

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**HIPERTROFIA CARDÍACA INDUZIDA PELO HIPERTIREOIDISMO
EXPERIMENTAL: PAPEL DO ESTADO REDOX SOBRE PROTEÍNAS
ENVOLVIDAS EM VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR PARA
CRESCIMENTO, SOBREVIVÊNCIA E MORTE CELULAR**

Rafael Oliveira Fernandes

Orientadora: Prof^a Dra Adriane Belló-Klein

Porto Alegre, março de 2010.

Rafael Oliveira Fernandes

**HIPERTROFIA CARDÍACA INDUZIDA PELO HIPERTIREOIDISMO EXPERIMENTAL:
PAPEL DO ESTADO REDOX SOBRE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS EM VIAS DE
SINALIZAÇÃO INTRACELULAR PARA CRESCIMENTO, SOBREVIVÊNCIA E
MORTE CELULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia – do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para a obtenção do Título de Mestre em Fisiologia.

Área de concentração:

Fisiologia Cardiovascular

Orientadora:

Prof^a Dra Adriane Belló-Klein

Porto Alegre, março de 2010.

II

Agradecimentos

Gostaria de agradecer em especial aos ratinhos que fizeram esse trabalho existir.

Aos meus pais, Nelson Pintos Fernandes e Liliane Oliveira Fernandes, e à minha irmã Sabrina, pelo amor, carinho e apoio.

À minha orientadora Adriane Belló Klein que confiou no meu trabalho, e que para mim, além de considerá-la uma “mãezona”, é um exemplo de dedicação, ética e profissionalismo.

Ao Paulo Cavalheiro Schenkel pela amizade que construímos, pela pessoa que és, e pela ajuda incondicional.

À Tânia Regina Gatelli Fernandes pelo companheirismo e suporte durante esse período, além da sua incansável “proteção”.

À professora Maria Flávia Marques Ribeiro pela confiança, paciência e auxílio técnico para a realização deste trabalho.

Ao meu “co-orientador” Alex Sander da Rosa Araujo pela ajuda.

Aos meus amigos (as), companheiros (as) e colegas do Laboratório pelo bom convívio e auxílio prestado nesse período, em especial ao Gustavo Julio Dreher.

Aos meus colegas da turma de mestrado, pelos excelentes momentos passados juntos, e pelas boas amizades formadas.

Aos colegas dos demais laboratórios e aos funcionários do Departamento de Fisiologia.

A todas as pessoas que de uma forma ou de outra, passaram esse período comigo.

Ao laboratório de Análises Clínicas Weimann pela colaboração

Ao CNPq e aos impostos que todos os cidadãos brasileiros pagam para manter a Pesquisa e a UFRGS.

III

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Hipertireoidismo	12
1.2. Hipertireoidismo e Hipertrofia cardíaca	14
1.3. Espécies ativas de oxigênio, antioxidantes e estresse oxidativo	16
1.4. Hipertireoidismo e estresse oxidativo	21
1.5. Vias de sinalização crescimento e sobrevivência celular	22
1.6. Vias de sinalização para morte celular.....	26
1.7. Estado redox e vias de sinalização intracelular.....	28
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1. Animais	33
4.2. Indução do hipertireoidismo	33
4.3. Administração de vitamina E	33
4.4. Grupos experimentais	34
4.5. Protocolo experimental	34
4.6. Dosagem hormonal	35
4.7. Preparo do homogeneizado	35
4.8. Quantificação de proteínas	36
4.9. Atividade da enzima tiorredoxina redutase	36
4.10. Dosagem do peróxido de hidrogênio	36
4.11. Avaliação da glutatona reduzida e oxidada	37
4.12. Expressão proteica por <i>Western blot</i>	38
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
6. RESULTADOS	41
6.1. Morfometria e remodelamento cardíaco	41
6.2. Parâmetros de estresse oxidativo	42
6.3. Expressão de proteínas relacionadas com o sistema antioxidante	44
6.4. Expressão de proteínas relacionadas com sobrevivência/crescimento celular	46
6.5. Expressão de proteínas relacionadas com vias de morte celular	51
7. DISCUSSÃO	55
8. CONCLUSÃO	66
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

IV

Resumo

Esse estudo foi conduzido para testar a influência do estado redox sobre a modulação de proteínas envolvidas em vias de sinalização intracelular, associadas à sobrevivência/crescimento e morte celular, na hipertrofia cardíaca compensada induzida pelo hipertireoidismo experimental. Os hormônios da tireóide induzem crescimento cardíaco fisiológico e, a ativação das vias de sinalização da Akt e das MAPKs, parece contribuir na ação desses hormônios sobre o coração. Estresse oxidativo está envolvido nas respostas cardíacas em diversas situações fisiológicas e patológicas, assim como pode atuar na modulação de proteínas envolvidas em processos de sinalização. Glutathione e tioredoxina são os principais sistemas mantenedores do ambiente intracelular reduzido, através do controle dos níveis de tióis (-SH), consequentemente, podem contribuir na regulação dos sistemas de sinalização. Ratos Wistar foram divididos em 4 grupos (n=6-7/grupo): controle, vitamina E (20 mg/Kg/dia, s.c., 14 dias), L-tiroxina (T4) (12 mg/L na água de beber por 14 dias) e T4+vitamina E. **Materiais e Métodos:** Parâmetros morfométricos (índice de hipertrofia cardíaca (IHC = mg coração/g corporal); índice de congestão hepática e pulmonar), glutathione reduzida (GSH, $\mu\text{mol/g}$), glutathione oxidada (GSSG, $\mu\text{mol/g}$), estado redox (razão GSH/GSSG), atividade da tioredoxina redutase (TrxR, nmol/min, mg prot) e níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , nmol/g) foram mensurados no tecido cardíaco. A expressão das proteínas tioredoxina-1 (Trx-1), Akt, ERK1/2 e JNK (MAPKs), Bax (pró-apoptótica), Bcl-2 (pró-sobrevivência), caspase-3, AIF (fator indutor de apoptose) e do fator de transcrição Nrf-2, foram quantificados por *Western blot*. **Resultados:** O tratamento com o L-tiroxina foi efetivo no desenvolvimento do hipertireoidismo. Níveis plasmáticos de T4 ($\mu\text{g/dl}$) e T3 (ng/dl) aumentaram nos grupos hipertireoideos comparados aos controles. Depois dos 14 dias de tratamento, o grupo T4 apresentou hipertrofia cardíaca ($4,06 \pm 0,38 \text{ mg/g}$) comparado ao controle ($2,41 \pm 0,15 \text{ mg/g}$) e essa resposta foi reduzida significativamente no grupo T4+vitamina E ($3,65 \pm 0,27 \text{ mg/g}$). Sinais da congestão de órgãos não apresentaram diferença entre os grupos. Níveis de GSSG e H_2O_2 aumentaram significativamente (33% e 43%, respectivamente) no grupo T4 em comparação ao controle, sendo significativamente atenuados pela administração de vitamina E no grupo T4. A razão GSH/GSSG foi reduzida significativamente (28%) no grupo T4 em comparação ao controle. Nenhuma alteração foi observada nos níveis de GSH, na atividade da TrxR e na expressão da Trx-1 e Nrf-2. A expressão da Akt total reduziu nos grupos hipertireoideos em comparação aos seus controles e, a expressão da *fosfo*-Akt reduziu nos grupos vitamina E, T4 e T4+vitamina E quando comparados ao controle. Foi observado aumento significativo da expressão da *fosfo*-ERK1/2, assim como da razão *fosfo*-ERK/ERK total nos grupos hipertireoideos em comparação aos controles. Nenhuma alteração foi encontrada na expressão da JNK, *fosfo*-JNK, AIF e na razão da Bax/Bcl-2, por outro lado, observou-se aumento (53%) da caspase-3 nos T4 em comparação ao controle. **Conclusão:** Com base nos resultados obtidos, ao final dos 14 dias de tratamento com L-tiroxina, pode-se concluir que a resposta hipertrófica cardíaca parece estar com sua função compensada, uma vez que não foram observados sinais de insuficiência cardíaca. A redução de GSSG e H_2O_2 promovida pela administração de vitamina E se mostrou associada à diminuição do crescimento da massa cardíaca nos animais hipertireoideos. O sistema tioredoxina não se mostrou fundamental para a manutenção do estado redox nesta fase. A Akt parece não contribuir significativamente para a resposta hipertrófica nesse período de tratamento. O aumento da fosforilação da ERK1/2, associado a não ativação da JNK, pode ser o responsável pela resposta trófica cardíaca compensada nos animais hipertireoideos. O aumento da caspase-3, efetora de morte, indica que pode esse período possuir início da ativação apoptótica. Os dados em conjunto reforçam a ideia de que, nessa fase, há moderado desbalanço redox cardíaco, sem haver início de sinalização que favoreça a hipertrofia cardíaca patológica, porém com provável início de sinalização pró-apoptótica, a qual pode contribuir para o desenvolvimento da disfunção cardíaca.

