogênica, como o gene do VEGF (16). Outro fator importante na sinalização angiogênica é a angiopoetina-1 (Ang-1). Esta é expressa nas células perivasculares (pericitos, células musculares lisas vasculares e fibroblastos), tendo como sua principal função agir sobre a vasculatura para controlar o desenvolvimento do vaso sanguíneo e sua estabilidade (17).

Não há, entretanto, dados na literatura que descrevam a influência das consequências do próprio IM e do tratamento com hormônios da tireoide sobre a vasculatura periférica em modelo animal de IM. Por esse motivo, este estudo teve como objetivo avaliar esta influência de ambos fatores, modelo e tratamento, sobre a

vasculatura periférica através de parâmetros de estresse oxidativo e de angiogênese, juntamente avaliando a expressão dos receptores TR α e TR β e da enzima óxido nítrico sintase. A partir desses objetivos, foi possível verificar que houve uma ação dos hormônios da tireoide sobre a sinalização angiogênica e sobre a expressão dos receptores TR α e TR β na vasculatura periférica dos animais infartados que receberam tratamento hormonal.

2. Materiais e métodos

2.1. Animais

Todos os procedimentos com animais foram de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), com processo número 23262. Foram utilizados ratos Wistar machos com 90 dias de idade e peso médio de 347 ± 48 g, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação Animal (CREAL) da UFRGS. Durante o período de experimentação (14 dias), os animais foram alojados no Biotério Setorial do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS, sendo mantidos em caixas plásticas (270 x 260 x 310 mm), com o assoalho coberto com serragem. Receberam alimentação e água a vontade e foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas, em ambiente climatizado a 22°C.

2.2. Grupos experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos de estudo (n= 11-16 animais/grupo):

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

artéria coronária descendente anterior, juntamente ao tratamento com T3 e T4.

- Grupo infarto do miocárdio + tratamento com os hormônios da tireoide (IAMT) – foi submetido ao infarto pela ligadura da artéria coronária descendente anterior juntamente ao tratamento com T3 e T4.

2.3. Desenho Experimental

O protocolo experimental abrangeu um período de 14 dias, nos quais foram realizados os seguintes procedimentos:

- 1º dia) Os animais dos grupos IAM e IAMT foram submetidos ao infarto pela ligadura da artéria coronária descendente anterior. Já os animais dos grupos SHAM e SHAMT foram submetidos à cirurgia que consistiu dos mesmos procedimentos cirúrgicos, com exceção da ligadura da artéria coronária descendente anterior. Após esse procedimento, os animais foram deixados em repouso por dois dias para recuperação.
- 3º ao 14º dia) Os grupos SHAMT e IAMT receberam diariamente o tratamento hormonal com T3 e T4 por gavagem. Os grupos IAM e SHAM, por sua vez, receberam diariamente apenas solução aquosa.
- 14º dia) Após o procedimento anestésico, foram feitas as análises ecocardiográficas dos animais de todos os grupos experimentais. Em seguida, foi realizada a coleta do sangue, para a realização das dosagens hormonais, e, também, a coleta da aorta dos animais para a realização dos testes bioquímicos e da análise da expressão proteica.

2.4. Procedimento cirúrgico

O infarto agudo do miocárdio foi induzido por um método adaptado ao descrito por Johns e Olson em 1954 (18), no qual é realizada a ligadura da artéria coronária descendente anterior. Para isso, primeiramente, os animais foram anestesiados com quetamina (90 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg) por via intraperitonal. Uma vez concluído o procedimento cirúrgico, os animais foram colocados isoladamente em suas gaiolas

para a recuperação anestésica. Os mesmos foram tratados por dois dias com o analgésico tramadol (2,5mg/kg, via subcutânea) de 8 em 8 horas, visando minimizar a dor e o desconforto no período pós-operatório. Após isso, foram colocados em ambiente aquecido para recuperação (19).

2.5. Administração dos hormônios tireoide

Após a cirurgia, os animais permaneceram em recuperação por 2 dias. Depois desse período, os animais dos grupos IAMT e SHAMT receberam diariamente, por gavagem, o tratamento hormonal com 2 µg/100g peso do rato/dia de T3 e 8µg/100g peso do rato/dia de T4 em solução salina (20,4). Os animais dos grupos IAM e SHAM, por sua vez, receberam diariamente apenas solução salina por gavagem. O período de tratamento foi de 12 dias após o período de recuperação.

2.6. Dosagem dos níveis séricos de T4

Os animais anestesiados foram submetidos à coleta de sangue através do plexo retro orbital. O sangue coletado com heparina foi centrifugado por 10 minutos a 1000 X g em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B – Rotor SM 24), e o soro separado e congelado em freezer a - 80°C para a dosagem dos hormônios tireoidianos. O método utilizado para a dosagem de T4 foi o método de quimiluminescência, realizado no Laboratório Veterinário TECSA, utilizando o sistema automatizado ROCHE, modelo COBAS E-411. Os resultados de T4 foram expressos em µg/dL.

2.7. Análises ecocardiográficas

Após 14 dias da cirurgia, foi realizada a análise ecocardiográfica dos animais. Os animais foram anestesiados com quetamina e xilazina (90mg/kg e 20mg/kg, respectivamente, via intraperitoneal) e posicionados em decúbito lateral para a obtenção das imagens. Foi utilizado o sistema de ultrassom Philips HD XE com um transdutor de 12-13 MHz, numa profundidade de 3 cm. Para a medida da área de infarto (AI) foi utilizado o perímetro correspondente ao segmento infartado (região

acinética ou hipocinética (RAH)) e o perímetro endocárdico total (PET). Esses perímetros foram analisados durante a diástole em cada um dos planos ecocardiográficos transversos utilizados: basal, medial e apical. A área de infarto foi calculada através da seguinte equação: $AI = (RAH/PET \times 100)$ (21). Os volumes cardíacos (volume diastólico final (VDF) e volume sistólico final (VSF)) foram calculados através do método de Simpson modificado (22). A fração de ejeção (FE) foi calculada através da equação: $FE = (VDF-VSF/VDF \times 100)$ (23).

2.8. Preparação do tecido

Após a eutanásia dos animais, as aortas coletadas foram primeiramente maceradas em nitrogênio líquido. Em seguida, o resultado dessa maceração foi homogeneizado (tampão Cell Lysis 1:10 (Cell Signaling) e fenil metil sulfonil fluoreto (PMSF) 20 mmol/L, 1:100) no aparelho homogeneizador Ultra-Turrax. Posteriormente, também foi realizada uma sonicação desse preparado utilizando o sonicador Hielscher Ultrasound Technology (amplitude 70%; ciclo 0,4) (24).

2.9. Determinação da concentração proteica

A concentração de proteína no homogeneizado de aorta foi determinada pelo método de Lowry (25), utilizando albumina de soro bovino como padrão. A medida foi efetuada em espectrofotômetro a 625 nm e os resultados expressos em mg/mL.

2.10. Determinação das espécies reativas de oxigênio totais

As espécies reativas de oxigênio totais foram avaliadas espectrofluorimetricamente através da oxidação do diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) em 2,7-diclorofluoresceína, na presença dessas espécies. As amostras do homogeneizado de aorta foram excitadas em 488 nm, e a emissão foi coletada em 525 nm. Os resultados foram expressos em nmoles por mg de proteína (26).

2.11. Determinação da atividade da NADPH oxidase

A atividade da enzima NADPH oxidase foi determinada mediante uma técnica espectrofotométrica descrita por Wei e colaboradores, a qual avalia o consumo de NADPH em um comprimento de onda de 340 nm (27).

2.12. Análise da expressão proteica por Western Blot

Foram analisadas as expressões proteicas das seguintes proteínas: xantina oxidase, eNOS, TR α , TR β , angiopoetina-1, VEGF e HIF-1 α . A homogeneização do tecido, a eletroforese e a transferência de proteínas foram realizadas conforme descrito na literatura (28,29). As membranas foram processadas para a imunodeteção utilizando os seguintes anticorpos primários: xantina oxidase (150 kDa), eNOS (140 kDa), TR α (47 kDa), TR β (55 kDa), angiopoetina-1 (60 kDa), VEGF (42 kDa) e HIF-1 α (132 kDa) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA ou Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Os anticorpos primários foram detectados utilizando-se anticorpos secundários de acordo com a origem dos primários (anti-rabbit, anti-mouse ou anti-goat), e as membranas foram reveladas por quimiluminescência. Os filmes autorradiográficos foram quantitativamente analisados no densitômetro de imagem (Imagemaster VDS CI, Amersham Biosciences, Europe, IT). Os pesos moleculares das bandas de proteínas foram determinados em referência a um marcador de peso molecular (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad, CA, USA). Os resultados de cada membrana foram normalizados por Ponceau-red (30).

2.13. Análise estatística

A comparação entre dados foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, complementado com teste de Student-Newmann-Keuls. Foi utilizado o Teste t de Student para comparar as áreas de infarto entre os dois grupos infartados (IAM e IAMT). As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentou um $P < 0.05$. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão. O software Sigma Plot, versão 12.0 para Windows, foi utilizado como

ferramenta computacional para análise estatística dos dados. O software GraphPad Instat, versão 3.00 para Windows, foi utilizado para a confecção dos gráficos.

3. Resultados

3.1. Níveis dos hormônios da tireoide no plasma

Após 12 dias de administração dos hormônios da tireoide, o nível de T4 no plasma foi significativamente maior no grupo SHAMT (109,7%) e IAMT (148,7%), em comparação aos seus grupos controles SHAM e IAM, respectivamente, como mostra os dados na Tabela 1.

3.2. Análises ecocardiográficas

Após 14 dias da cirurgia de indução do IM, os grupos IAM e IAMT não apresentaram diferença em relação à área de infarto entre si. A fração de ejeção diminuiu no grupo IAM (58,3%) em relação ao SHAM, enquanto no grupo IAMT diminuiu (48%) em relação ao grupo SHAMT, porém aumentou (28,4%) em comparação ao grupo IAM (Tabela 1).

3.3. Expressão de marcadores de angiogênese e do HIF-1 α

A expressão do VEGF (Figura 1A) e HIF-1 α (Figura 1B) aumentou nos grupos tratados em relação aos não tratados. O grupo IAMT apresentou um aumento na expressão do VEGF (54,7%) e do HIF-1 α (265,9%) em comparação ao grupo IAM. Já a expressão da angiopoetina-1 (Ang-1) revelou-se diminuída no grupo IAM (46,6%) e SHAMT (33,1%) em relação ao grupo SHAM (Figura 1C).

3.4. Expressão dos receptores dos hormônios da tireoide – $TR\alpha$ e $TR\beta$

A expressão do $TR\alpha$ aumentou (65,4%) no grupo IAMT em relação ao grupo IAM (Figura 2A). A respeito do $TR\beta$, sua expressão diminuiu nos grupos IAM (57,2%) e SHAMT (49,8%) quando comparada ao grupo SHAM, enquanto o grupo IAMT apresentou um aumento (81,3%) da expressão do $TR\beta$ em comparação ao grupo IAM (Figura 2B).

3.5. Parâmetros de estresse oxidativo

Os animais tratados com os hormônios da tireoide apresentaram uma redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) totais no tecido aórtico em relação aos animais não tratados. O grupo SHAMT apresentou uma redução (56,9%) desses níveis em comparação ao grupo SHAM. Ainda, o nível de ERO do grupo IAM diminuiu (20,7%) em relação ao grupo SHAM (Figura 3A). Esse resultado reflete-se no resultado da NADPH oxidase que apresentou o mesmo padrão de resposta (Figura 3B). Todavia, a expressão da enzima xantina oxidase não apresentou diferença significativa entre os grupos (Figura 3C).