Abstract

Cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism: role of redox status under proteins involved with signaling pathways for cell growth/survival and cell death

This study was conducted to test the redox status influence in the modulation of some proteins involved in pro-survival and pro-apoptotic intracellular signaling pathways in the compensate cardiac hypertrophy induced by hyperthyroidism. Thyroid hormones (T4 and T3) induce physiological cardiac growth and activation of Akt and MAPKs signaling pathways. Those may contribute to these hormones effects on the heart. Oxidative stress is involved in cardiac responses under several physiological and pathological situations, as well as can act in the modulation of proteins involved in the signaling process. Glutathione and thioredoxin are the main antioxidant systems in the intracellular environment that can contribute to the regulation of signaling redox-sensible. **Material and Methods:** Male Wistar rats were divided into four groups ($n= 6-7/\text{group}$): control, vitamin E (20mg/Kg/day s.c. 14 days), L-thyroxine (T4) (12mg/L in drinking water for 14 days) and T4+vitamin E. Morphometric parameters [cardiac hypertrophy index (mg heart/g body weight), liver and lung congestion index (wet/dry weight)], reduced glutathione (GSH, $\mu\text{mol/g}$) and glutathione disulfide (GSSG, $\mu\text{mol/g}$), redox status (GSH/GSSG ratio), the activity of thioredoxin reductase (TrxR, in nmol/min/mg protein) and hydrogen peroxide steady-state concentration (H_2O_2 , nmol/g) were measured in cardiac tissue. Thioredoxin-1 (Trx-1), NF-E2-related factor-2 (Nrf-2), Protein Kinase B (PKB or Akt), Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 (ERK1/2), c-Jun n-Terminal Kinase (JNK), Bax (pro-apoptotic)/Bcl-2 (pro-survival) ratio (Bcl-2 family proteins, respectively), Caspase-3 (proteases involved in apoptotic process) and Apoptotic-Inducing Factor (AIF) myocardial protein expression were quantified by western blot. **Results:** The hormone treatment was effective in the development of hyperthyroidism. The serum T4 (in $\mu\text{g/dL}$) and T3 (in ng/dL) increased significantly in hyperthyroid groups when compared to control groups, at the end of treatment. After 14 days, T4 group presented cardiac hypertrophy ($4.06 \pm 0.38 \text{ mg/g}$) when compared to control ($2.41 \pm 0.15 \text{ mg/g}$) and, this response was significantly reduced in T4+vitamin E ($3.65 \pm 0.27 \text{ mg/g}$). Congestion signs were not observed. Levels of GSSG and H_2O_2 increased significantly (33% and 43%, respectively) in the T4 group compared to control and this was reduced by vitamin E administration to the T4 group. The GSH/GSSG ratio was significantly reduced in the group T4 (28%) when compared to control. Any change in the levels of GSH, TrxR activity and the Trx-1 and Nrf-2 expression was observed. Total Akt expression was reduced in the hyperthyroid groups when compared to their respective controls and the *p*-Akt expression was significantly reduced in vitamin E, T4 and T4+vitamin E compared to control. The *p*-ERK1/2 expression and *p*-ERK/Total ERK were significantly increased in the hyperthyroid groups compared to controls. No changes were observed in the JNK, *p*-JNK, AIF and Bax/Bcl-2 ratio expression, but Caspase-3 increased 53% in T4 group compared to control. **Conclusion:** We concluded that after 14 days of treatment with L-thyroxine, cardiac hypertrophy response would have a compensated function, since no signs of congestive heart failure were seen. It was observed association between GSSG and H_2O_2 reduction, by vitamin E administration, and cardiac mass decreased in the hyperthyroid animals. The thioredoxin system appears to be not primordial to redox environment maintenance in this phase. The Akt seems not to contribute significantly to the hypertrophic response in these period of treatment. The increase in *p*-ERK1/2, associated with an inalteration of JNK, could be responsible for a compensate cardiac hypertrophy phenotype in the hyperthyroid animals. Caspase-3 increase indicates that this period may represent the beginning of apoptotic activation. The overall results reinforce the idea that, in this period, there is moderate cardiac redox imbalance, with no signals that favors the pathological cardiac hypertrophy, although with probable onset of proapoptotic signaling, which may contribute to the development of cardiac dysfunction.

Comitê de Ética



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CARTA DE APROVAÇÃO

pro.pesq

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

Número : 2007832

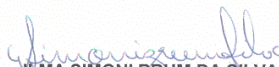
Título : PARTICIPAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NA MODULAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR PI3K/Akt/mTOR EM MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERTIREOIDISMO

Pesquisador (es) :

NOME	PARTICIPAÇÃO	EMAIL	FONE
ADRIANE BELLO KLEIN	PESQ RESPONSÁVEL	belklein@vortex.ufrgs.br	33083320

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 22 , ata nº 102 , de 13/3/2008 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, sexta-feira, 14 de março de 2008


ILMA SIMONI BRUM DA SILVA
Coordenador do CEP-UFRGS

VII

Lista de Abreviaturas e símbolos

- AIF - fator indutor de apoptose (*Apoptosis-Inducing Factor*)
- Akt – proteína cinase B (*protein kinase B - PKB*)
- ARE – elemento responsivo a antioxidantes (*antioxidant responsive elements*)
- CAT – enzima catalase
- Cis/Cis-SS – sistema antioxidante tiól/dissulfeto das cisteínas
- EAO – espécie ativa de oxigênio
- Endo G – endonuclease G
- ERK – cinase ativada por sinal extracelular (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*)
- Fe²⁺ – íon ferroso
- GPCR – receptor acoplado à proteína G (*G Protein-Coupled Receptors*)
- GPx – enzima glutaciona peroxidase
- GR – enzima glutaciona redutase
- GSH – glutaciona reduzida
- GSSG – dissulfeto de glutaciona
- GST – enzima glutaciona-S-transferase
- HMC-1 – células mastocitomas humanos
- HT – hormônio da tireóide
- H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
- IC – insuficiência cardíaca
- ICC – insuficiência cardíaca congestiva
- IGF-1 – fator de crescimento semelhante à insulina-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*)
- JNK – proteína cinase c-Jun NH₂-terminal (*c-Jun NH₂-terminal Kinase*)
- MAPK – proteína cinase ativada por mitógeno (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)
- MHC α – proteína da cadeia pesada de miosina α (*Myosin Heavy Chain- α*)
- MHC β – proteína da cadeia pesada de miosina β (*Myosin Heavy Chain- β*)
- mTOR – proteína alvo da rapamicina em mamíferos (*mammalian Target Of Rapamycin*)
- NADPH – nicotinamida adenina fosfato
- NADPH oxidase – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase
- NADP⁺ – nicotinamida adenina fosfato oxidado

VIII

NF κ B – fator de transcrição nuclear κ B (*Factor Nuclear κ B*)
O₂^{•-} – ânion radical superóxido
OH[•] – radical Hidroxil
PDK 1/2 – fosfoinositideo dependente de cinase (*phosphoinosite-dependent kinase 1/2*)
PIP₂ – fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato (*phosphatidyl-Inositol 4,5-bisPhosphate*)
PIP₃ – fosfatidil-inositol 3,4,5-trifosfato (*Phosphatidyl-Inositol 3,4,5-trisPhosphate*)
PI3K – proteína fosfatidil-inositol 3 cinase (*Phosphatidylinositol-3-Kinase*)
Prx – peroxirredoxina
PTEN – proteína PTEN
p-Akt – proteína cinase B fosforilada
p-ERK – ERK fosforilada
Ras – pequena proteína GTPase (*Small GTPase*)
RPTK – receptor tirosina cinase (*Receptor Protein Tyrosines Kinase*)
RT – receptor tireoideano (RT- α , RT- β e RT- γ)
Ser – serina
-SH – grupo tiol
-SS- – grupo dissulfeto
SOD – enzima superóxido dismutase
SRA – sistema renina-angiotensina
Thr – treonina
TNF- α – fator de necrose tumoral α (*Tumor Necrosis Factor α*)
TRE – elemento responsivo ao T3 (*T3 responsive elements*)
Trx – proteína tiorredoxina
TrxR – enzima tiorredoxina redutase
Trx-SH – tiorredoxina reduzida
Trx-SS – tiorredoxina oxidada
Tyr – tirosina
TSH – hormônio tireo-estimulante
T3 – hormônio triiodotironina
T4 – hormônio tiroxina

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Lista de anticorpos primários utilizados para a análise de expressão protéica por Western blot	39
Tabela 2: Concentração hormonal e parâmetros morfométricos após duas semanas de tratamento com L-tiroxina e/ou vitamina E	42
Tabela 3: Concentração da glutathiona, estado redox (razão GSH/GSSG), atividade da enzima tioredoxina redutase e níveis de peróxido de hidrogênio após duas semanas de tratamento com L-tiroxina e/ou vitamina E	43

Lista de Figuras

Figura 1: Vias de produção e <i>clearance</i> das espécies ativas de oxigênio	19
Figura 2: Esquema resumido das proteínas que fazem parte da via de sinalização da PI3K/Akt/mTOR	24
Figura 3: Esquema resumido das cascatas de proteínas que fazem parte da via das MAPKs	26
Figura 4: Representação esquemática das vias extrínseca e intrínseca de morte celular que regulam a apoptose celular em células de mamíferos	28
Figura 5: Correlação entre Índice de Hipertrofia Cardíaca (IHC) e razão GSH/GSSG	44
Figura 6: Expressão protéica analisada por Western blot de homogeneizado cardíaco: (A) Tiorredoxina 1, (B) Nrf-2	45
Figura 7: Expressão protéica analisada por Western blot de homogeneizado cardíaco: (A) Akt total, (B) p-Akt, (C) razão p-Akt/Akt total	47
Figura 8: Correlação entre razão p-Akt/Akt total e o Índice de Hipertrofia Cardíaca (IHC)	46
Figura 9: Correlação da expressão da Akt total e a razão GSH/GSSG	48
Figura 10: Correlação da expressão da p-Akt e a razão GSH/GSSG	48

Figura 11: Expressão protéica analisada por Western blot de homogeneizado cardíaco: (A) ERK1/2 total, (B) p-ERK1/2, (C) razão p-ERK/ERK total	50
Figura 12: Correlação entre razão da p-ERK/ERK total e o Índice de Hipertrofia Cardíaca (IHC)	49
Figura 13: Correlação entre a razão da p-ERK/ERK total e a razão da GSH/GSSG	49
Figura 14: Expressão protéica analisada por Western blot de homogeneizado cardíaco: AIF	51
Figura 15: Expressão protéica analisada por Western blot de homogeneizado cardíaco: (A) JNK total, (B) p-JNK e razão p-JNK/JNK total (C)	52
Figura 16: Expressão protéica analisada por Western Blot de homogeneizado cardíaco: (A) razão Bax/Bcl-2 e (B) Caspase-3	53
Figura 17: Correlação entre a expressão da caspase-3 e a razão da Bax/Bcl-2	54

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hipertireoidismo

Os hormônios da tireóide (HT) possuem papel importante no crescimento, desenvolvimento e metabolismo do organismo. Um alvo da ação desses hormônios é o tecido cardíaco, onde esses hormônios exercem um grande número de influências, promovendo alterações estruturais, funcionais e moleculares (Dillmann, 2002). Além disso, apresentam ação importante sobre a regulação do metabolismo basal de diversos tecidos, tais como músculo esquelético e cardíaco, fígado, rins e cérebro (Venditti & Di Meo, 2006).