3.6. Expressão da enzima óxido nítrico sintase

A expressão da enzima óxido nítrico sintase apresentou-se maior nos grupos não tratados em comparação aos tratados, tendo o grupo IAM revelado um redução (38,7%) em relação ao grupo SHAM; enquanto, no grupo IAMT, essa expressão aumentou (112,4%) em comparação ao grupo SHAMT. Ainda, foi possível observar uma diminuição significativa (71,8%) da expressão da eNOS no grupo SHAMT em relação ao grupo SHAM (Figura 4).

4. Discussão

Os principais resultados deste estudo estão associados à ação dos hormônios da tireoide sobre a angiogênese e sobre a expressão dos receptores TR α e TR β na vasculatura periférica em um período pós-IM. Esses achados podem ser associados a uma melhora da sinalização angiogênica na vasculatura periférica, o que pode indiretamente vir a favorecer o miocárdio em termos de perfusão, juntamente a uma maior responsividade do tecido vascular periférico aos hormônios da tireoide.

Em relação ao modelo de estudo, foi possível verificar uma similaridade entre as áreas de infarto em ambos grupos infartados, indicando uma homogeneidade entre os grupos, bem como uma reprodutibilidade do método cirúrgico utilizado para induzir a patologia de estudo. Ainda, o aumento dos níveis de T4 nos grupos tratados com os hormônios da tireoide indica que o método de administração do tratamento foi eficaz. Dentro desse modelo e tratamento, o principal marcador da angiogênese avaliado neste estudo foi o VEGF.

A expressão do VEGF não se alterou no grupo IAM em comparação ao grupo SHAM, o que provavelmente está associada a uma fraca sinalização para o processo angiogênico em frente a situação patológica desse grupo. Entretanto, o aumento do VEGF verificado no grupo IAMT, em relação ao grupo IAM, indica uma maior sinalização para a promoção da proliferação e diferenciação de linhagens celulares envolvidas na formação de vasos sanguíneos nesse grupo em um período pós-infarto. Isto ratifica a ação do VEGF como mediador da angiogênese induzida pelos hormônios da tireoide (8). O mesmo perfil de resultado do VEGF foi observado no resultado da expressão do HIF-1 α . O aumento da expressão do HIF-1 α no grupo IAMT provavelmente está associado à elevação da expressão do VEGF neste mesmo grupo, visto que a ativação do HIF-1 α nas células endoteliais vasculares leva à transcrição de genes associados à atividade pró-angiogênica, como o gene do VEGF (15). Já o fator desencadeador da expressão do HIF-1 α pode estar relacionado não somente à hipóxia tecidual, mas também à própria capacidade do T3 de induzir a expressão do HIF-1 α através de um mecanismo dependente da ativação da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) (31), visto que não é possível confirmar se há ou não o estabelecimento de um estado de hipóxia sobre o tecido vascular da aorta. Há

evidências mais recentes que a ativação da PI3K, que leva à expressão do gene HIF-1 α , pode envolver o receptor integrina $\alpha v \beta 3$ (32), ao qual os hormônios da tireoide são capazes de ligarem-se, desencadeando sua função pró-angiogênica (33). Por outro lado, a inalteração dos níveis de expressão do HIF-1 α no grupo IAM, em relação ao grupo SHAM, indica que este fator além de não contribuir para a expressão do gene do VEGF, também não colabora com o mecanismo da angiogênese no período pós-infarto.

Em relação ao outro marcador da angiogênese avaliado neste estudo, a Ang-1, foi possível verificar uma diminuição da sua expressão no grupo SHAMT em relação ao grupo SHAM, o que pode significar uma possível regulação dos hormônios da tireoide sobre a Ang-1 em condições fisiológicas. Também foi possível observar uma redução dos níveis de expressão da Ang-1 no grupo IAM em relação ao grupo SHAM, níveis esses que praticamente não são alterados após o tratamento hormonal. Embora na literatura seja possível verificar que os hormônios da tireoide estimulam a expressão da Ang-1, têm-se estudos em que essa expressão é avaliada apenas em tecido cardíaco não-isquêmico (34) e isquêmico (35). Neste último caso, embora os dados demonstrem o aumento da expressão da Ang-1 e Ang-2 em corações com processo isquêmico, o tratamento com DITPA, análogo dos hormônios da tireoide, não foi capaz de influenciar no aumento da expressão dessas proteínas em tecido cardíaco isquêmico (35). Portanto, a regulação dos hormônios tireoideanos sobre a Ang-1 ainda é pouco esclarecida. Além dessa regulação não ter sido avaliada em outros tecidos, como no tecido vascular periférico, também pode apresentar variação de acordo com a condição fisiológica ou patológica que envolve um tecido específico. Sabe-se, no entanto, que a Ang-1 e o VEGF regulam a angiogênese em níveis distintos. O VEGF age na indução da formação e crescimento do vaso sanguíneo, enquanto a Ang-1 medeia o remodelamento e a maturação desse vaso para garantir uma maior estabilidade do vaso recém-formado (16). Logo, o fato dos níveis de expressão da Ang-1 estarem baixos no grupo IAMT, embora não seja possível associar com a ação ou não dos hormônios da tireoide sobre a Ang-1, representa uma vantagem no processo angiogênico em um período pós-infarto, uma vez que é necessário que o endotélio responda aos estímulos responsáveis por induzir a formação de novos vasos. Com isso, primeiramente é necessário que ocorra a formação e o crescimento do vaso sanguíneo, função realizada pelo VEGF, e só posteriormente deve

concretizar-se a maturação e estabilização desse vaso, ação mediada pela Ang-1, visto que o efeito pró-estabilização da via de sinalização constitutiva da Ang-1 irá potencialmente antagonizar a resposta do endotélio a formação de novos vasos (16). Esses resultados em torno da angiogênese, considerando um período de 14 dias pós-IM, período ainda recente após o infarto, permitem a sugestão de que a formação de vasos sanguíneos a partir de um vaso pré-existente (vasos de pequeno porte: ramificações vasculares da aorta), mediada pelo aumento do VEGF, possa gerar posteriormente um quadro de melhor perfusão sanguínea do tecido cardíaco, uma vez que a partir da aorta surgem ramificações vasculares, como as artérias coronárias, responsáveis por irrigar o tecido cardíaco. Portanto, provavelmente a formação de uma rede vascular a partir das ramificações vasculares da aorta pode favorecer o miocárdio pós-IM em termos de aporte sanguíneo.

A respeito da expressão do receptor $TR\alpha$, não foi observada nenhuma alteração da sua expressão tanto do grupo IAM quanto do grupo SHAMT em relação ao grupo SHAM, porém foi possível verificar um aumento dos níveis do $TR\alpha$ no grupo IAMT em relação ao grupo IAM. Recentemente, a *upregulation* desse receptor em células endoteliais foi retratada como um fator cardioprotetor contra a injúria miocárdica em ratos submetidos a um processo de isquemia/reperfusão (36). Por isso, sendo os hormônios da tireoide capazes de atuarem no aumento do fluxo sanguíneo coronariano e, conseqüentemente, na melhora da taxa de perfusão do tecido cardíaco (36), o aumento da expressão do $TR\alpha$ no tecido vascular da aorta pode indicar uma colaboração para a maior responsividade desse tecido a essas ações do hormônio, principalmente, em relação a melhora da taxa de perfusão tecidual. Já em relação à expressão do $TR\beta$, observou-se a *downregulation* desse receptor nos grupos IAM e SHAMT em relação ao grupo SHAM. Essa baixa expressão do $TR\beta$ que ocorre no grupo SHAMT é justificável, ao passo que em condições fisiológicas o excesso da concentração do hormônio provoca como resposta adaptativa a *downregulation* desse receptor nos tecidos para não exacerbar as ações dos hormônios tireoideanos. No entanto, em condições patológicas, estudos prévios demonstraram uma alteração na expressão dos receptores dos hormônios da tireoide ($TR\alpha$ e $TR\beta$) no tecido cardíaco após o IM, levando a um quadro de “hipotireoidismo tecidual” (3). Isso permite transpor esse achado à queda dos níveis da expressão do $TR\beta$ no tecido vascular da aorta do grupo infartado, ou seja, esse mesmo quadro de “hipotireoidismo tecidual” que ocorre

no tecido cardíaco, também é possível ser verificado no tecido vascular periférico após o infarto. Já no grupo IAMT, foi possível verificar o aumento da expressão desses níveis, permitindo, dessa forma, a recuperação da maior responsividade do tecido aórtico às ações dos hormônios da tireoide via esse receptor. Essas ações podem estar relacionadas ao processo de angiogênese, visto que em um estudo anterior foi descrito uma relação do TR β a este processo (37). Neste estudo, animais *knockout* para o TR β , ou para ambos (TR β e TR α), apresentaram uma redução da densidade capilar nos ventrículos hipertrofiados (37). De fato, o aumento da expressão deste receptor nuclear, no grupo IAMT, permite a sugestão que isso possa estar relacionado com a maior expressão do VEGF encontrado no tecido aórtico desses animais, o que conseqüentemente colabora para o processo angiogênico. Já no grupo IAM, que apresentou a diminuição da expressão do TR β , não foi verificado este aumento nos níveis do VEGF. No estudo de Suarez et al., é reforçado que provavelmente o efeito angiogênico é mediado exclusivamente pelo TR β , uma vez que em seu estudo não foi verificado o aumento da densidade capilar nos animais que expressavam exclusivamente TR α (36), enquanto no trabalho de Makino et al., foi possível verificar que nos animais *knockout* para o TR β apresentavam diminuição da densidade capilar (37). Portanto, o presente estudo pode reforçar esses achados, visto que os animais do grupo IAMT, embora tenham apresentado o aumento da expressão do TR α , que pode estar envolvido em ações relacionadas à melhora na perfusão tecidual, apresentaram também o aumento do TR β , em relação ao qual já foi descrito seu papel sobre a angiogênese, o que pode significar uma possível relação com o resultado do VEGF. Entretanto, mais estudos são necessários para confirmar o mecanismo exato que justifique a causa dessa *upregulation* dos receptores TR α e TR β na vasculatura periférica após o IM e o tratamento hormonal, buscando associações entre a via que justifica esse aumento com a via associada ao mecanismo angiogênico.

Em relação aos parâmetros de estresse oxidativo, foi possível observar a diminuição dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) nos grupos IAM e SHAMT quando comparados ao grupo SHAM. A diminuição dos níveis de ERO no grupo SHAMT, deve estar associada a própria capacidade dos hormônios da tireoide em atuarem na redução das ERO como verificado em estudo anterior (10). Entretanto, após o tratamento hormonal, não foi possível verificar alteração dos níveis de ERO no grupo IAMT em relação ao grupo IAM, ou seja, ambos grupos apresentaram baixos

níveis de ERO, o que pode ser justificado pelo resultado da atividade da NADPH oxidase, visto que o mesmo padrão de resposta foi verificado em ambos resultados. Portanto, uma vez que a NADPH oxidase é a principal fonte formadora de ERO nos vasos sanguíneos, a maior expressão desta enzima parece corroborar com o resultado dos níveis de ERO encontrados (12). Já a respeito dos níveis de expressão da xantina oxidase (XO), não foi possível observar a alteração da sua expressão entre os grupos de estudo. Embora a XO também seja considerada outra fonte de produção de ERO nas células dos vasos sanguíneos, a NADPH oxidase representa a principal fonte. Outro importante radical envolvido na homeostase redox vascular é o NO. Para verificar o envolvimento do NO na ação dos hormônios da tireoide sobre o vaso, foi avaliada neste estudo a expressão da enzima responsável pela sua produção, a eNOS.

O resultado da expressão proteica da eNOS apresentou-se um tanto contraditório com o que se encontra na literatura, visto que, em um estudo anterior de Spooner e colaboradores, a administração de um análogo dos hormônios da tireoide provocou o aumento da expressão da eNOS no tecido aórtico tanto nos animais controles quanto nos animais infartados tratados com esse análogo (9). No entanto, neste estudo, embora o modelo de IM, tratamento e tecido avaliado sejam parecidos ao do presente estudo, há várias diferenças. No estudo de Spooner, foram utilizados ratos Sprague-Dowley, enquanto neste estudo utilizou-se ratos Wistar, e o tratamento baseou-se na administração de um análogo dos hormônios da tireoide, DITPA (ácido diiodotiropropionico) via subcutânea numa dose de 375µg/100g, enquanto no presente estudo o tratamento incluiu a administração via oral de T3 e de T4 em uma dose de 2µg/100 g/dia e 8 µg/100 g/dia, respectivamente. Por último, a linha temporal do estudo de Spooner et al. difere da utilizada neste estudo, visto que eles administraram o tratamento com DITPA no grupo controle e infartado, apenas após três semanas da indução do IM, e, ainda, com um período de tratamento que abrangeu a duração de três semanas. Isso difere da linha temporal deste estudo, em que os animais dos grupos tratados receberam o tratamento com hormônios da tireoide dois dias após a indução do IM, por um período de 12 dias. Portanto, é ainda discutível como se dá a oscilação da expressão proteica da eNOS conforme o período desse tratamento hormonal após o IM.

Por fim, é importante salientar a contribuição desse trabalho num contexto em que não há outros trabalhos realizados com objetivo de compreender o impacto tanto do próprio IM quanto do tratamento com hormônios tireoidianos na vasculatura periférica após o IM. Em virtude disso, foi possível constatar que o infarto do miocárdio, por si só, foi capaz de ocasionar um quadro de hipotireoidismo tecidual na vasculatura periférica aórtica, como verificado através da análise da expressão do receptor TR β . Entretanto, o tratamento com hormônios da tireoide foi capaz de reverter esse quadro, aumentando a expressão tanto do TR β quanto do TR α . A elevação da expressão do TR α pode estar envolvida em uma possível melhora da perfusão tecidual. Já o aumento dos níveis do TR β , no grupo IAMT, pode estar associado ao aumento do VEGF, como sugerem estudos anteriores, indicando uma maior sinalização para o processo angiogênico no tecido aórtico. A partir desse achado, pode-se sugerir que a formação de uma rede vascular a partir das ramificações vasculares da aorta talvez, posteriormente, seja capaz de favorecer o miocárdio pós-IM em termos de aporte sanguíneo. Esses dados podem reforçar demais estudos que demonstram o papel protetor dos hormônios da tireoide sobre o sistema cardiovascular.

Referências

1. World Health Organization. *The Global Burden of Disease: 2004 update*. Geneva: World Health Organization, 2008.
2. Libby P, Bonow RO, Mann DL, Zipes DP. Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine. Ed 8. *Saunders Elsevier*, 2007.
3. Pantos C, Mourouzis I, Saranteas T, Paizis I, Xinaris C, Malliopoulou V, Cokkinos D. Thyroid hormone receptors $\alpha 1$ and $\beta 1$ are downregulated in the post-infarcted rat heart: consequences on the response to ischaemia-reperfusion. *Basic Research Cardiology* 2005; 100:422-432.
4. Pantos C, Mourouzis I, Markakis K, Tsagoulis N, Panagiotou M, Cokkinos DV. Long-term thyroid hormone administration reshapes left ventricular chamber and improves cardiac function after myocardial infarction in rats. *Basic Research in Cardiology* 2008; 103:308-318.
5. Pantos C, Mourouzis I, Galanopoulos G, Gavra M, Perimenis P, Spanou D, Cokkinos DV. Thyroid hormone receptor $\alpha 1$ down-regulation in postischemic heart failure progression: the potential role of tissue hypothyroidism. *Hormone and Metabolic Research* 2010; 42:718-724.
6. Kahaly GJ, Dillmann WH. Thyroid hormone action in the heart. *Endocrine Reviews* 2005; 26:704-728.
7. Grais IM, Sowers JR. Thyroid and the heart. *American Journal of Medicine* 2014; 127: 691-698.
8. Luidens MK, Mousa SA, Davis FB, Lin HY, Davis PJ. Thyroid hormone and angiogenesis. *Vascular Pharmacology* 2010; 52:142-145.
9. Spooner PH, Thai HM, Goldman S, Gaballa MA. Thyroid hormone analog, DITPA, improves endothelial nitric oxide and beta-adrenergic mediated vasorelaxation after myocardial infarction. *Journal of cardiovascular pharmacology* 2004; 44:453-459.
10. de Castro AL, Tavares AV, Campos C, Fernandes RO, Siqueira R, Conzatti A, Bicca AM, Fernandes TRG, Sartório CL, Schenkel PC, Belló-Klein A, Araujo ASR. Cardioprotective effects of thyroid hormones in a rat model of myocardial infarction are associated with oxidative stress reduction. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2014; 391:22-29.

11. Manea, A. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species: Involvement in vascular physiology and pathology. *Cell and Tissue Research* 2010; 342(3):325-339.
12. Konior, A, Schramm A Czesnikiewicz-Guzik M, Guzik TJ. NADPH oxidases in vascular pathology. *Antioxidants & redox signaling* 2014; 20:2794–2814.
13. Dusse LMSA, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. *J. bras. patol. med. Lab* 2004; 39:343–350.
14. Guyton, A.C. Fisiologia Humana. 5ª ed., Rio de Janeiro, Ed. Interamericana, 1981.
15. Taimeh Z, Loughran J, Birks EJ, Bolli R. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis in heart failure. *Nature Reviews Cardiology* 2013; 10:519–530.
16. Cochain C, Channon KM, Silvestre JS. Angiogenesis in the Infarcted Myocardium. *Antioxidants & Redox Signaling* 2013; 18:1100-1113.
17. Fagiani E, Christofori G. Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer Letters* 2013; 328:18-26.
18. Johns TNP, Olson BJ. Experimental myocardial infarction: a method of coronary occlusion in small animals. *Annals of Surgery*, 1954; 140:675-682.
19. Schenkel PC, Tavares A, Fernandes R, Diniz GP, Bertagnolli M, Araujo ASR, et al. Redox-sensitive prosurvival and proapoptotic protein expression in the myocardial remodeling post-infarction in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2010; 341:1-8.
20. Pantos C, Mourouzis I, Markakis K, Dimopoulos A, Xinaris C, Kokkinos AD, et al. Thyroid hormone attenuates cardiac remodeling and improves hemodynamics early after acute myocardial infarction in rats. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 2007; 32:333–339.
21. Nozawa E, Kanashiro R, Murad N, Carvalho ACC, Cravo SL, Campos O, et al. Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2006; 39:687-695.
22. Mercier JC, Disessa TG, Jarmakani JM, Nakanishi T, Hiraishi S., Isabel-Jones J, et al. Two-dimensional echocardiographic assessment of left ventricular volumes and ejection fraction in children. *Circulation* 1982; 65:962-969.
23. Salemi VM, Pires MD, Cestari IN, Cestari IA, Picard MH, Leirner AA, et al. Echocardiographic assessment of global ventricular function using the myocardial performance index in rats with hypertrophy. *Artificial Organs* 2008; 28:332-337.

24. Sartório CL, Fraccarollo D, Galuppo P, Leutke M, Ertl G, Stefanon I, et al. Mineralocorticoid Receptor Blockade Improves Vasomotor Dysfunction and Vascular Oxidative Stress Early After Myocardial Infarction. *Hypertension* 2007; 50:919–925.
25. Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL, Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 1951; 193:265–275.
26. Lebel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research and Toxicology* 1992; 5:227-231.
27. Wei Y, Sowers JR, Nistala R, Gong H, Uptergrove GM, Clark SE, Morris EM, Szary N, Manrique C, Stump C. Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281:35137-35146.
28. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
29. Araujo ASR, Ribeiro MFM, Enzweiler A, Schenkel P, Fernandes TRG, Partata WA, et al. Myocardial antioxidant enzyme activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2006; 249:133-139.
30. Klein D, Kern RM, Sokol RZ. A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1995; 36:59-66.
31. Moeller LC, Dumitrescu AM, Refetoff S. Cytosolic action of thyroid hormone leads to induction of hypoxia-inducible factor-1alpha and glycolytic genes. *Molecular Endocrinology* 2005; 19:2955–2963.
32. Lin HY, Sun M, Tang HY, Lin C, Luidens MK, Mousa SA, et al. L-Thyroxine vs. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *American Journal Physiology-Cell Physiology* 2009; 296:980–991.
33. Mousa SA, O'Connor L, Davis FB, Davis PJ. Proangiogenesis Action of the Thyroid Hormone Analog 3,5-Diiodothyropropionic Acid (DITPA) Is Initiated at the Cell Surface and Is Integrin Mediated. *Endocrinology* 2006; 147:1602–1607.
34. Wang X, Zheng W, Christensen LP, Tomanek RJ. DITPA stimulates bFGF, VEGF, angiopoietin, and Tie-2 and facilitates coronary arteriolar growth. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 2003; 284:613–618.

35. Zheng W, Weiss RM, Wang X, Zhou R, Arlen AM, Lei L, et al. DITPA stimulates arteriolar growth and modifies myocardial postinfarction remodeling. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2004; 286:1994–2000.
36. Suarez J, Wang H, Scott BT, Ling H, Makino A, Swanson E, et al. In vivo selective expression of thyroid hormone receptor α 1 in endothelial cells attenuates myocardial injury in experimental myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2014; 307:340–346.
37. Makino A, Suarez J, Wang H, Belke DD, Scott TBT, Dillmann WH. Thyroid hormone receptor-beta is associated with coronary angiogenesis during pathological cardiac hypertrophy. *Endocrinology* 2009; 150:2008–2015.

Legendas

Figura 1. Expressão de marcadores da angiogênese e do HIF-1 α no tecido aórtico 14 dias pós-cirurgia. (A) VEGF (Fator de crescimento vascular endotelial), (B) HIF-1 α (Fator induzido por hipóxia 1 α), (C) Ang-1 (Angiopoetina-1). Valores expressos como média \pm desvio padrão de 3-4 animais por grupo. * Diferença significativa entre o grupo SHAM versus IAM; ** Diferença significativa entre o grupo SHAMT versus IAMT (P < 0.05); # Diferença significativa entre o grupo SHAM versus SHAMT (P < 0.05); + Diferença significativa entre o grupo IAM versus IAMT (P < 0.05).

Figura 2. Expressão dos receptores dos hormônios da tireoide no tecido aórtico 14 dias pós-cirurgia. (A) Receptor dos hormônios da tireoide α (TR α), (B) Receptor dos hormônios da tireoide β (TR β). Valores expressos como média \pm desvio padrão de 3-4 animais por grupo. * Diferença significativa entre o grupo SHAM versus IAM; ** Diferença significativa entre o grupo SHAMT versus IAMT (P < 0.05); # Diferença significativa entre o grupo SHAM versus SHAMT (P < 0.05); + Diferença significativa entre o grupo IAM versus IAMT (P < 0.05).