Esses hormônios [L-tiroxina (T4) e 3,5,3'-triiodotironina (T3)] são produzidos, armazenados e secretados pela glândula tireóide, a qual está sob controle do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide através do TSH (hormônio tireo-estimulante), principal modulador da função tireoidiana, e pelo mecanismo auto-regulatório modulado pelos níveis de iodo, molécula indispensável para a síntese dos hormônios. Na endocrinologia, o distúrbio neste sistema que eleva a produção e a secreção de T4 e T3 para a circulação, expondo os tecidos a altos níveis hormonais, é conhecido como hipertireoidismo. As causas mais comuns desta síndrome patológica são a doença de Graves (condição auto-imune contra os receptores de TSH), o bócio multinodular tóxico e adenoma tóxico (nódulos hiper-secretores com função autonômica) e a causa iatrogênica (excessiva ingestão hormonal) (Cooper, 2003). Os sinais e sintomas do hipertireoidismo incluem fadiga, perda de peso, intolerância ao calor, nervosismo, palpitações, aumento da motilidade intestinal, tremores e labilidade emocional.

Além desta gama de ações causadas pelos hormônios sobre os diferentes tecidos, é sobre o sistema cardiovascular que o hipertireoidismo apresenta muitas das suas manifestações clínicas, devido a suas ações no miocárdio e sobre a hemodinâmica do sistema.

Observa-se taquicardia, cardiomegalia, arritmias (fibrilação atrial) e aumento do débito cardíaco, sendo este último causado pela maior contratilidade ventricular, maior fração de ejeção, redução da resistência vascular periférica e aumento do volume sanguíneo (Klein & Ojamaa, 2001). Este estado cardiocirculatório hiperdinâmico é causado tanto pela ação dos hormônios sobre a transcrição gênica de proteínas regulatórias e estruturais do coração, como pelo maior consumo de oxigênio causado pelo metabolismo elevado dos tecidos, necessitando de uma maior entrega desse gás pelo sistema circulatório.

O aumento da massa cardíaca é uma ocorrência bem conhecida no hipertireoidismo, tanto em animais como em humanos (Danzi & Klein, 2004), no entanto é pequeno o conhecimento sobre os mecanismos pelos quais os hormônios induzem essa resposta. Os hormônios T4 e T3 exercem muitos de seus efeitos sobre o coração através do mecanismo genômico, em que, especialmente o T3, interage com receptores nucleares ativando ou suprimindo a transcrição gênica. Todos os receptores são fatores de transcrição ativados por ligante, sendo que uma vez recrutados, interagem com a maquinaria transcricional, aumentando a expressão de genes específicos. Uma característica dos receptores do T3 é que residem no núcleo associados ao elemento responsivo ao T3 (TRE, *T3 responsive elements*) do DNA. Das diferentes isoformas dos receptores tireoideanos α , β e γ (RT), nos cardiomiócitos, a mais expressa é o RT- α (Dillmann, 2009). Atualmente, tem-se observado que esses hormônios também atuam de forma não-genômica, através da sua interação com receptores tireóideos presentes na membrana celular e no citoplasma, ativando vias de sinalização intracelular (Kuzman *et al* 2007).

Tanto o aumento da massa cardíaca como as taquiarritmias (fibrilação atrial), achados comuns no hipertireoidismo, são importantes preditores para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca (IC). No hipertireoidismo, o desenvolvimento da IC parece ser secundário à sustentada taquicardia, a qual prejudica a contratilidade cardíaca (Danzi & Klein,

2004). Também pode se observar o desenvolvimento de disfunção diastólica seguida de IC, a qual é conhecida como cardiomiopatia tireotóxica dilatada (Robbins *et al*, 2005).

1.2. Hipertireoidismo e hipertrofia cardíaca

A hipertrofia cardíaca é um mecanismo adaptativo do coração, em resposta a um aumento de sua atividade ou de sobrecarga funcional (Mill & Vassalo, 2001), assim como por estímulos neurohormonais (Hu *et al*, 2005). A hipertrofia das câmaras ventriculares ocorre como uma resposta compensatória para manter o estresse mecânico sistólico sobre a parede ventricular dentro da normalidade e diminuir o consumo de oxigênio (Berenji *et al*, 2005). No entanto, a sustentação de certos estímulos hipertróficos (sobrecarga crônica de pressão e/ou volume) determina alterações patológicas nas células cardíacas e predispõe ao desenvolvimento de IC, o que torna a hipertrofia ser considerada um importante fator de morbidade e mortalidade (Mosterd *et al*, 2001). Porém, em situações que o estímulo desencadeador dessa resposta é fisiológico, promove crescimento cardíaco sem consequente disfunção (gravidez, exercício físico).

No hipertireoidismo, a hipertrofia cardíaca é induzida tanto por efeitos diretos dos hormônios sobre os cardiomiócitos, como por efeitos indiretos através da modificação da carga imposta aos ventrículos. Atuando diretamente, muitos autores mostraram que preparações isoladas de músculo cardíaco tratadas com HT, aumentam a quantidade e a taxa de síntese protéica e ribossomal. Porém, o papel dos HT sobre a expressão gênica não explica satisfatoriamente os efeitos observados no crescimento do cardiomiócito (Kenessey & Ojamaa, 2006). A diminuição da resistência vascular periférica, o aumento de volume sanguíneo e o subsequente aumento do trabalho cardíaco, contribuem para a hipertrofia induzida pelos HT (Danzi & Klein, 2004). Hu *et al* (2003) mostraram que o sistema

adrenérgico e o sistema renina-angiotensina (SRA) parecem estar envolvidos na resposta hipertrófica de ratos hipertireóides, sendo esse segundo sistema, mais influente.

Segundo a literatura, nessa disfunção endócrina, raramente sinais e sintomas de insuficiência cardíaca congestiva (ICC) podem ocorrer; entretanto, isso ocorre em situações de severo e prolongado hipertireoidismo (Danzi & Klein, 2004). Araujo *et al* (2006) corroboraram essas informações uma vez que em seu trabalho utilizando modelo experimental de hipertireoidismo pelo período de 4 semanas (28 dias), observaram o desenvolvimento de sinais de ICC apenas na última semana de tratamento com L-tiroxina. Diversos trabalhos mostram que os HT estão relacionados principalmente com a indução da hipertrofia fisiológica, ou seja, resposta funcional compensada. Esse padrão, no entanto, pode se modificar devido à sobrecarga funcional, gerando hipertrofia patológica, favorecendo sua evolução para IC (Dillmann, 2009). A hipertrofia fisiológica inclui aumento da síntese de proteínas contráteis e mitocôndrias, normalização das vias metabólicas e da geometria das câmaras ventriculares, redução da fibrose e neovascularização proporcional ao crescimento cardíaco (Ojamaa, 2009). Já o crescimento cardíaco patológico, diferentemente do fisiológico, ocorre secundário a desequilíbrios hemodinâmicos crônicos (aumento da pré e/ou pós-carga) e é caracterizado pelo aumento de fibroblastos, aumento de fibrose (matriz extracelular) e perda de cardiomiócitos por mecanismos de morte celular (Wakatsuki *et al*, 2004).

Esses dois padrões de hipertrofia apresentam diferentes características estruturais e funcionais, assim como fatores bioquímicos e moleculares. No caso dos HT, promovem o aumento na expressão da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA-2), da cadeia pesada da miosina α (MHC- α) e a diminuição da MHC- β , sendo essa resposta semelhante a estímulos indutores de hipertrofia fisiológica (Dillmann, 2009). Outros estudos observam que a hipertrofia induzida pelo tratamento com T4 (7 dias) não é acompanhada do aumento de fibrose cardíaca (Hu *et al*, 2005), assim como não há acúmulo de colágeno no interstício

miocárdico, os quais são uma marca da hipertrofia patológica (Wakatsuki *et al*, 2004; Mill & Vassalo, 2001). Os padrões de hipertrofia resultam também de ativação diferencial de vias de sinalização, onde é observado que proteínas que sinalizam para o crescimento/sobrevivência estão relacionadas com o tipo fisiológico de hipertrofia, e que outras vias, relacionadas com crescimento, mas também com morte celular, sinalizam para o tipo patológico (Heineke & Molkentin, 2006; Wakatsuki *et al*, 2004). No entanto, são escassos os estudos mostrando quais as vias de sinalização estão presentes no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca no hipertireoidismo, induzido através da administração de L-tiroxina.

Com isso, uma vez que a hipertrofia do ventrículo esquerdo (HVE) é um preditor de mortalidade de várias patologias de origem cardiovascular e que o hipertireoidismo é um fator de risco independente para a HVE (Dörr *et al*, 2005), se faz importante investigarmos os mecanismos envolvidos no desenvolvimento dessa resposta hipertrófica.

1.3. Espécies ativas de oxigênio, antioxidantes e estresse oxidativo

O estresse oxidativo é descrito como um desequilíbrio entre a formação de espécies ativas de oxigênio (EAO) e o sistema antioxidante, gerando um potencial dano oxidativo a estruturas celulares (Sies & Cadenas, 1985). Sendo assim, o equilíbrio entre os pró-oxidantes e antioxidantes é essencial para a manutenção da homeostasia celular (equilíbrio redox). No sistema cardiovascular, estudos mostram que o estresse oxidativo está relacionado com o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca, assim como a sua transição para a IC (Singal *et al*, 1999), sendo os mecanismos pouco entendidos. Nas primeiras descobertas sobre a formação dos radicais de oxigênio, acreditava-se que estes possuíam apenas consequências maléficas para o organismo. No entanto, recentes pesquisas estão observando que estas moléculas oxidativas possuem papel fisiológico relevante na manutenção do equilíbrio redox, importante

fator para o funcionamento normal celular e modulador de vias de sinalização intracelular (Augusto, 2006; Trachootam *et al*, 2008).

As EAO compreendem o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\bullet}), os quais são originários da redução monovalente do oxigênio. Na mitocôndria, o $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 são produzidos principalmente no complexo I (NADH desidrogenase) e III (ubiquinona-citocromo-*c* redutase) da cadeia transportadora de elétrons. Uma vez que os HT aumentam os componentes presentes na membrana interna da mitocôndria, aumentam a produção dessas EAO, favorecendo a ocorrência do estresse oxidativo (Venditti & Di Meo, 2006). Outras importantes fontes de $O_2^{\bullet-}$ são NADPH oxidase e xantina oxidase (Figura 1).

Os sistemas antioxidantes que evitam o aumento excessivo das EAO e mantêm a homeostasia redox, são formados por elementos enzimáticos e não-enzimáticos. A enzima superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutaciona peroxidase (GPx) são as principais catalizadoras da redução das EAO até água. A glutaciona-S-transferase (GST) e a glutaciona redutase (GR) agem, respectivamente, detoxificando agentes eletrofilicos (radicais livres, xenobióticos) e reduzindo o dissulfeto de glutaciona (GSSG) à glutaciona reduzida (GSH) (Tsutsui, 2001). Aumentos da atividade e da expressão protéica dessas enzimas são observados no hipertireoidismo, sugerindo ser uma resposta compensatória ao aumento das EAO, buscando prevenir danos oxidativos (Venditti & Di Meo, 2006; Araujo *et al*, 2006).