Figura 3. Parâmetros de estresse oxidativo no tecido aórtico 14 dias pós-cirurgia. (A) Níveis de espécies reativas de oxigênio totais, (B) Atividade da enzima NADPH oxidase, (C) Expressão da enzima xantina oxidase. Valores expressos como média \pm desvio padrão de 4-9 animais por grupo. * Diferença significativa entre o grupo SHAM versus IAM; ** Diferença significativa entre o grupo SHAMT versus IAMT (P < 0.05); # Diferença significativa entre o grupo SHAM versus SHAMT (P < 0.05); + Diferença significativa entre o grupo IAM versus IAMT (P < 0.05).

Figura 4. Expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) no tecido aórtico 14 dias pós-cirurgia. Valores expressos como média \pm desvio padrão de 4-8 animais por grupo. * Diferença significativa entre o grupo SHAM versus IAM; ** Diferença significativa entre o grupo SHAMT versus IAMT (P < 0.05); # Diferença significativa entre o grupo SHAM versus SHAMT (P < 0.05); + Diferença significativa entre o grupo IAM versus IAMT (P < 0.05).

Tabela 1.**Tabela 1.** Níveis hormonais e parâmetros ecocardiográficos, 14 dias após a cirurgia.

Parâmetros	SHAM	IAM	SHAMT	IAMT
Níveis hormonais				
Níveis de T4 (ug/dL)	5.38±0.73	4.54±0.69	11.28±1.60 #	11.29±2.0 +
Análises ecocardiográficas				
Área de infarto (%)	_____	54±12	_____	50±11
FE (%)	68.4±4.7	28.5±5.5 *	70.4±2.2	36.6±12.0 +, **

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n=11-16). Fração de ejeção (FE); * Diferença significativa entre o grupo SHAM versus IAM; ** Diferença significativa entre o grupo SHAMT versus IAMT (P < 0.05); # Diferença significativa entre o grupo SHAM versus SHAMT (P < 0.05); + Diferença significativa entre o grupo IAM versus IAMT (P < 0.05).

Figura 1.

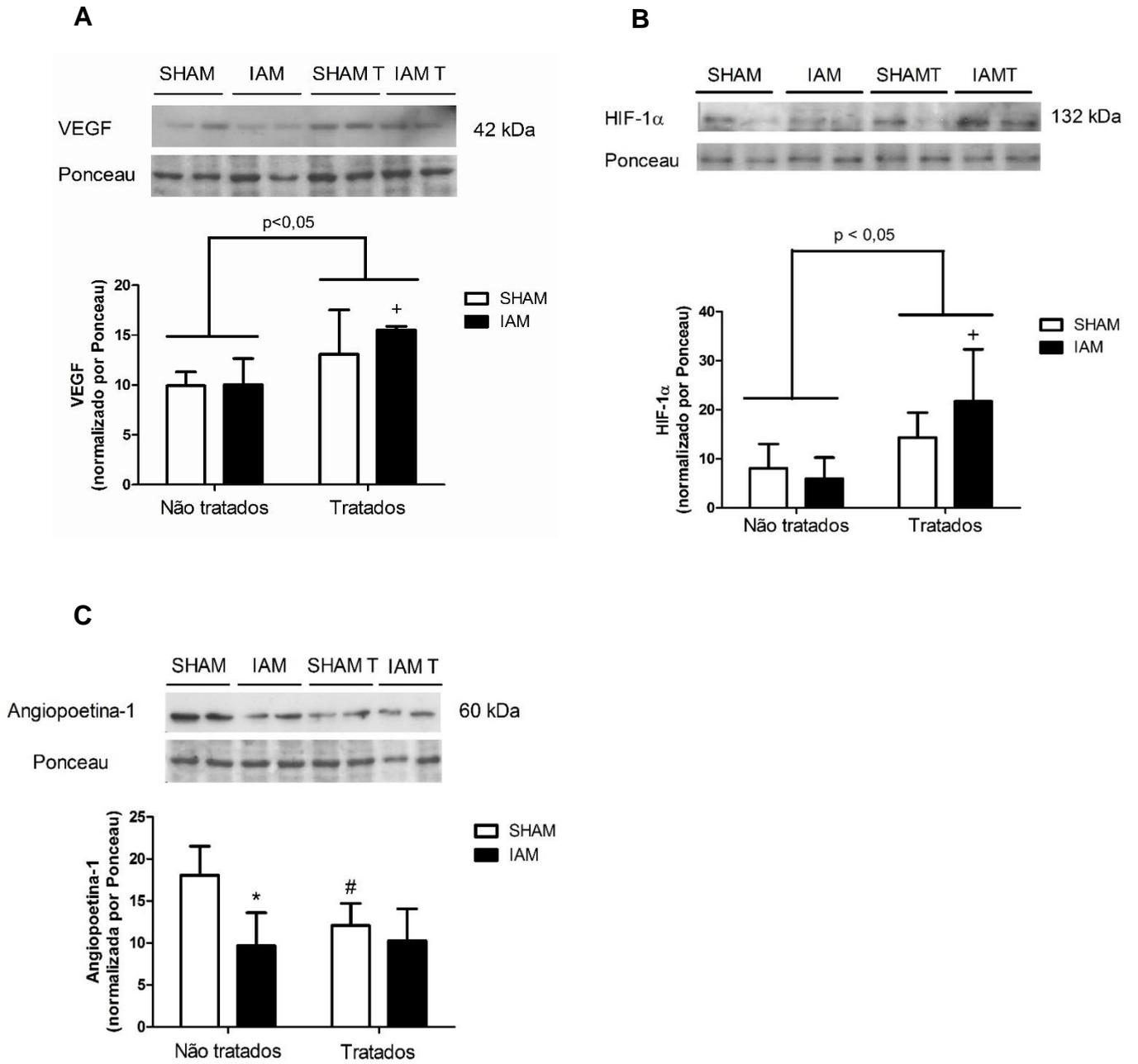


Figura 2.

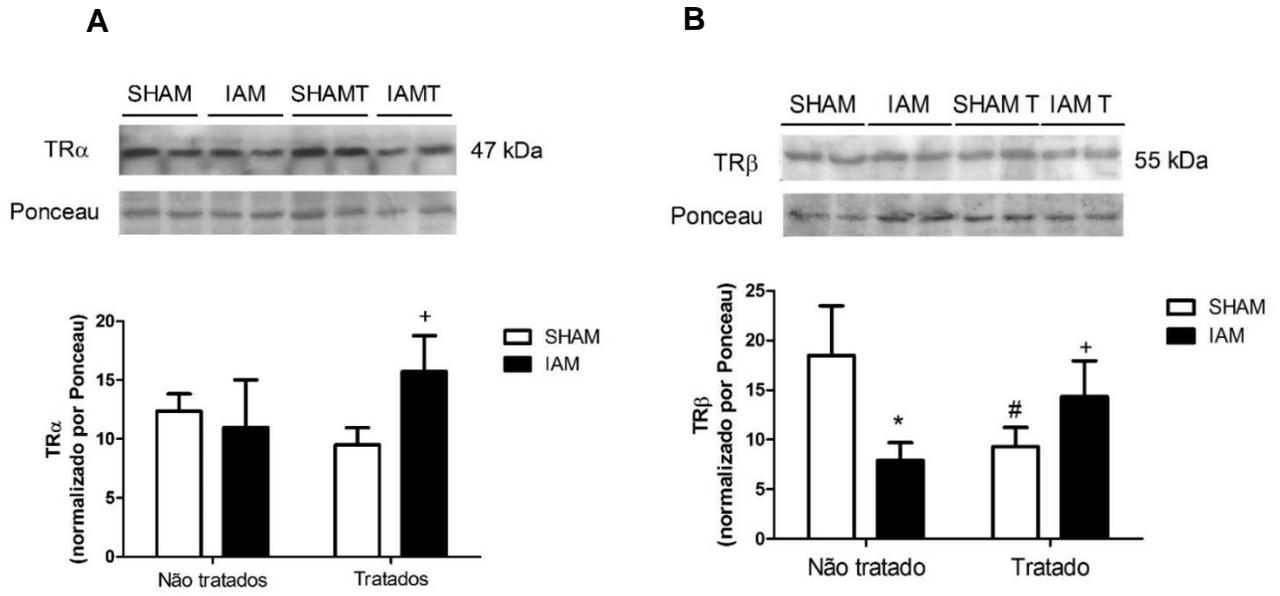


Figura 3.

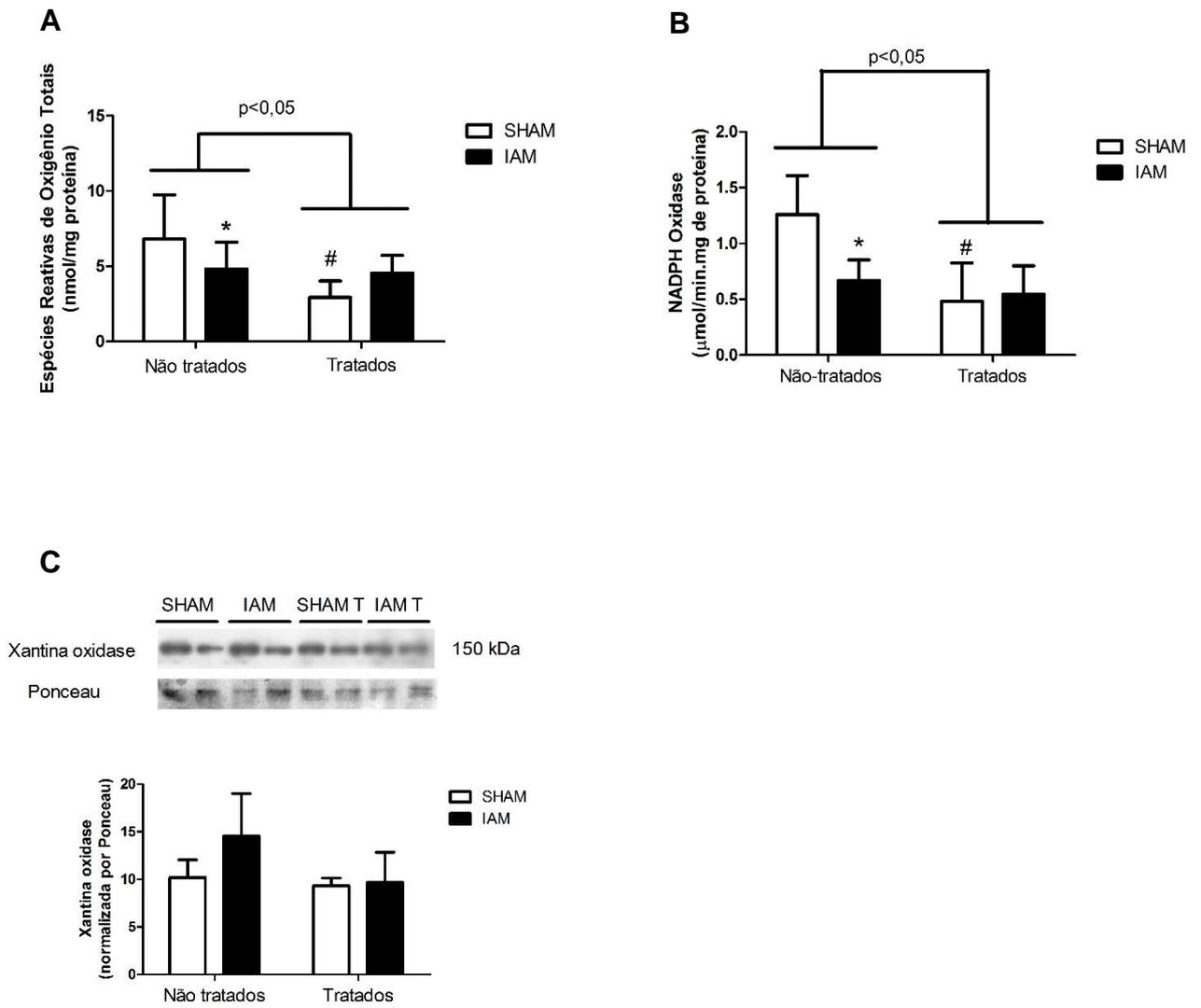
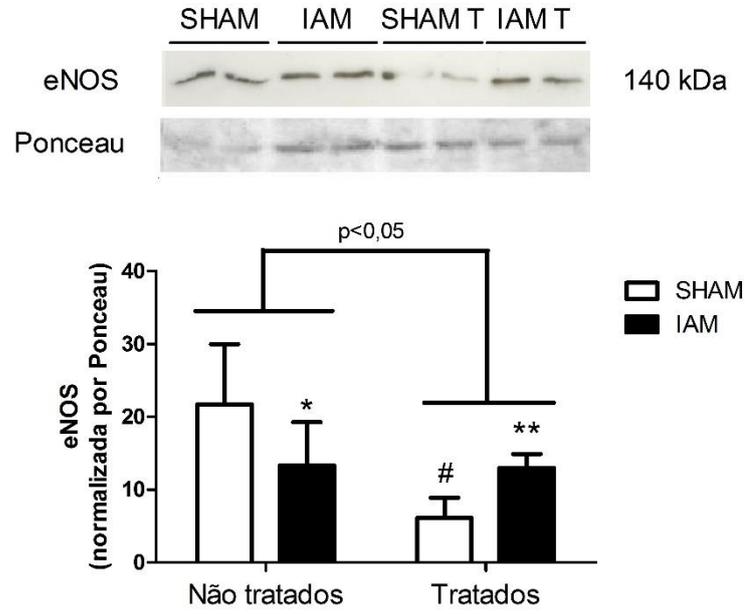