Os principais antioxidantes não-enzimáticos intracelulares são o tripeptídeo glutaciona (GSH) e a pequena proteína redox-sensível tioredoxina (Trx), por apresentarem em sua estrutura molecular o grupo tiol (-SH), o qual doa seu H^+ para neutralizar e/ou reduzir os radicais livres, promovendo o controle intracelular do ambiente redox tiol (-SH)/dissulfeto (-SS-). Uma das suas diferenças é que a GSH apresenta-se em concentrações milimolar, em comparação com a Trx que é micromolar. A GSH além de controlar o ambiente redox celular,

participa de muitos processos metabólicos, incluindo a prevenção da oxidação dos grupos -SH de proteínas que são essenciais para a estabilidade e função dessas macromoléculas (Venditti & Di Meo, 2006). Por outro lado, a Trx parece ter uma maior ação redutora sobre as proteínas. A relação glutatona reduzida (GSH)/glutaciona oxidada (GSSG) serve como um bom indicativo de como está o ambiente redox celular. A redução dos níveis de GSH no coração *in vivo* aumenta a sensibilidade das células ao estresse oxidativo (Singal *et al*, 1999). Estudos mostram que o hipertireoidismo causa a redução dessa relação, e o uso de antioxidantes revertem esse efeito, mostrando que os HT possuem um importante papel na regulação do estresse oxidativo (Araujo *et al*, 2007).

A proteína Trx não atua apenas como antioxidante, mas também como anti-inflamatória e anti-apoptótica. Junto com GSH, o sistema Trx possui uma importante ação sobre a regulação do ambiente redox intracelular, tanto ao nível citoplasmático como nuclear, controlando diversas proteínas e fatores de transcrição envolvidos em vias de sinalização (Ago & Sadoshima, 2006; Jones, 2006). No coração, essa proteína apresenta duas isoformas distintas, a Trx-1 e Trx-2. A Trx-1 está mais envolvida com os processos de sinalização redox sensível, atuantes no remodelamento cardíaco. Já a Trx-2 possui importante papel sobre a mitocôndria de tecidos mais ativos metabolicamente, agindo na redução das EAO, constantemente formadas por essa organela para a produção de energia (Ago & Sadoshima, 2006). Faz parte do sistema da Trx, a enzima Trx Redutase (TrxR) atuando na reconversão da Trx oxidada (Trx-SS) para a Trx (Trx-SH) reduzida. A expressão e atividade da Trx é principalmente regulada pelo nível de desbalanço redox, sendo que esses dois fatores contribuem com respostas relacionadas com hipertrofia e insuficiência cardíaca (Ago & Sadoshima, 2006). Outra ação da Trx é sobre a recuperação da Peroxirredoxina (Prx) que reduz H_2O_2 à água, assim como a enzima glutaciona peroxidase (Kobayashi-Miura *et al*, 2007).

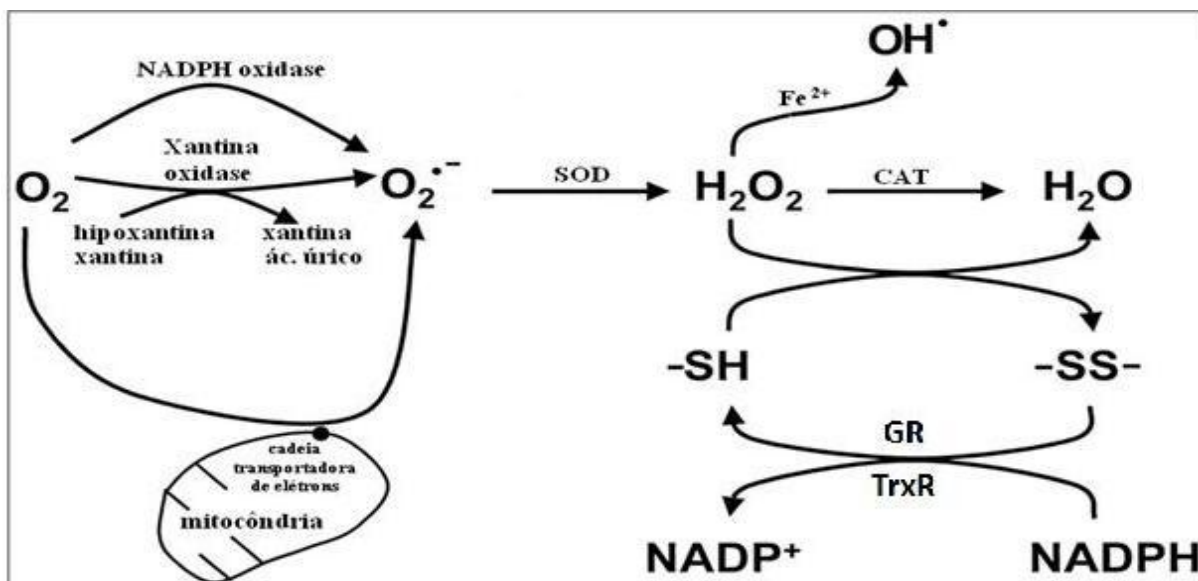


Figura 1: Vias de produção e *clearance* das espécies ativas de oxigênio (EAO). Modificado de Dröge, 2002. (O_2 , oxigênio; $O_2^{\cdot-}$, ânion radical superóxido; H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; H_2O , água; OH^{\cdot} , radical hidroxil; -SH, grupo tiol; -SS-, grupo dissulfeto; TrxR, tioredoxina redutase; GR, glutatona redutase)

Um importante controlador dos níveis desses antioxidantes não-enzimáticos é o fator de transcrição Nrf-2 (*NF-E2-related factor 2*), que atua na regulação da transcrição de múltiplos antioxidantes, como a GSH e a Trx, sendo esse fator modulado por alterações redox intracelulares. Atua ligando-se ao elemento responsivo a antioxidantes (ARE, *antioxidant responsive elements*) de genes específicos. Sobre condições fisiológicas, o Nrf-2 está inativado pela sua interação com a proteína Keap-1 no citosol. No entanto, sob estresse oxidativo esse fator é liberado da Keap-1, translocando-se para o núcleo, promovendo a expressão de mais de 200 genes relacionados com função antioxidante (ex. síntese de GSH, Trx-1, heme oxigenase, GPx, GR, Prx-1, entre outros) (Qiang *et al*, 2004; Hansen *et al*, 2004). O estresse oxidativo é considerado o principal ativador da via do Nrf-2, sendo que as proteínas que esse fator induz, são críticas para a defesa celular contra o próprio estresse oxidativo (Trachoothan *et al*, 2008).

Soma-se a estes antioxidantes não-enzimáticos, a vitamina E (α -tocoferol) que é um antioxidante lipossolúvel, responsável pela proteção dos ácidos graxos poliinsaturados das

membranas celulares contra o ataque das EAO. Por ser capaz de se intercalar na membrana plasmática, atua inibindo a propagação das reações desencadeadas pela lipoperoxidação (Packer *et al*, 2001). A vitamina E atua como *scavenger* de radicais livres (varredor), uma vez que ela doa um elétron, neutralizando esses radicais, transformando-se em radical tocoferil. Esse por sua vez é regenerado a tocoferol, através do ascorbato (vitamina C). A vitamina E reduz a produção de radicais centrados no carbono, capazes de reagir diretamente com biomoléculas como o grupo -SH de proteínas, resultando na redução do consumo e exaustão de GSH. É importante para a manutenção do meio intracelular reduzido e evitar a ativação de vias apoptóticas (Ryter *et al*, 2007). Araujo *et al* (2007) sugerem que o estresse oxidativo está envolvido no processo de hipertrofia cardíaca induzida pelo hipertireoidismo, pois uma vez administrada a vitamina E (antioxidante clássico) houve redução da hipertrofia. Isso sugere um papel preventivo da vitamina E no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca.

A manutenção do ambiente reduzido, tanto nuclear como citoplasmático, é de fundamental importância, pois muitos fatores de transcrição e proteínas possuem componentes estruturais que podem ser modificados por oxidação, sofrendo alteração de sua função (Trachoothan *et al*, 2008). Além disso, a geração de EAO ou a flutuação no estado redox celular promove a estimulação de vários sistemas de sinalização, como diversas proteínas cinases responsivas ao estresse (Matsuzawa & Ichijo, 2005).

Após duas décadas de estudos avaliando o papel e a ação do estresse oxidativo sobre o organismo por diversos pesquisadores, Jones (2006) traz uma definição contemporânea para este fenômeno, que não seria apenas um desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, mas também, alterações de vias de sinalização que podem sofrer modulação pelo desbalanço redox. Para esse autor, estresse oxidativo ocorre quando há “um distúrbio no controle e na sinalização redox”.

1.4. Hipertireoidismo e estresse oxidativo cardíaco

O aumento do metabolismo basal promovido pelos HT promove maior produção de EAO, os quais podem causar dano oxidativo a macromoléculas biológicas como DNA, lipídeos e proteínas. Estudos já mostraram que o estado hipertireoideo gera dano oxidativo em diversos tecidos, inclusive no tecido cardíaco (Venditti & DiMeo, 2006; Araujo *et al*, 2006).

O aumento da produção das EAO pelo hipertireoidismo está relacionado com o aumento da peroxidação lipídica (Gago-Dominguez & Costelao, 2008). No tecido cardíaco, é observado aumento da quimiluminescência e TBARS (marcadores de lipoperoxidação) induzido pela administração crônica de T4 (Araujo *et al*, 2007). Mesmo estando aumentada a produção de EAO no hipertireoidismo, o dano oxidativo ao DNA, mensurado através 8-oxo-desoxiguanosina, não apresenta-se elevado nessa disfunção (Venditti & DiMeo, 2006; López-Torres *et al*, 2000). Em relação à oxidação de proteínas, foi observado aumento do conteúdo de carbonilas em fígado (Venditti & DiMeo, 2006) e coração (Araujo *et al*, 2008) de ratos hipertireoideos. Wajdowicz *et al* (1996) observaram que o tratamento crônico com HT está associado com rompimento e dilatação mitocondrial, o que pode estar contribuindo para o desenvolvimento de disfunção cardíaca nesse modelo, uma vez que proteínas presentes no interior da mitocôndria, quando liberadas para o citoplasma, ativam vias de morte celular.