Figura 4.



Conclusões e perspectivas

A partir da análise da influência do infarto agudo do miocárdio sobre a vasculatura periférica, foi possível verificar que o infarto, por si só, foi capaz de ocasionar um quadro de hipotireoidismo tecidual na vasculatura periférica, como verificado através da análise da expressão do receptor TR β . Entretanto, o tratamento com hormônios da tireoide foi capaz de reverter esse quadro, aumentando a expressão tanto do TR β , quanto do TR α . A elevação da expressão do TR α pode estar envolvida em uma possível melhora da perfusão tecidual. Já o aumento dos níveis do TR β , no grupo infartado que recebeu o tratamento hormonal, pode estar associado ao aumento do VEGF como sugerem estudos anteriores, indicando uma maior sinalização para o processo angiogênico no tecido aórtico. A partir desse achado, pode-se sugerir que a formação de uma rede vascular a partir das ramificações vasculares da aorta talvez, posteriormente, seja capaz de favorecer o miocárdio pós-IM em termos de aporte sanguíneo. Esses dados podem reforçar demais estudos que demonstram o papel protetor dos hormônios da tireoide sobre o sistema cardiovascular.

As perspectivas desse trabalho incluem a realização de uma análise da expressão de proteínas associadas a via angiogênica desencadeada a partir da ativação do receptor integrina $\alpha v 3 \beta$ pelos hormônios da tireoide, como a PI3K, a ERK1/2 e a AKT, bem como a expressão do próprio receptor integrina. Ainda dentro dessa avaliação do mecanismo angiogênico desencadeado pelos hormônios da tireoide, seria interessante avaliar a expressão da angiopoetina-2 (Ang-2), visto que ela age sobre o controle da sinalização da angiopoetina-1 (Ang-1), através da sua ação como antagonista do receptor Tie-2. Nos vasos que estão sob efeitos do processo de angiogênese, a Ang-2 é liberada dos corpos Weibel-Palade presentes nas células endoteliais, e isso leva à diminuição da relação Ang-1/Ang-2, desencadeando a supressão da sinalização da Ang-1 e, dessa forma, permitindo o endotélio responder à desestabilização vascular e aos sinais angiogênicos (Fagiani e Christofori, 2013). Por isso, se a expressão da Ang-2 apresentar-se elevada nos grupo infartados, reforçaria o resultado deste trabalho quanto à diminuição da expressão da Ang-1 nos grupos infartados, indicando, no caso do grupo IAMT, que isso seria um mecanismo regulatório para que o VEGF pudesse atuar na formação e crescimento do vaso sanguíneo, sendo isso devido à ação antagonista da Ang-2. Além disso, se houver a

oportunidade de reproduzir o experimento novamente, desde a experimentação animal, seria interessante medir o fluxo sanguíneo na aorta por análise ecocardiográfica, para verificar o estresse da parede vascular aórtica, e avaliar a reatividade vascular, para que seja possível observar o nível de vasodilatação e vasoconstrição da aorta dos animais tratados, uma vez que a literatura retrata a ação dos hormônios da tireoide sobre a vasodilatação.

Referências gerais

1. ARAUJO A.S.R.; RIBEIRO M.F.M.; ENZVEILER A.; SCHENKEL P.; FERNANDES T.R.G.; PARTATA W.A.; IRIGOYEN M.C.; LLESUY S.; BELLO-KLEIN A. **Myocardial antioxidant enzyme activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism.** *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 249, p. 133-139, 2006.
2. ARAUJO A.S.R.; SCHENKEL P.; ENZVEILER A.T.; FERNANDES T.R.G.; PARTATA W.A.; LLESUY S.; RIBEIRO M.F.M.; KHAPER N.; SINGAL P.K.; BELLÓ-KLEIN A. **The role of redox signaling in cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism.** *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 41, p. 423–43, 2008.
3. ARAUJO A.S.R.; DINIZ G.P.; SEIBEL F.E.R., BRANCHINI G.; RIBEIRO M.F.M.; BRUMA I.S.; KHAPER N., BARRETO-CHAVES M.L.M; BELLÓ-KLEIN A. **Reactive oxygen and nitrogen species balance in the determination of thyroid hormones-induced cardiac hypertrophy mediated by renin–angiotensin system.** *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.33, p.78–84, 2011.
4. BAHNSON E. S. M.; KOO N.; CANTU-MEDELLIN N.; TSUI A. Y.; HAVELKA G. E.; VERCAMMEN J. M.; JIANG Q.; KELLEY E. E.; KIBBE M. R. **Nitric Oxide Inhibits Neointimal Hyperplasia following Vascular Injury via Differential, Cell-specific Modulation of SOD-1 in the Arterial Wall.** *Free Radical Biology and Medicine*, v. 44, p. 8–27, 2015.
5. BAINES C.P.; MOLKENTIN J.D. **Stress signaling pathway that modulate cardiac myocyte apoptosis.** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 38, p. 47–62, 2005.
6. BAUER M., GOETZ T., GLENN T., WHYBROW P.C. **The thyroid-brain interaction in thyroid disorders and mood disorders.** *Journal of Neuroendocrinology*, v. 20, p. 1101-1114, 2008.
7. BECKMAN J.S.; KOPPENOL W.H. **Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly.** *American Journal of Physiology*, v.271, p.1424–1437, 1996.
8. BERGH, J. J.; LIN H.Y.; LANSING L.; MOHAMED S.N.; DAVIS F.B.; MOUSA S.; DAVIS P.J. **Integrin $\alpha v \beta 3$ contains a cell surface receptor site for thyroid**

- hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis.** *Endocrinology*, v. 146, n. 7, p. 2864–2871, 2005.
9. BIR, S. C.; KOLLURU G. K.; FANG K.; KEVIL C. G. **Redox balance dynamically regulates vascular growth and remodeling.** *Seminars in Cell and Developmental Biology*, v. 23, n. 7, p. 745–757, 2012a.
 10. BIR, S. C.; XIONG Y.; KEVIL C.G.; LUO J. **Emerging role of PKA/eNOS pathway in therapeutic angiogenesis for ischaemic tissue diseases.** *Cardiovascular Research*, v. 95, n. 1, p. 7–18, 2012b.
 11. BOATENG, S.; SANBORN, T. **Acute myocardial infarction.** *Disease-a-Month*, v. 59, n. 3, p. 83–96, 2013.
 12. BONNEFONT-ROUSSELOT D. **The role of antioxidant micronutrients in the prevention of diabetic complications.** *Treat. Endocrinol.*, v.3, p.41–52, 2004.
 13. BRIX K.; BIEBERMANN D.F.H. **Molecules important for thyroid hormone synthesis and action - known facts and future perspectives.** *Thyroid Research*, v.4, 2011.
 14. CANTIN A.M. **Potential for antioxidant therapy of cystic fibrosis.** *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, v.10, p.531–536, 2004.
 15. de CASTRO A.L.; TAVARES A.V.; CAMPOS C.; FERNANDES R.O.; SIQUEIRA R.; CONZATTI A.; BICCA A.M.; FERNANDES T.R.G.; SARTÓRIO C.L.; SCHENKEL P.C.; BELLÓ-KLEIN A.; ARAUJO A.S.R. **Cardioprotective effects of thyroid hormones in a rat model of myocardial infarction are associated with oxidative stress reduction.** *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.391, n.1–2, p.22–29, 2014.
 16. COCHAIN, C.; CHANNON, K. M.; SILVESTRE, J.S. **Angiogenesis in the Infarcted Myocardium.** *Antioxidants & Redox Signaling*, v.18, n.9, p.1100–1113, 2013.
 17. CODY V., DAVIS P.J., DAVIS F.B. **Molecular modeling of the thyroid hormone interactions with alpha v beta 3 integrin.** *Steroids*, v.72, p.165–170, 2007.
 18. DAVIS P.J., LEONARD J.L., DAVIS F.B. **Mechanisms of non-genomic actions of thyroid hormone.** *Frontiers in Neuroendocrinology*, v.29, n.2, p.211–218, 2008.
 19. DEAN P.; JONES. **Redefining Oxidative Stress.** *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 8, p.1865–1879, 2006.
 20. DORN G.W. **The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy.** *Hypertension*, v.49, p.962–970, 2007.