Evidências experimentais, assim como estudos clínicos, sugerem o envolvimento do estresse oxidativo e das EAO na patogênese de diversas disfunções cardíacas, como a hipertrofia e insuficiência cardíaca (Li *et al*, 2000). Araujo *et al* (2006) demonstraram correlação positiva entre hipertrofia cardíaca e estresse oxidativo em modelo experimental de hipertireoidismo, indicando que as EAO podem contribuir para a progressão à IC nesse modelo. No entanto, a participação do estresse oxidativo nesses processos é pouco entendida,

sendo necessário explorar como o desbalanço redox contribui para a resposta cardíaca induzida pelos HT.

1.5. Vias de sinalização para crescimento e sobrevivência celular

Recentes estudos têm mostrado que a resposta hipertrófica do coração aos diferentes tipos de estímulos fisiológicos e patológicos depende da ativação de vias de sinalização intracelular como importantes coordenadoras dessa resposta. Embora as vias de transdução de sinais sejam complexas e abundantes, estudos em diversos modelos animais têm revelado que as vias da PI3K/Akt/mTOR (Diniz *et al*, 2009) e das MAPKs (Wakatsuki *et al*, 2004) são importantes mediadoras da hipertrofia cardíaca. O mecanismo pelo qual os HT modulam a resposta hipertrófica cardíaca ainda é pouco entendido, no entanto observa-se que essas vias estão envolvidas nesse processo.

A proteína cinase B (Akt ou PKB) é uma serina/treonina que possui papel chave em processos celulares como na proliferação e crescimento celular, na angiogênese e no processo de apoptose (Matzuzawa & Ichijo, 2005). Dos três genes da Akt, o da Akt-1 e Akt-2 são bastante expressos no coração. Sua atividade está relacionada com estímulos geradores de hipertrofia cardíaca fisiológica (ex.: exercício, insulina, IGF-1) (Debosch *et al*, 2006), caracterizada pela prevenção da função ventricular e ausência de fibrose e da expressão gênica fetal. A Akt está implicada com a resposta hipertrófica do cardiomiócito, pois estudos mostraram que a sua inibição gera redução da taxa de síntese protéica, aumento da disfunção cardíaca e apoptose em modelo de IC (Clerk *et al*, 2007). Sua ação hipertrófica ocorre principalmente via ativação de alvos *downstream* como a mTOR (*mammalian target of Rapamycin*), uma proteína cinase serina/treonina que atua aumentando a síntese protéica via alterações na transcrição e tradução de genes (Heineke & Molkenin, 2006). Trabalhos

utilizando HT mostram a participação da Akt na resposta hipertrófica cardíaca em diferentes períodos de tratamento (Kuzman *et al*, 2005; Araujo *et al*, 2008; Diniz *et al*, 2009), indicando que essa proteína faz parte dos mecanismos pelos quais os HT induzem hipertrofia cardíaca (Figura 2).

A PI3K (*Phosphatidylinositol-3 kinase*), molécula *upstream* da via da Akt, é uma proteína de membrana responsável por iniciar os processos de fosforilação da Akt, tendo um papel importante no controle do crescimento do cardiomiócito (Proud, 2004). Das três isoformas dessa proteína, as PI3K-p85 e -p110 α estão associadas com sinalização para hipertrofia fisiológica, ativada por receptores tirosina cinase (RPTK, *receptor protein tyrosine kinases*); já a PI3K-p110 γ está associada com crescimento patológico, pois é ativada por receptores acoplados a proteína G (GPCR) e Gq (Ojamaa, 2009). Um estudo de Kenessey & Ojamaa (2006) mostra que existe interação entre o RT α -1citoplasmático com a subunidade p85 da PI3K, sendo que na presença do T3 ocorre ativação da PI3K, consequentemente fosforilando a Akt (ação não-genômica). Como já citado anteriormente, os HT aumentam a atividade do SRA e das catecolaminas, podendo esses contribuir com a ativação de vias de sinalização para o crescimento cardíaco.

Na cascata de ativação dessa via, a PI3K fosforila o segundo mensageiro PIP₂ (fosfatidil- inositol 4,5-bifosfato) em PIP₃ (fosfatidil-inositol 3,4,5-bifosfato). O PIP₃ é o que recruta a Akt para a membrana plasmática, sendo fosforilada pela PDK1/2 (fosfoinositideo dependente de cinase 1/2). Há também as fosfatases PTEN, PTPases e a PI3-fosfatase, agindo respectivamente sobre a PIP₃, RPTK e PI3K, que regulam finamente a fosforilação da via. Essas três fosfatases possuem cisteínas nas suas cadeias peptídicas, assim como a Akt, podendo sofrer modificação oxidativa, sendo reguladas pelo estado redox (Trachootam *et al*, 2008).

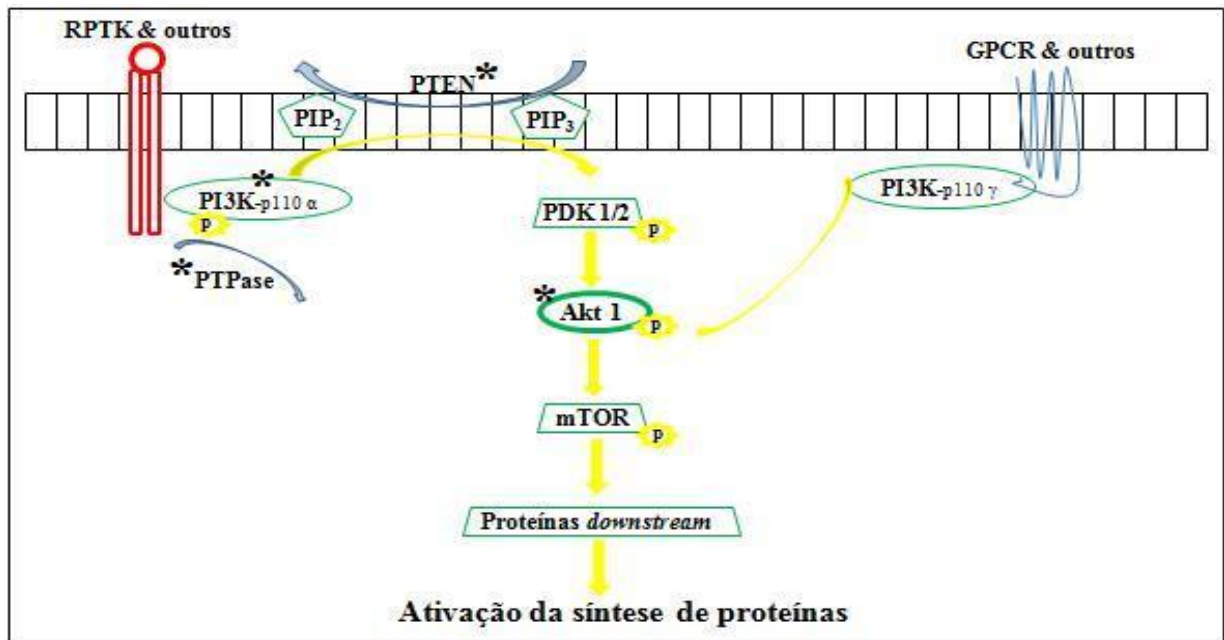


Figura 2: Esquema resumido das proteínas que fazem parte da via de sinalização da PI3K/Akt/mTOR. * proteínas sensíveis a regulação redox. Trachootam *et al*, 2008. (RPTK, receptores tirosina cinase; GPCR, receptores acoplados a proteína G; PI3K, fosfatidil-inositol 3 cinase; PDK, fosfoinosítido dependente de cinase; Akt, proteína cinase B; PTEN e PTPase, fosfatases)

Além de agir como agente hipertrófico, a Akt possui ação cardioprotetora por inibir proteínas associadas com a morte celular programada (apoptose), como é o caso de proteínas pró-apoptóticas da família das Bcl-2 e caspases (Clerk *et al*, 2007). A inibição dessa via *in vivo* está associada com o aumento da disfunção cardíaca e apoptose em modelos de IC em animais (Heineke & Molketin, 2006). DeBosch *et al* (2006) mostraram que a Akt atua suprimindo a hipertrofia patológica.

Outra importante família de proteínas que apresentam um papel sobre os cardiomiócitos são as MAPKs (*Mitogen-activated protein kinase*), formadas principalmente pela ERK 1/2 (*Extracellular signal-regulated kinase*), JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) e p38. Essas proteínas efetoras estão relacionadas tanto com o crescimento hipertrófico fisiológico como o patológico cardíaco. Previamente, foi reportado que a família das ERK 1/2 medeia diferenciação e crescimento celular, enquanto as proteínas JNK e p38 atuam nos mecanismos de apoptose e alteração da expressão gênica em resposta ao estresse (Baines & Molketin,

2005). Estudos observaram que a ERK1/2 participa como mediadora da ação dos HT no coração (Kuzman *et al*, 2005; Pantos *et al*, 2007). Estudos com cultura de células e *in vivo* utilizando HT, não observaram a participação da JNK sobre a resposta hipertrófica induzida pela ação desses hormônios (Kuzman *et al*, 2007). Observa-se participação da JNK no desenvolvimento de hipertrofia patológica. No entanto, a hipertrofia induzida por estímulos fisiológicos não apresentam participação dessa proteína (Wakatsuki *et al*, 2004), assim como na induzida pelo hipertireoidismo (Kuzman *et al*, 2005). O hipertireoidismo ativa a JNK em fígado de ratos, favorecendo a apoptose e conseqüentemente, disfunção hepática (Kumar *et al*, 2007). No hipertireoidismo crônico induzido por L-tiroxina se observa hipertrofia cardíaca com função descompensada (hipertrofia patológica) (Araujo *et al*, 2006), sendo considerada a apoptose um importante coadjuvante para a disfunção cardíaca (Sawyer *et al*, 2002). A JNK e p38 em alguns tipos celulares sinalizam para a sobrevivência, sendo considerado que o tempo de ativação dessas proteínas é quem dita sua ação: ativação transitória promove sobrevivência celular, enquanto a ativação sustentada tende a induzir apoptose (Matsuzawa & Ichijo, 2005; Trachootam *et al*, 2008).

As cascatas das MAPKs são ativadas nos miócitos cardíacos via GPCRs, RPTK, receptor serina/treonina cinase, assim como estímulos estressantes (estiramento mecânico do cardiomiócito) (Heineke & Molkentin, 2006). Uma vez ativadas, as MAPKs efetoras terminais fosforilam diretamente uma diversa coleção de proteínas citoplasmáticas, nucleares e mitocondriais, modulando a expressão gênica, metabolismo, fisiologia, morte e crescimento celular (Baines & Molkentin, 2005). A proteína Ras (*small GTPase*) está bastante implicada em diversas vias de sinalização, em especial a das MAPKs, onde ela é uma molécula *downstream* aos receptores que ativam as MAPKs, conseqüentemente, fosforilando as MAPKs intermediárias da via, até chegarem as MAPKs efetoras (Baines & Molkentin, 2005). As vias das MAPKs, assim como a via da PI3K/Akt, possuem moléculas redox sensíveis, no

entanto, a ação da modificação redox parece não atuar diretamente sobre a ERK1/2, JNK e p38; e sim nas proteínas *upstream* a elas (RPTK, Ras) e em proteínas que interagem com as MAPKs (GST, Trx, p53), controlando sua atividade através do contato proteína-proteína (Trachootam *et al*, 2008) (Figura 3).

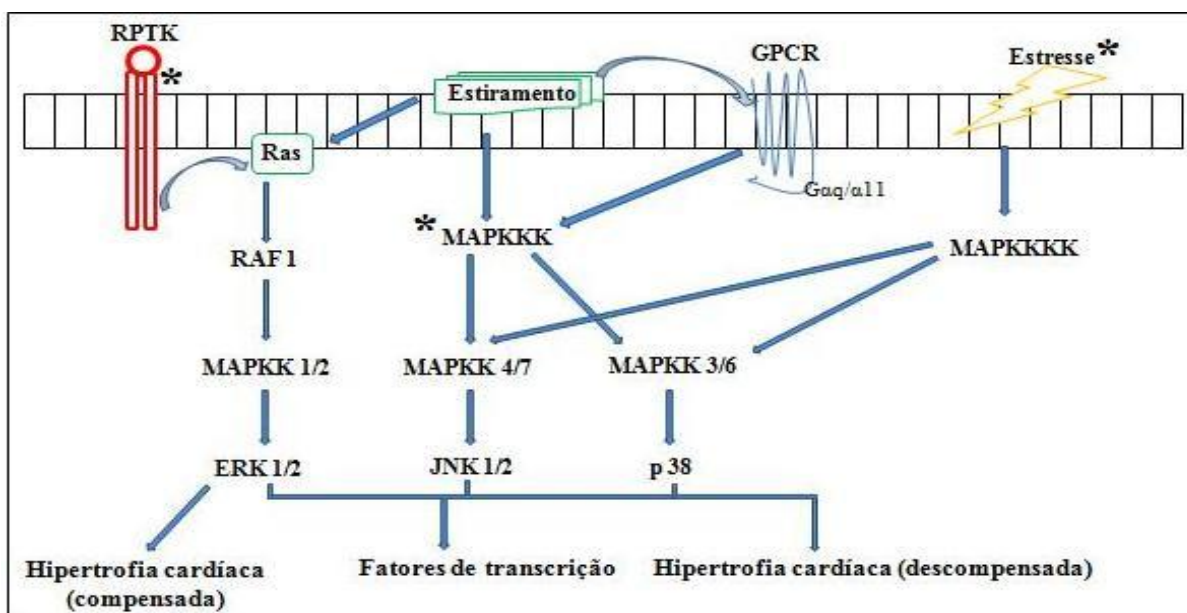


Figura 3: Esquema resumido das cascatas de proteínas que fazem parte da via das MAPKs. * proteínas sensíveis a regulação redox. Trachootam *et al*, 2008. (RPTK, receptores tirosina quinase; GPCR, receptores acoplados a proteína G; MAPKs, proteínas cinases ativadas por mitógeno; RAF1, proteína MAPKKK; ERK, cinase regulada por sinal extracelular; JNK, cinase c-Jun N-terminal)

1.6. Vias de sinalização para morte celular

O crescimento hipertrófico cardíaco não é o único fator que predispõe ao desenvolvimento da IC. São crescentes as evidências sugerindo que a perda dos cardiomiócitos é um fator contribuidor para a perda da função miocárdica. É proposto que a ativação de programas de morte celular apoptóticos é um processo transicional durante o qual o coração está se remodelando da hipertrofia cardíaca compensada para o declínio do desempenho contrátil, culminando na sua disfunção (Siu *et al*, 2007). A mitocôndria é essencial para o

funcionamento da maquinaria suicida celular, uma vez que ela libera proteínas potencialmente tóxicas do espaço intermembranas para o citosol (Baines & Molkenin, 2005).

Os mecanismos apoptóticos compreendem as vias de sinalização mitocondrial intrínseca (via citocromo *c*) e extrínseca (receptores de morte), as quais ativam proteases efetoras chamadas de caspases (Figura 4). Essas são proteases que atuam na clivagem de outras proteínas, especificamente depois de um resíduo de ácido aspártico na cadeia da proteína, uma especificidade incomum entre as proteases. Das diversas caspases que formam a cascata de sinalização, é a caspase 3 a finalizadora do processo apoptótico, a qual ativa moléculas que atuaram na condensação da cromatina e fragmentação do DNA (Ryter *et al*, 2007).

Há também vias de sinalização independente da ativação das caspases, que são aglomerados de fatores, incluindo o AIF (*Apoptosis-inducing factor*), a endonuclease G (EndoG) e a proteína requerente de alta temperatura (HtrA2/Omi). O AIF, uma flavoproteína da membrana mitocondrial interna, possui atividade pró-apoptótica quando translocada para fora da mitocôndria, na situação de aumento da permeabilidade mitocondrial através da perda do potencial transmembrana mitocondrial (van Empel *et al*, 2005) (Figura 4). O AIF é essencial na função da respiração mitocondrial e no metabolismo energético aeróbico dos músculos cardíaco e esquelético, provavelmente por atuar como controlador do estado redox dos componentes do complexo I (Jozza *et al*, 2005). Além disso, o AIF atua protegendo o músculo cardíaco contra a morte celular induzida por estresse oxidativo (van Empel *et al*, 2005), principalmente por agir como molécula antioxidante intra-mitocondrial (Lorenzo *et al*, 1999).

A permeabilidade da membrana mitocondrial, fator determinante da ativação da morte celular, é regulada principalmente pelo balanço entre as proteínas da família da Bcl-2, uma vez que certas proteínas dessa família promovem sobrevivência (Bcl-2, Bcl-w, Bcl-x_L, A1e Mcl-1), enquanto outras promovem apoptose (Bax, Bad, Bid, Bik, Bim, Blk) (Figura 4). A

heterodimerização destas proteínas de oposição regulam a sobrevivência celular (Holmgren *et al*, 1999). A heterodimerização entre Bcl-2 e Bax, neutraliza a atividade uma da outra, sendo utilizado na literatura que o aumento da razão Bax/Bcl-2 é um indicativo indução de processos apoptóticos (Ryter *et al*, 2007).

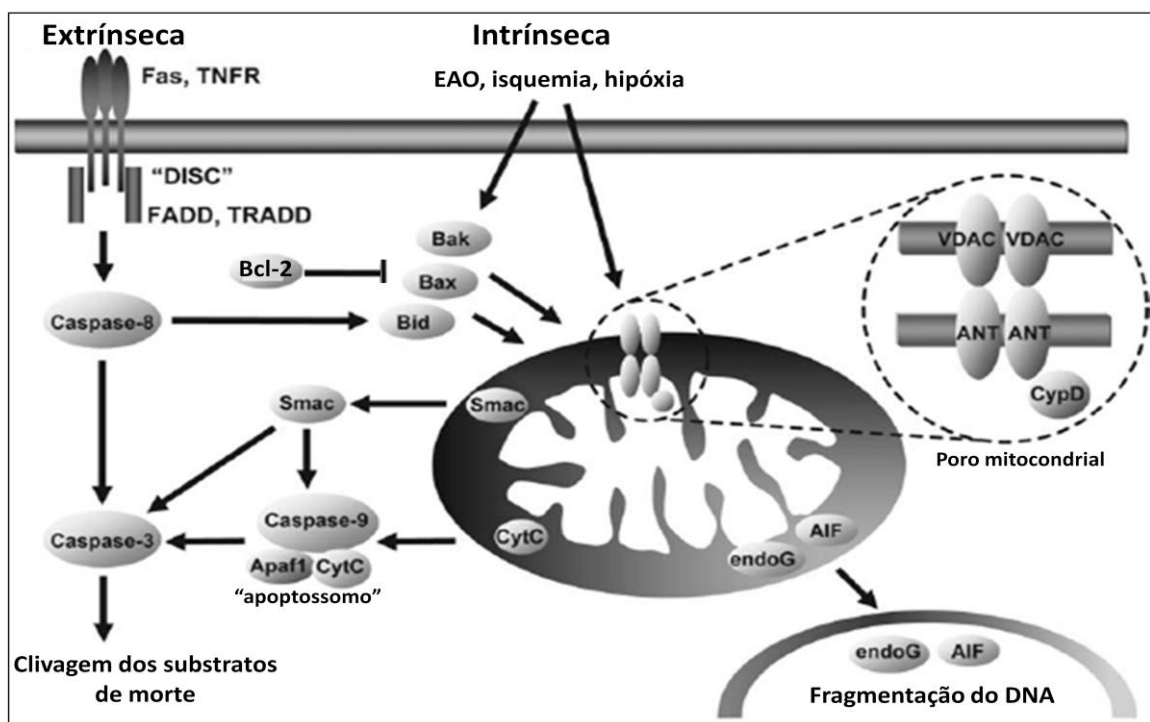


Figura 4: Representação esquemática das vias extrínseca e intrínseca de morte celular que regulam a apoptose em células de mamíferos. Modificado de Baines & Molkenin, 2005. (EAO: espécies ativas de oxigênio; Bcl-2, Bak, Bax, Bid: proteínas da família das Bcl-2; CytC: citocromo C; AIF: fator indutor de apoptose; EndoG: endonuclease G)

Uma vez que são escassos os estudos de vias de morte celular na resposta hipertrófica cardíaca em animais hipertireoideos, faz-se necessário investigar se estas vias participam dos processos de remodelamento cardíaco induzidos pelos HT.