21. DUSSE, L. M. S. A.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. **Revisão sobre óxido nítrico**. J. bras. patol. med. lab, v. 39, n. 4, p. 343–350, 2003.
22. EL ETER E.; RABEE, H.; ALKAYALI, A.; MOUSA S.A. **Role of thyroid hormone analogs in angiogenesis and the development of collaterals in rabbit hind limb ischemia model**. J. Thromb. Thrombolysis 5 (Suppl. 1), v.375, 2007.
23. FAGIANI, E.; CHRISTOFORI, G. **Angiopietins in angiogenesis**. Cancer Letters, v.328, n.1, p.18–26, 2013.
24. FRANCIS J.; WEISS R.M.; WEI S.G.; JOHNSON A.K.; FELDER R.B. **Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat**. American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v.281, p.1734–1745, 2001.
25. FRANKLYN J.A.; GAMMAGE M.D.; RAYMSDEN D.B.; SHEPPARD M.C. **Thyroid status in patients after acute myocardial infarction**. Clinical Science, v.67, p.585–590, 1984.
26. FRIDOVICH I. **Superoxide radical and SODs**. Annu Rev Biochem, v.64, p.97–112, 1995.
27. GANONG. **Fisiologia Médica**. 19 ed. Ed. Mcgraw-Hill, 2000.
28. GRAIS, I. M.; SOWERS, J. R. **Thyroid and the heart**. American Journal of Medicine, v. 127, n.8, p. 691–698, 2014.
29. GUYTON, A.C. Fisiologia Humana. 5ª ed., Rio de Janeiro, Ed. Interamericana, 1981.
30. HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Ed 4. Clarendon Press, Oxford, 2006.
31. HAMILTON M.A; STEVENSON L.W.; FORANOW G.C.; STEIMLE A.; GOLDHABER J.I; CHILDS J.S.; CHOPRA I.J; MORIGUCHI J.D.; HAGE A. **Safety and hemodynamic effects of intravenous triiodothyronine in advanced congestive heart failure**. American Journal of Cardiology, v.81, p.443–447, 1998
32. HEINL-GREEN A.; RADKE P.W.; MUNKONGE F.M.; FRASS O.; ZHU J.; VICENT K.; GEDDS D.M.; ALTON E.W.F.W. **The efficacy of a “master switch gene” HIF-1alpha in a porcine model of chronic myocardial ischaemia**. European heart journal, v. 26, n. 13, p. 1327–1332, 2005.
33. HU L.W.; BENVENUTI L.A.; LIBERTI E.A.; CARNEIRO-RAMOS M.S.; BARRETO-CHAVES M.L.M. **Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: influence of adrenergic nervous system versus renin-angiotensin system on myocyte**

- remodeling.** American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v.285, p.1473–1480, 2003.
34. JOHNS T.N.P., OLSON B.J. **Experimental myocardial infarction: a method of coronary occlusion in small animals.** Annals of Surgery, v.140, p.675-682, 1954.
35. KAHALY, G. J.; DILLMANN, W. H. **Thyroid hormone action in the heart.** Endocrine Reviews, v. 26, n. 5, p. 704–728, 2005.
36. KIDO, M.; DU L.; SULLIVAN C.C.; LI X.; DEUTSCH R.; JAMIESON S.W.; THISTLETHWAITE P.A. **Hypoxia-inducible factor 1-alpha reduces infarction and attenuates progression of cardiac dysfunction after myocardial infarction in the mouse.** Journal of the American College of Cardiology, v. 46, n. 11, p. 2116–2124, 2005.
37. KLEIN D.; KERN R.M.; SOKOL R.Z. **A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes.** Molecular and Cellular Biochemistry, v.36, p.59-66, 1995.
38. KLEIN I.; OJAMAA K. **Thyroid hormone and the cardiovascular system.** The New England Journal of Medicine, v.344, n.7, p.5011–5019, 2001.
39. KOHRLE J. **The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action.** Cellular and Molecular Life Sciences, v.57, p.1853-1863, 2000.
40. KONIOR, A.; SCHRAMM A.; CZESNIKIEWICZ-GUZIK M.; GUZIK T. J. **NADPH oxidases in vascular pathology.** Antioxidants & redox signaling, v. 20, n. 17, p. 2794–2814, 2014.
41. LAEMMLI U.K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature 227, 680-685. 1970.
42. LEBEL C.P., ISCHIROPOULOS H., BONDY S.C. **Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress.** Chemical Research and Toxicology, v.5, p.227-231, 1992.
43. LIBBY P.; BONOW R.O.; MANN D.L.; ZIPES D.P. **Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine.** Ed 8. Saunders Elsevier, 2007.
44. LIN H.Y.; SUN M.; TANG H.Y.; LIN C.; LUIDENS M.K.; MOUSA S.A.; INCERPO S.; DRUSANO G.L.; DAVIS F.B.; DAVIS P.J. **L-Thyroxine vs. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase.** American Journal Physiology-Cell Physiology, v.296, p.980–991, 2009.

45. LOWRY O.H., ROSEBROUGH A.L., FARR A.L., RANDALL R. **Protein measurement with the folin phenol reagent.** The Journal of Biological Chemistry, v.193, p.265–275, 1951.
46. LUIDENS M.K.; MOUSA S.A.; DAVIS F.B.; LIN H.Y.; DAVIS P.J. **Thyroid hormone and angiogenesis.** Vascular Pharmacology, v.52, p.142–145, 2010.
47. MAKINO A., SUAREZ J., WANG H., BELKE D.D., SCOTT B.T., DILLMANN W.H. **Thyroid hormone receptor-beta is associated with coronary angiogenesis during pathological cardiac hypertrophy.** Endocrinology, v.150, p.2008–2015, 2009.
48. MANEA, A. **NADPH oxidase-derived reactive oxygen species: Involvement in vascular physiology and pathology.** Cell and Tissue Research, v. 342, n. 3, p. 325–339, 2010.
49. MAULIK, N. **Angiogenic signal during cardiac repair.** Molecular and Cellular Biochemistry, v. 264, n. 1-2, p. 13–23, 2004.
50. MERCIER J.C., DISESSA T.G., JARMAKANI J.M., NAKANISHI T., HIRAISHI S., ISABEL-JONES J., FRIEDMAN W.F. **Two-dimensional echocardiographic assessment of left ventricular volumes and ejection fraction in children.** Circulation, v.65, p.962-969, 1982.
51. MOELLER L.C.; DUMITRESCU A.M.; REFETOFF S. **Cytosolic action of thyroid hormone leads to induction of hypoxia-inducible factor-1alpha and glycolytic genes.** Molecular Endocrinology, v.19, n.12, p.2955–2963, 2005.
52. MOUSA S.A; O'CONNOR L.; DAVIS F.B.; DAVIS P.J. **Proangiogenesis Action of the Thyroid Hormone Analog 3,5-Diiodothyropropionic Acid (DITPA) Is Initiated at the Cell Surface and Is Integrin Mediated.** Endocrinology, v.147, n.4, p.1602–1607, 2006.
53. NOZAWA E., KANASHIRO R., MURAD N., CARVALHO A.C.C., CRAVO S.L., CAMPOS O., TUCCI P.J.F., MOISES V.A. **Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.39, p.687-695, 2006.
54. PANTOS C.; MALLIOPOULOU V.; MOUROUZIS I.; PAIZIS I.; TZEIS S.; MORAITIS P.; SFAKIANOUDIS K.; VARONOS D.; COKKINOS D. V. **Dronedarone administration prevents body weight gain and increases**

- tolerance of the heart to ischaemic stress: possible involvement of thyroid hormone receptor $\alpha 1$.** *Thyroid*, v.15, n.1, p.16–23, 2005b.
55. PANTOS C.; MALLIOPOULOU V.; MOUROUZIS I.; SFAKIANOUDIS K.; TZEIS S.; DOUMBA P.; XINARIS C.; COKKINOS D.; CARAGEORGIU H.; VARONOS D.; COKKINOS D. V. **Propylthiouracil induced hypothyroidism is associated with increased tolerance of the isolated rat heart to ischaemia-reperfusion.** *Journal of Endocrinology*, v.178, n.3, p.427–435, 2003.
56. PANTOS C.; MOUROUZIS I.; GALANOPOULOS G.; GAVRA M.; PERIMENIS P.; SPANOU D.; COKKINOS D.V. **Thyroid hormone receptor $\alpha 1$ down-regulation in postischemic heart failure progression: the potential role of tissue hypothyroidism.** *Hormone and Metabolic Research*, v.42, p.718 – 724, 2010.
57. PANTOS C.; MOUROUZIS I.; MARKAKIS K.; DIMOPOULOS A.; XINARIS C.; KOKKINOS A.D.; PANAGIOTOU M.; COKKINOS D.V. **Thyroid hormone attenuates cardiac remodeling and improves hemodynamics early after acute myocardial infarction in rats.** *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, v.32, p.333–339, 2007.
58. PANTOS C.; MOUROUZIS I.; MARKAKIS K.; TSAGOULIS N.; PANAGIOTOU M.; COKKINO D.V. **Long-term thyroid hormone administration reshapes left ventricular chamber and improves cardiac function after myocardial infarction in rats.** *Basic Research in Cardiology*, v.103, p.308-318, 2008.
59. PANTOS C.; MOUROUZIS I.; SARANTEAS T.; PAIZIS I.; XINARIS C.; MALLIOPOULOU V.; COKKINOS D. **Thyroid hormone receptors $\alpha 1$ and $\beta 1$ are downregulated in the post-infarcted rat heart: consequences on the response to ischaemia-reperfusion.** *Basic Research Cardiology*, v.100, p.422 – 432, 2005a.
60. SALEMI V.M., PIRES M.D., CESTARI I.N., CESTARI I.A., PICARD M.H., LEIRNER A.A., MADY C. **Echocardiographic assessment of global ventricular function using the myocardial performance index in rats with hypertrophy.** *Artificial Organs*, v.28, p.332-337, 2008.
61. SARTÓRIO C.L.; FRACCAROLLO D.; GALUPPO P.; LEUTKE M.; ERTL G.; STEFANON I.; BAUERSACHS J. **Mineralocorticoid Receptor Blockade Improves Vasomotor Dysfunction and Vascular Oxidative Stress Early After Myocardial Infarction.** *Hypertension*, v. 50, p.919–925, 2007.

62. SCHENKEL P.C., TAVARES A., FERNANDES R., DINIZ G.P., BERTAGNOLLI M., ARAUJO A.S.R., BARRETO-CHAVES M.L., RIBEIRO M.F.M, CLAUSELL N., BELLO-KLEIN A. **Redox-sensitive prosurvival and proapoptotic protein expression in the myocardial remodeling post-infarction in rats.** *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.341, p.1-8, 2010.
63. SHYU K.G.; WANG M.T.; WANG B.W.; CHANG C.C.; LEU J.G.; KUAN P.; CHANG H. **Intramyocardial injection of naked DNA encoding HIF-1 α /VP16 hybrid to enhance angiogenesis in an acute myocardial infarction model in the rat.** *Cardiovascular Research*. v.54, p.576–583, 2002.
64. SIES H. **Oxidative Stress.** Oxidants and Antioxidants. Academic Press, New York, 1991.
65. SINGAL P.K.; KHAPER N.; BELLO-KLEIN A.; BHAYANA M. **Oxidative stress status in the transition of hypertrophy to heart failure.** *Heart Failure Reviews*, v.4, p.353–360, 1999
66. SMIRNOFF N. **L-ascorbic acid biosynthesis.** *Vitam Horm*, v.61, p. 241–266, 2001.
67. SPOONER P. H.; THAI H.M.; GOLDMAN S.; GABALLA M.A. **Thyroid hormone analog, DITPA, improves endothelial nitric oxide and beta-adrenergic mediated vasorelaxation after myocardial infarction.** *Journal of cardiovascular pharmacology*, v. 44, n. 4, p. 453–459, 2004.
68. STOCKER R., KEANEY J.F. **Role of oxidative modifications in atherosclerosis.** *Physiological Reviews*, v. 84, p.1381–1478, 2004.
69. SUAREZ J.; WANG H.; SCOTT B. T.; LING H.; MAKINO A.; SWANSON E.; BROWN J.H.; SUAREZ J.A.; FEINSTEIN S.; DIAZ-JUAREZ J.; DILLMANN W.H. **In vivo selective expression of thyroid hormone receptor α 1 in endothelial cells attenuates myocardial injury in experimental myocardial infarction in mice.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v.307, p.340–346, 2014.
70. SYMONS M.C.R. **Radicals generated by bone cutting and fracture.** *Free Radical Biology and Medicine*, v.20, p.831–835, 1996.
71. TAIMEH Z.; LOUGHRAN J.; BIRKS E. J.; BOLLI R. **Vascular endothelial growth factor and angiogenesis in heart failure.** *Nature Reviews Cardiology*, v.10, p.519–530, 2013.
72. TOMANEK R. J.; ZIMMERMAN M.B.; SUVARNA P.R.; MORKIN E.; PENNOCK G.D.; GOLDMAN S. **A thyroid hormone analog stimulates angiogenesis in the**