1.7. Estado redox e vias de sinalização intracelular

Estudos demonstram o papel do desbalanço redox e EAO nos eventos de sinalização intracelular. Geralmente ocorre sinalização para proliferação e sobrevivência celular em

níveis moderados de estresse oxidativo, sendo que em altos níveis há relação com morte celular (Trachootam *et al*, 2008). Vias de sinalização são ativadas por EAO (Dröge, 2002), sendo que o hipertireoidismo está fortemente relacionado com a produção destas moléculas (Venditti & DiMeo, 2006). Existem modelos que explicam os mecanismos de transdução de sinal pelas EAO baseados nas alterações do estado redox celular e na oxidação de proteínas (Liu *et al*, 2005), podendo essas EAO atuarem como verdadeiros “segundos mensageiros” (Sugden & Clerk, 2006).

Há dois principais mecanismos de ação que podem explicar, de modo geral, a sinalização intracelular mediada pelas EAO. O primeiro está baseado nas alterações intracelulares do estado redox, o qual é normalmente mantido em condições fortemente reduzidas pelos grupos tióis dos sistemas da GSH. Alterações nas concentrações da GSH parecem regular a sinalização redox, e tais modificações nos seus níveis podem ser bem representadas pela razão GSH/GSSG. O segundo mecanismo está associado às alterações conformacionais e funcionais das proteínas, causadas pela ação oxidativa dos radicais livres. As modificações na estrutura das proteínas ocorrem preferencialmente em resíduos de aminoácidos que possuem grupos tióis e derivados, tal como cisteína e tirosina. Estas alterações na conformação nativa das proteínas induzem a dimerização e a interação com outros domínios protéicos ou com complexos metálicos distintos. Isto pode acarretar a modulação das funções de fatores de transcrição ou da atividade enzimática (Dröge, 2002; Liu *et al*, 2005).

As EAO podem desencadear a ativação dos membros da família das MAPKs e induzir o desenvolvimento de hipertrofia ou da apoptose das células cardíacas, de acordo com as concentrações destas espécies no meio intracelular (Giordano, 2005). A via da Akt pode ser rapidamente ativada (fosforilação) quando as células são expostas ao estresse oxidativo, principalmente pela ação do H₂O₂ (Cai *et al*, 2003; Yang *et al*, 2006). Estresse oxidativo moderado pode induzir modificações das cisteínas pela glutationilação, formação de

dissulfeto e S-nitrosilação, sendo que essas modificações são conhecidas por possuírem papel regulatório na função das proteínas Trx, p53, Ras, Akt e as tirosina fosfatases (Trachootam *et al*, 2008).

Como os HT estão relacionados com o aumento da formação de EAO e também parecem necessitar da ativação de vias de sinalização para coordenar suas respostas nos cardiomiócitos, é possível que o desbalanço redox causado pelo hipertireoidismo seja um contribuidor na modulação e ativação dessas vias de crescimento, proliferação e morte celular.

2. JUSTIFICATIVA

A hipertrofia cardíaca é um importante fator de risco para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca, a qual é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, atingindo cerca de 6,5 milhões de doentes no Brasil. Os hormônios da tireóide geram desenvolvimento de hipertrofia cardíaca, sendo considerados por muitos autores, uma ação com o desenvolvimento da hipertrofia fisiológica (benéfica). No entanto, trabalhos com animais hipertireoideos estão mostrando que ocorre disfunção ventricular em períodos tardios dessa doença. Com isso, é importante analisarmos os mecanismos envolvidos nesse processo de transição da hipertrofia cardíaca compensada para uma descompensada, em especial, proteínas que fazem partes de vias intracelulares de sinalização que contribuem para o destino funcional dos cardiomiócitos. Associado a isso, analisar o papel do estresse oxidativo nesse processo, uma vez que são muitos os estudos que mostram uma importante ação do equilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes nestas respostas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o papel do estado redox do tecido cardíaco sobre a resposta hipertrófica cardíaca, assim como sua participação na modulação de proteínas envolvidas em vias de sinalização para crescimento e morte celular, em modelo de hipertireoidismo experimental pelo período de 14 dias induzido através de L-tiroxina.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar, após um período de 14 dias de tratamento com L-tiroxina:

- As alterações morfológicas cardíacas, hepáticas e pulmonares.
- O perfil do estresse oxidativo cardíaco dos distintos grupos experimentais, através dos níveis de peróxido de hidrogênio, do sistema da glutathiona e do sistema da tiorredoxina;
- A expressão de fator de transcrição relacionado com o sistema antioxidante celular cardíaco (Nrf-2) através do imuno-conteúdo.
- A expressão de proteínas de sinalização intracelular de sobrevivência/crescimento (Akt, ERK1/2, JNK), morte celular (AIF, razão Bax/Bcl-2, caspase-3) no tecido cardíaco através do imuno-conteúdo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar com peso médio de 220 ± 20 gramas, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS. Os animais foram mantidos em caixas plásticas (270 x 260 x 310 mm) com o assoalho recoberto por serragem, recebendo ração (Nuvilab da NUVITAL) e água à vontade com ciclo claro-escuro de 12h em ambiente com temperatura controlada (20°C-25°C). Todos os protocolos realizados seguiram as normas da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS e foram devidamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (protocolo: 2007832).

4.2. Indução do Hipertireoidismo

O hipertireoidismo foi induzido mediante a administração de L-tiroxina (0,15 $\mu\text{mol/L}$) dissolvida na água de beber oferecida aos animais durante o período de duas semanas, *ad libitum* (Ladenson *et al.*, 1986; Araujo *et al.*, 2006).

4.3. Administração de vitamina E

A vitamina E (20mg/Kg/dia diluída em óleo mineral) foi administrada por via subcutânea nos animais durante o período de duas semanas, concomitante com a indução do hipertireoidismo (Araujo *et al.*, 2007).

4.4. Grupos experimentais

Foram estabelecidos quatro grupos experimentais, sendo eles:

- Controle (n= 7): animais que beberam água pura e receberam apenas o veículo óleo mineral (via subcutânea).
- Vitamina E (n=7): animais que beberam água pura e receberam vitamina E.
- Hipertireoideo (T4) (n= 6): animais que receberam L-tiroxina diluída na água de beber e apenas o veículo óleo mineral (via subcutânea).
- Hipertireoideo (T4) + Vitamina E (n= 6): animais que receberam L-tiroxina diluída na água de beber e vitamina E.

4.5. Protocolo experimental

O hipertireoidismo foi induzido através da administração de L-tiroxina durante o período de 14 dias, sendo verificado o peso corporal dos animais a cada dois dias para administração da vitamina E (20mg/Kg/dia). Terminado o período de tratamento, os animais foram pesados e anestesiados com quetamina (90mg/kg) e cloridrato de xilasina (20mg/kg) (i.p.) para coleta de sangue via plexo retro-orbital e, ainda sob efeito do anestésico, foram mortos por deslocamento cervical. O coração foi rapidamente extraído, pesado e congelado em nitrogênio líquido, seguido da retirada do fígado e pulmão. Verificado o peso do fígado e pulmão (peso úmido), estes foram colocados em uma estufa (75°C) para obtenção do peso seco de cada órgão. Depois de retirados do nitrogênio líquido os corações foram armazenados em freezer -80°C.

O Índice de Hipertrofia Cardíaca (IHC) foi calculado pela relação entre o peso dos ventrículos (mg) pelo peso corporal final (g), sendo expresso em mg/g (Araujo *et al.*, 2006). Os índices de congestão hepática e pulmonar foram calculados pela razão do peso úmido/peso seco (Hill & Singal, 1997). Estes índices são aceitos pela literatura como medidas adequadas de hipertrofia cardíaca e congestão de órgãos.

4.6. Dosagem hormonal

O sangue coletado foi centrifugado por 10 minutos a 1000g em centrífuga refrigerada (Sorvall RC5B – Rotor SM 24) para separação do soro. Os níveis hormonais séricos de T4 e T3 foram dosados pelo método de eletroquimiluminescência, através dos Kits Elecsys T4 Roche e Elecsys T3 Roche, respectivamente. Os resultados de T4 foram expressos em µg/dL soro e do T3 em ng/dL soro. As dosagens foram realizadas pelo Laboratório Weinmann.

4.7. Preparo do homogeneizado

Para a análise de atividade enzimática e quantificação de proteínas do tecido cardíaco, uma fatia do coração foi homogeneizada por 30 segundos em Ultra-Turax, na presença de KCl 1,15% (5 mL/g de tecido) e de fluoreto de fenil metil sulfonil (PMSF), na concentração de 100 mmol/L em isopropanol (10 µL/mL de KCl adicionado). O PMSF é um inibidor de proteases e foi utilizado para que não ocorresse a degradação das enzimas, as quais seriam medidas. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado por 20 minutos a 3000g em uma centrífuga refrigerada (Sorvall RC5B – Rotor SM 24) e o sobrenadante foi aliquoteado e armazenado em freezer a -80°C, para futuras medidas (Llesuy, *et al.*, 1985).

4.8. Quantificação de proteínas

As proteínas do tecido cardíaco foram quantificadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores, em 1951, que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1 mg/mL em água destilada. A medida foi efetuada em espectrofotômetro a 625nm e os resultados expressos em mg/mL. Para a técnica de Western blot, as proteínas foram quantificadas através do método de Bradford (Bradford, 1976).

4.9. Atividade da enzima tiorredoxina redutase

A determinação da atividade da tiorredoxina redutase (TrxR) baseia-se na redução do composto 5'5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) à TNB, que é de coloração amarela e pode ser detectado espectrofotometricamente a 412 nm. Para tanto, preparou-se um meio de reação (pH 7,0) contendo DTNB (72 mmol/L), NADPH (47 mmol/L) e EDTA (200mmol/L) onde a reação foi medida durante 1 minuto. Uma unidade de tiorredoxina redutase é definida como 1µmol de TNB formado por minuto. Dados foram expressos em nmol/mim/mg proteína (Holmegren & Bjornstedt, 1995).

4.10. Dosagem do peróxido de hidrogênio

O ensaio para a determinação da concentração do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é baseado na oxidação do vermelho de fenol mediada pela peroxidase de rabanete (HRPO), levando à formação de um composto que absorve à 610 nm. Fatias de tecido cardíaco foram

incubadas por 60 minutos à 37°C em um tampão fosfato 10 mmol/L (NaCl 140 mmol/L e dextrose 5 mmol/L). Após, foi retirada uma alíquota do líquido de incubação, sendo acrescentado nessa, o vermelho de fenol (0,28 mmol/L) e HRPO (8,5 U/ml). Após 5 minutos, adicionou-se NaOH (1 mol/L) para ser feita a quantificação. Os resultados foram expressos em nmoles de H₂O₂/grama de tecido (Pick & Keisari, 1980).