- post-infarcted rat heart.** Journal of molecular and cellular cardiology, v. 30, n. 5, p. 923–932, 1998.
73. TOMANEK, R. J.; BUSCH, T. L. **Coordinated capillary and myocardial growth in response to thyroxine treatment.** Anatomical Record, v. 251, n. 1, p. 44–49, 1998.
74. TSUITSUI H. **Oxidative stress in heart failure: the role of mitochondria.** Intern Med; 40: 1177-82, 2001.
75. VAN REMMEN H.; IKENO Y.; HAMILTON M.; PAHLAVANI M.; WOLF N.; THORPE S.R.; ALDERSON N.L.; BAYNES J.W.; EPSTEIN C.J.; HUANG T.T. **Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging.** Physiological Genomics, v.16, p.29–37, 2003.
76. VINA J., LLORET A., ORTI R., ALONSO D. **Molecular bases of the treatment of Alzheimer's disease with antioxidants: prevention of oxidative stress.** Molecular Aspects of Medicine, v.25, p.117–123, 2004.
77. WANG X.; ZHENG W.; CHRISTENSEN L.P.; TOMANEK R.J. **DITPA stimulates bFGF, VEGF, angiopoietin, and Tie-2 and facilitates coronary arteriolar growth.** American journal of physiology. Heart and circulatory physiology, v. 284, n. 2, p.613–618, 2003.
78. WEI Y.; SOWERS J.R.; NISTALA R.; GONG H.; UPTERGROVE G.M.; CLARK S.E.; MORRIS E.M.; SZARY N.; MANRIQUE C.; STUMP C. **Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells.** Journal of Biological Chemistry, v.281, p.35137-35146, 2006.
79. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The Global Burden of Disease: 2004 update.** v. 2010, p. 146, 2008
80. YEN P.M.; ANDO S., FENG X.; LIU Y., MARUVADA P.; XIA X. **Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels.** Molecular and Cellular Endocrinology, v. 246, n.1-2, p.121–127, 2006.
81. ZHENG W.; WEISS R.M.; WANG X.; ZHOU R.; ARLEN A.M.; LEI L.; LAZARTIGUES E.; TOMANEK R.J. **DITPA stimulates arteriolar growth and modifies myocardial postinfarction remodeling.** American journal of physiology Heart and circulatory physiology, v. 286, n. 5, p.1994–2000, 2004.

Anexo

- Regras da revista "*Brazilian Journal of Medical and Biological Research*";



Preparation of Research Manuscripts

The Brazilian Journal of Medical and Biological Research publishes original research articles of outstanding scientific significance. We will consider manuscripts of any length; we encourage the submission of both substantial full-length bodies of work and shorter manuscripts that report novel findings that might be based on a limited number of experiments. The key criteria are that the research demonstrates clearly its novelty, its importance to a particular field as well as its interest to those outside that discipline, and conclusions that are justified by the data.

Authorship requirements

Only those persons who contributed directly to the intellectual content of the paper should be listed as authors. Authors should meet all of the following criteria, thereby allowing persons named as authors to take public responsibility for the content of the paper.

- Conceived, planned and carried out the experiments that led to the paper or interpreted the data it presents, or both.
- Wrote the paper, or reviewed successive versions.
- Approved the final version.
- Holding positions of administrative leadership, contributing patients, and collecting and assembling data, however important to the research, are not by themselves criteria for authorship. Other persons who have made substantial, direct contributions to the work but cannot be considered authors should be cited in the acknowledgment section, with their permission, and a description of their specific contributions to the research should be given.

Text format

The text of a manuscript can only be accepted as a Microsoft Word file as a "doc".

- Each page should contain the page number in the upper right-hand corner starting with the title page as page 1.
- Report all measurements in Système International, SI (<http://physics.nist.gov/cuu/Units>) and standard units where applicable (see below).
- Do not use abbreviations in the title or abstract and limit their use in the text.
- The length of the manuscript and the number of tables and figures must be kept to a minimum.
- Ensure that all references are cited in the text.
- Generic names must be used for all drugs. Instruments may be referred to by proprietary name; the name and country or electronic address of the manufacturer should be given in parentheses in the text.

Guidance on grammar, punctuation, and scientific writing can be found in the following sources: Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers. 7th edn. Rockefeller University Press, Reston, 2006; Medical Style and Format. Huth EJ (Editor). ISI Press, Philadelphia, 1987, Marketed by Williams & Wilkins, Baltimore, MD. The Brazilian Journal of Medical and Biological Research follows the reference format of the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, which can be found on the website of the National Library of Medicine (<http://www.icmje.org/>).

Footnotes

Text footnotes, if unavoidable, should be numbered consecutively in superscript in the manuscript and written on a separate page following the abstract.

Headings in text

- Position all headings flush with the left margin.
- Keep headings short (three or four words).
- Use only three types of headings in the text. Clearly indicate the type of level of headings by using the following typographic conventions.
 - First-level: Only the 1st letter of the 1st word is capitalized, font size 11, **bold type**.
 - Second-level: Only the 1st letter of the 1st word is capitalized, font size 9, **bold type**.
 - Third-level: Only the 1st letter of the 1st word is capitalized, *italic type*

Abbreviations

Abbreviations should be kept to a minimum. Define all abbreviations upon first use in the text. Non-standard abbreviations should not be used unless they appear at least three times in the text.

- Explain all abbreviations in the text, figure and table legends when they first appear. Keep the number of abbreviations to a minimum.
- Do not explain abbreviations for units of measurement [3 mL, not 3 milliliters (mL)] or standard scientific symbols [Na, not sodium (Na)].
- Abbreviate long names of chemical substances and terms for therapeutic combinations. Abbreviate names of tests and procedures that are better known by their abbreviations than by the full name (VDRL test, SMA-12).
- Use abbreviations in figures and tables to save space, but they must be defined in the legend.

Nomenclature

The use of standardized nomenclature in all fields of science and medicine is an essential step toward the integration and linking of scientific information reported in published literature. We will enforce the use of correct and established nomenclature wherever possible:

We strongly encourage the use of SI units. If you do not use these exclusively, please provide the SI value in parentheses after each value. Examples:

- s for second
- min for minute
- h for hour
- L for liter
- m for meter
- kDa for mass in kilodaltons
- 5 mM rather than 5×10^{-3} M or 0.005 M

Species names should be italicized (e.g., *Homo sapiens*).

Genes, mutations, genotypes, and alleles should be indicated in italics. Use the recommended name by consulting the appropriate genetic nomenclature database, e.g., HUGO for human genes. It is sometimes advisable to indicate the synonyms for the gene the first time it appears in the text.

Subject sections (and subsections)

Eight to nine issues per year of the Brazilian Journal are organized into sections of **Biosciences** and authors should specify in the cover letter the specific section in which they prefer to publish their paper.

- Biochemistry and Molecular Biology
- Cell Biology
- Experimental Biology
- Immunology
- Neurosciences and Behavior

- Pharmacology
- Physiology and Biophysics

Three to four issues per year are dedicated to **Clinical Investigation** and authors should specify in the cover letter the specific section in which they prefer to publish their paper.

- Analytical, diagnostic and therapeutic techniques and instruments
- Blood, immunology and organ transplantation
- Cardiovascular, respiratory and sport medicine
- Digestive system
- Endocrine diseases, nutrition and metabolism
- Environmental factors of diseases
- Health care and community medicine
- Infectious agents and diseases
- Kidney and extracellular environment
- Neonatal medicine, growth and development
- Oncology
- Psychological processes, behavior and mental diseases
- Reproductive medicine
- Skeletal, muscle and nervous systems
- Skin and connective tissue diseases
- Surgical procedures, anesthesia and analgesia

Full-length paper

Each manuscript should clearly state its objective or hypothesis; the experimental design and methods used (including the study setting and time period, patients or participants with inclusion and exclusion criteria, or data sources and how these were selected for the study); the essential features of any interventions; the main outcome measures; the main results of the study, and a section placing the results in the context of published literature.

The manuscript should contain:

- abstract of no more than 250 words
- no more than 6 key words
- a running title to be used as a page heading, which should not exceed 60 letters and spaces
- the text should be divided into separate sections (Introduction, Material and Methods, Results, Discussion), without a separate section for conclusions
- no more than 40 references (without exceptions)

Organization of the Manuscript

Title Page

Title

The title should be as short and informative as possible, should not contain non-standard acronyms or abbreviations, and should not exceed two printed lines.

Example: **Single-step purification of crotapotin and crotactine from *Crotalus durissus terrificus* venom using preparative isoelectric focusing**

Please also provide a brief "running title" of approximately 60 characters.

Example: **Purification of crotapotin and crotactine**

Authors and Affiliations

Initials and last name(s) of author(s) (matched with superscript numbers identifying institutions). Institution(s) (Department, Faculty, University, city, state, country) of each author (in Portuguese if authors are from Brazil).

Example: **A.S. Aguiar¹, A.R. Melgarejo¹, C.R. Alves² and S. Giovanni-De-Simone^{2,3}**

¹Divisão de Animais Peçonhentos, Instituto Vital Brazil, Niterói, RJ, Brasil

²Laboratório de Microsequenciamento de Proteínas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

³Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil

One of the authors should be designated as the corresponding author. It is the corresponding author's responsibility to ensure that the author list, and the summary of the author contributions to the study are accurate and complete. If the article has been submitted on behalf of a consortium, all consortium members and affiliations should be listed after the Acknowledgments.

Corresponding author: Name, complete mailing address, including zip code, telephone number, Fax number and E-mail of author to whom correspondence should be sent.

Acknowledgment of research grants and fellowships (agency and grant number).

Key Words

A list of key words or indexing terms (no more than 6) should be included. A capital letter should be used for the first letter of each key word, separated by a semicolon. The Journal recommends the use of medical subject headings of Index Medicus for key words to avoid the use of several synonyms as entry terms in the index for different papers on the same subject. Remember, key words are used by the Scielo Database (see [http://www.scielo.br/bjnbr;articles search/subject](http://www.scielo.br/bjnbr;articles%20search/subject)) to index published articles.

Running title

This short title, to be used as a page heading, should not exceed 60 letters and spaces.

Abstract

Since abstracts are published separately by Information Services, they should contain sufficient hard data, to be appreciated by the reader. The Brazilian Journal publishes unstructured abstracts.

The abstract should briefly and clearly present the problem, experimental approach, new results as quantitative data if possible, and conclusions. It should mention the techniques used without going into methodological detail and mention the most important results.

Abbreviations should be kept to a minimum and should be defined in both the Abstract and text.

Please do not include any reference citations in the abstract. If the use of a reference is unavoidable, the full citation should be given within the abstract.

The abstract should not exceed 250 words and should be written as a single paragraph double-spaced on a separate page following the title page.

Please see <http://www.bjournal.com.br/writing_a_good_abstract.html> for suggestions on writing a good abstract

Introduction

The Introduction should put the focus of the manuscript into a broader context. As you compose the introduction, think of readers who are not experts in this field. This should state the purpose of the investigation and justification for undertaking the research and relationship to other work in the field. An extensive listing or review of the literature should not be used. If there are relevant controversies or disagreements in the field, they should be mentioned so that a non-expert reader can delve into these issues further. The Introduction should conclude with a brief statement of the overall aim of the experiments and a comment about what was achieved.

Material and Methods

Sufficient information should be provided in the text or by referring to papers in generally available journals to permit the work to be repeated.

This section should provide enough detail for reproduction of the findings. Protocols for new methods should be included, but well-established protocols may simply be referenced. We encourage authors to submit, as separate

files, detailed protocols for newer or less well-established methods. These will be linked to the article and will be fully accessible.

Results

The results should be presented clearly and concisely. Tables and figures should be used only when necessary for effective comprehension of the data. In some situations, it may be desirable to combine Results and Discussion into a single section. The Results section should provide results of all of the experiments that are required to support the conclusions of the paper. There is no specific word limit for this section, but a description of experiments that are peripheral to the main message of the article and that detract from the focus of the article should not be included. The section may be divided into subsections, each with a concise subheading. Large datasets, including raw data, should be submitted as supplemental files; these are published online alongside the accepted article. The Results section should be written in past tense.

Discussion

The purpose of the Discussion is to identify new and relevant results and relate them to existing knowledge. Information given elsewhere in the text, especially in Results, may be cited but all of the results should not be repeated in detail in the Discussion. The Discussion should spell out the major conclusions and interpretations of the work including some explanation of the significance of these conclusions. How do the conclusions affect the existing assumptions and models in the field? How can future research build on these observations? What are the key experiments that must be done? The Discussion should be concise and tightly argued. If warranted, the Results and Discussion may be combined into one section.

Acknowledgments

When appropriate, briefly acknowledge technical assistance, advice and contributions from colleagues. People who contributed to the work, but do not fit the criteria for authors should be listed in the Acknowledgments, along with their contributions. Donations of animals, cells, or reagents should also be acknowledged. You must also ensure that anyone named in the Acknowledgments agrees to being so named. Financial support for the research and fellowships should be acknowledged on the title page.

Figures

Figures must be submitted in high-resolution version (600 dpi). Please ensure that the files conform to our Guidelines for Figure Preparation when preparing your figures for production.

Preparing figure files for submission

Brazilian Journal of Medical and Biological Research encourages authors to use figures where this will increase the clarity of an article. The use of color figures in articles is free of charge. The following guidelines must be observed when preparing figures. Failure to do so is likely to delay acceptance and publication of the article.

- Each figure of a manuscript should be submitted as a single file.
- Tables should NOT be submitted as figures but should be provided as separate files in Word (.doc).
- Figures should be numbered in the order they are first mentioned in the text, and uploaded in this order.
- Figure titles and legends should be provided in the main manuscript, not in the graphic file.
- The aim of the figure legend should be to describe the key messages of the figure, but the figure should also be discussed in the text. An enlarged version of the figure and its full legend will often be viewed in a separate window online, and it should be possible for a reader to understand the figure without moving back and forth between this window and the relevant parts of the text. Each legend should have a concise title of no more than 15 words. The legend itself should be succinct, while still explaining all symbols and abbreviations. Avoid lengthy descriptions of methods.
- Each figure should be closely cropped to minimize the amount of white space surrounding the illustration. Cropping figures improves accuracy when placing the figure in combination with other elements, when the accepted manuscript is prepared for publication on our site. For more information on individual figure file formats, see Guidelines for figures.
- Individual figure files should not exceed 5 MB. If a suitable format is chosen, this file size is adequate for extremely high quality figures.

- Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures (or tables) that have previously been published elsewhere. In order for all figures to be open-access, authors must have permission from the rights holder if they wish to include images that have been published elsewhere in non-open-access journals. Permission should be indicated in the figure legend, and the original source included in the reference list.

Tables

- Tables must be submitted in word (.doc) or Excel (.xls).
- Tables must be numbered consecutively with Arabic numerals in the text.
- Tables must have a concise and descriptive title.
- All explanatory information should be given in a footnote below the table. Footnotes should be used to explain abbreviations and provide statistical information.
- All abbreviations must be defined in this footnote, even if they are explained in the text.
- Tables must be understandable without referring to the text.
- Each table should be submitted in a separate file. They should be uploaded after the manuscript file, in numerical order. Tables occupying more than one printed page should be avoided, if possible.
- Vertical and diagonal lines should not be used in tables; instead, indentation and vertical or horizontal space should be used to group data.
- Adapting/Reproducing Tables and Relevant Permissions. Acknowledgments of original sources of copied material should be given as a reference in the table footnote.
- Tables in Excel must be cell-based; do not use picture elements, text boxes, tabs, or returns in tables.

References

Only published or accepted manuscripts should be included in the reference list. Meeting abstracts, conference talks, or papers that have been submitted but not yet accepted should not be cited. Limited citation of unpublished work should be included in the body of the text only. All personal communications should be supported by a letter from the relevant authors. Authors are responsible for the accuracy and completeness of their references and for correct text citation. When possible, references which are easily available in English should be cited.

The BJMBR uses the numbered citation (citation-sequence) method. References are listed and numbered in the order that they appear in the text. In the text, citations should be indicated by the reference number in parentheses. Multiple citations within a single set of parentheses should be separated by commas without a space (1,5,7) . Where there are more than three sequential citations, they should be given as a range. Example: "...has been shown previously (4–9)." Make sure the parts of the manuscript are in the correct order before numbering the citations.

Because all references will be linked electronically as much as possible to the papers they cite, proper formatting of the references is crucial. For all references, list the first 6 authors followed by et al., Title, Journal (abbreviation), Year, Volume, Complete Pages,

The Brazilian Journal of Medical and Biological Research follows the reference format of the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, which can be found on the website of the National Library of Medicine (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html). Use the Medline journal abbreviations and follow the reference style shown on the Website noted above, with several exceptions. See below for details. If the author uses the program "Reference Manager", copy the file containing the style of the Brazilian Journal of Medical and Biological Research and place it in the folder of "Styles". When submitting the manuscript, send the file produced in Reference Manager (".rmd" and ".rmx") as an attachment. Please use the following style for the reference list:

Published Papers. First 6 authors followed by et al., Title, Journal (abbreviation in italics), Year, Volume, Complete Pages.

Lammers AE, Hislop AA, Flynn Y, Haworth SG. The 6-minute walk test: normal values for children of 4-11 years of age. *Arch Dis Child* 2008; 93: 464-468.

Zhang Q, Malik P, Pandey D, Gupta S, Jagnandan D, Belin de CE, et al. Paradoxical activation of endothelial nitric oxide synthase by NADPH oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 1627-1633.

National Heart Lung and Blood Institute. Global Initiative for Asthma (GINA). *Global strategy for asthma management and prevention: NHLBI/WHO Workshop Report*. Bethesda: National Institute of Health. National Heart, Lung and Blood Institute publication No. 02-3659; 2006.

Article accepted for publication but not yet published. First 6 authors followed by et al., Title, Journal (abbreviation), Year of expected publication, (in press) at the end of the citation.

Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, Brandes RP, Santos CXC, et al. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2005 (in press).

Electronic Journal Articles (Online Journals). Ensure that URLs are active and available.

American Academy of Ophthalmology. Diabetic retinopathy disease severity scale. *Am Acad Ophthalmol* http://www.aao.org/education/library/recommendations/international_dr.cfm; 2005. Accessed 11 August 2006.

Simon JA, Hudes ES. Relationship of ascorbic acid to blood lead levels. *JAMA* <http://jama.ama-assn.org/cgi/content/abstract/281/24/2289>; 1999. Accessed 11 August 2006.

Internet Communication. Ensure that URLs are active and available.

Brasil. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade: pesquisa da população brasileira. <http://www.abeso.org.br>. Accessed February 22, 2008.

Information behaviour of the researcher of the future, CIBER Report. <http://www.bl.uk/news/2008/pressrelease20080116.html>.

CAPES Statistics. <http://www.capes.gov.br/capes/portal>. Accessed March 16, 2006.

CNPq Plataforma Lattes, "Investimentos do CNPq em CT&I". <http://fomentonacional.cnpq.br/dmfomento/home/index.jsp>. Accessed March 16, 2006.

Audiovisual Material

Physician's Desk Reference (PDR). Release 2003.1AX. [CD-ROM]. Montvale: Thomson PDR; 2003.

Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AH, et al. *Epi info, version 6.04: a word processing database and statistics program for public health on IBM-compatible microcomputers*. [Computer program]. Atlanta: Centers of Disease Control and Prevention; 1998.

Computer Program

Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). Version 12.0. [Computer program]. Chicago: SPSS Inc.; 2006.

Patent

Larsen CE, Trip R, Johnson CR. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. Patent No. 5.529.067. Novoste Corporation; 1995.

Book, Whole. Authors, Book title, Edition, City, Publisher, Year.

American College of Sports Medicine. *Diretrizes do ACSM para os testes de esforço e sua prescrição*. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan; 2007.

Book, Chapter. Authors, Chapter Title, Editors, Book title, Edition, City, Publisher, Year, Pages of citation.

Kronfol A. Behavioral effects of cytokines: a psychiatrist's perspective. In: Plotnikoff NP, Faith RE, Murgu AJ, Good RA (Editors), *Cytokines stress and immunity*. London: CRC Press; 2007. p 1-16.

Kintzios SE. What do we know about cancer and its therapy? In: Kintzios SE, Barberaki MG (Editors), *Plants that fight cancer*. New York: CRC Press; 2004. p 1-14.

Report

WHO (World Health Organization), IPCS (International Program in Chemical Safety). *Environmental health criteria: 118 Inorganic mercury*. Geneva: World Health Organization; 1991.

National Commission on Sleep Disorders Research. *Wake up America: a national sleep alert*. Washington: Government Printing Office; 1993.

Thesis

Joselevitch C. Visão no ultravioleta em *Carassius auratus* (Ostariophysi, Cypriformes, Cyprinidae): estudo eletrofisiológico do sistema cone - células horizontais. [Master's thesis]. São Paulo: Instituto de Psicologia, USP; 1999.

Conference, Symposium Proceedings. Cite papers only from published proceedings.

Hejzlar RM, Diogo PA. The use of water quality modelling for optimising operation of a drinking water reservoir. *Proceedings of the International Conference Fluid Mechanics and Hydrology*. 1999 Jun 23-26; Prague. Prague: Institute of Hydrodynamics AS CR; 1999. p 475-482.

"Unpublished results", "Personal communication" and "Submitted papers". Reference should appear in the text with the individual name(s) and initials and not in the reference list.

(Santos CS, da-Silva GB, Martins LT, unpublished results).

It is assumed that the author has obtained permission from the source when "personal communication" is cited.

Abstract. First 6 authors followed by et al., Title, Journal (abbreviation), Year, Volume, Complete Pages (Abstract). Lima SM, Bonci DM, Grotzner SR, Ribeiro CA, Ventura DF. Loss of amacrine cells in MeHg-treated retinae in a tropical fish. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: E-5172 (Abstract).