4.11. Avaliação da glutathiona reduzida e oxidada

A razão entre a concentração da glutathiona reduzida e oxidada (GSH/GSSG) foi determinada através da avaliação da concentração da glutathiona total e da sua forma oxidada no tecido cardíaco como descrito por Akerboom & Sies (1981). Para determinar a concentração total de glutathiona, o tecido foi desproteínezado com ácido perclórico 2 mol/L, centrifugado por 10 minutos 1000g e o sobrenadante foi neutralizado com hidróxido de potássio 2 mol/L. O ensaio foi realizado adicionando à amostra uma solução de tampão fosfato 100 mmol/L (pH 7,2), NADPH 2 mmol/L, glutathiona redutase 0,2 U/mL e 5'5 ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) 70 µmol/L. Para determinar a glutathiona oxidada, adicionou-se ao sobrenadante 20 mmol/L de N-etilmaleimida (NEM) e, após, as amostras foram neutralizadas com hidróxido de potássio 2 mol/L. Após essa etapa, seguiu-se o mesmo procedimento de ensaio utilizado para a glutathiona total. A leitura foi feita com um comprimento de onda de 412 nm. Os valores foram expressos em mmol/grama de tecido.

4.12. Expressão protéica por Western blot

A expressão das proteínas da Tiorredoxina-1, Nrf-2, Akt-1, ERK 1/2, JNK, AIF, Bcl-2, Bax e caspase 3, foram mensurada por Western blot (método de imunodeteccção). Para tanto, uma fatia do coração (100-150 mg) foi homogeneizada em tampão fosfato contendo 20 mmol/L de Tris, 150 mmol/L de NaCl, 5 mmol/L de EDTA, glicerol 10%, 20 µmol/L de PMSF usando um homogeneizador Politron por 40 segundos. As concentrações de proteínas foram analisadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976), e utilizadas para normalizar a quantidade de proteína. 100µg de proteína foram utilizadas para a eletroforese em gel monodimensional de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) em um sistema descontínuo usando gel 8-12%. As proteínas separadas foram, em seguida, transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando tampão contendo Tris 20 mmol/L, glicina 150 mmol/L, metanol 20% (v/v), SDS 0,02% (p/v) (pH 8,2) em uma unidade de transferência Bio-Rad resfriada. Após, os sítios de proteínas inespecíficos foram bloqueados por 1 hora de incubação com solução bloqueadora (5% (p/v) de leite desnatado) em tampão Tris salina 0,1% (p/v), tween-20. As membranas foram processadas por imuno-deteccção utilizando os anticorpos primários apresentados na **tabela 1**. Como anticorpos secundários, foram utilizados os anticorpos anti-cabra e anti-camundongo conjugados com peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e o anticorpo anti-coelho conjugado com peroxidase (Cell Signaling, Danvers, MA, USA). As membranas foram reveladas por quimiluminescência. Os filmes autorradiográficos foram analisados e quantificados através de um densitômetro de imagem (Imagemaster VDS CI, Amersham Biosciences Europe, IT). Os pesos moleculares das bandas de proteínas foram determinados utilizando como referencia um padrão de peso molecular (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad, CA, USA). Os resultados foram normalizados através do método do Ponceau (Klein *et at*, 1995).

Tabela 1 - Lista de anticorpos primários utilizados para a análise de expressão protéica por Western blot.

Proteínas Analisadas	Origem	Peso molecular
Tiorredoxina-1	Santa Cruz (SC - 13526)	50-55 kDa
Nrf-2	Santa Cruz (SC - 722)	57 kDa
Akt 1/2/3 total	Santa Cruz (SC - 8312)	60 kDa
p-Akt 1/2/3 (Ser ⁴⁷³)	Santa Cruz (SC - 7985-R)	60 kDa
ERK 1/2 total	Santa Cruz (SC - 93)	42/44 kDa
p-ERK 1/2 (Tyr ²⁰⁴)	Santa Cruz (SC - 7383)	42/44 kDa
AIF	Milipore (AB 16502)	67 kDa
JNK total	Santa Cruz (SC - 571)	46/54 kDa
p-JNK (Thr ¹⁸³ /Tyr ¹⁸⁵)	Santa Cruz (SC - 12882)	46/54 kDa
Bcl-2	Cell Signaling (2876)	28 kDa
Bax	Cell Signaling (2772)	20 kDa
Caspase-3	Cell Signaling (9662)	17/19/35 kDa

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com base na análise dos resultados, foram calculadas as médias e os desvios padrões para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados. Como os dados apresentam distribuição normal, foi aplicada a Análise de Variância (ANOVA) de uma via para a comparação entre os grupos, complementado com o teste *Student-Newmann-Keuls*. A correlação entre as variáveis foi analisada pela correlação de Pearson (GraphPad InStat, versão 3.0). As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Morfometria e remodelamento cardíaco no hipertireoidismo

A administração de L-tiroxina durante duas semanas de tratamento elevou os níveis plasmáticos dos hormônios da tireóide. Os níveis do hormônio T4 aumentaram 315% no grupo T4 e 219% no grupo T4 + Vit E, em comparação aos respectivos grupos controles eutireoideos. Foi observada mesma resposta e com maior diferença percentual nos níveis de T3, porém com uma redução significativa de 24% no grupo T4 + Vit E comparado ao grupo T4 (Tabela 2). Os animais hipertireoideos, mesmo apresentando um maior consumo de ração e água (dados não mostrados), tiveram seus pesos corporais reduzidos em 22% no grupo T4 e 16% no grupo T4 + Vit E, em relação aos respectivos grupos controles.

O grupo T4 apresentou hipertrofia cardíaca [Índice de Hipertrofia Cardíaca (IHC) 68% maior que o grupo controle], assim como o T4 + Vit E (IHC 48% maior que o grupo vitamina E), sendo significativa a redução observada no grupo T4 + Vit E quando comparada ao grupo T4 (redução 10% no IHC) (Tabela 2). Os índices de congestão pulmonar e hepática, não apresentaram diferença significativa entre os grupos hipertireoideos e eutireoideos.

Tabela 2: Concentração hormonal e parâmetros morfométricos após duas semanas de tratamento com L-tiroxina e/ou vitamina E.

	Controle	Vitamina E	T4	T4 + Vit E
T4 ($\mu\text{g/dL}$ soro)	5,3 \pm 0,4	6,0 \pm 0,7	22,0 \pm 3,7 *	19,1 \pm 3,5 ‡
T3 (ng/dL soro)	99 \pm 10	113 \pm 2	524 \pm 43 *	394 \pm 99 # ‡
Peso corporal (g)	299 \pm 27	289 \pm 21	235 \pm 14 *	242 \pm 13 ‡
Peso cardíaco (g)	0,72 \pm 0,07	0,71 \pm 0,07	0,95 \pm 0,11*	0,88 \pm 0,07 ‡
IHC (mg/g)	2,41 \pm 0,15	2,46 \pm 0,10	4,06 \pm 0,38 *	3,65 \pm 0,27 # ‡
Cong. Pulmonar (g/g)	3,4 \pm 0,4	3,7 \pm 0,4	3,5 \pm 0,3	3,9 \pm 0,6
Cong. Hepática (g/g)	3,0 \pm 0,1	3,2 \pm 0,1	3,0 \pm 0,3	3,2 \pm 0,2

IHC: Índice de Hipertrofia cardíaca (peso cardíaco/peso corporal); Congestão Pulmonar (peso úmido/ peso seco); Congestão Hepática (peso úmido/ peso seco). Valores expressos como média \pm DP, número amostral de 7, 7, 6 e 6, respectivamente. Valores dos hormônios T4 e T3 com número amostral de 3 animais por grupo.

* $p \leq 0,01$ versus controle; # $p \leq 0,05$ versus T4; ‡ $p \leq 0,05$ versus vitamina E;

6.2. Parâmetros de estresse oxidativo

No tecido cardíaco, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de glutathiona reduzida (GSH) entre os diferentes grupos (Tabela 3). No entanto, ocorreu um aumento de 33% nos níveis de glutathiona oxidada (GSSG) no grupo T4 em comparação ao grupo controle, sendo esses níveis reduzidos significativamente (27%) no grupo T4 + Vit E em comparação ao T4 (Tabela 3). A razão GSH/GSSG, representando o estado redox do tecido cardíaco, apresentou redução significativa de 28% no grupo T4 em relação ao grupo controle, não sendo significativo o aumento observado no grupo T4 + Vit E quando comparado ao grupo T4 (Tabela 3). Houve correlação negativa entre o IHC e a razão GSH/GSSG ($r = -0,63$; $p < 0,01$) (Figura 5).

A atividade da tiorredoxina redutase apresentou aumento significativo no grupo vitamina E em comparação ao grupo Controle (21%) e ao grupo T4 + Vit E (38%) (Tabela 3). Os níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) tiveram um aumento significativo de 43% no grupo T4 quando comparado ao grupo controle, sendo que estes níveis retornaram aos valores dos animais controle no grupo T4 + Vit E (redução de 30% em relação ao grupo T4) (Tabela 3).

Tabela 3: Concentração da glutatona, estado redox (razão GSH/GSSG), atividade da enzima tiorredoxina redutase e níveis de peróxido de hidrogênio após duas semanas de tratamento com L-tiroxina e/ou Vitamina E.

	Controle	Vitamina E	T4	T4 + Vit E
GSH (μmol/g tecido)	272±51	290±57	262±34	284±33
GSSG (μmol/g tecido)	9,5±1,2	9,3±0,7	12,7±1,5 *	10,6±1,0 #
Razão GSH/GSSG	28,7±4,5	31,1±5,5	20,8±3,2 *	27,0±4,2
GSH + GSSG (μmol/g tecido)	282±51	300±57	275±34	295±33
Tiorredoxina redutase	24,1±3,6	29,1±2,9 *	21,9±2,1	21,1±2,8 ‡
H ₂ O ₂ (nmol/g tecido)	5,1±0,5	4,7±0,6	7,3±0,5 *	5,0±0,7 #

Valores expressos como média ± DP, número amostral de 6, 6, 4 e 4, respectivamente. Atividade da tiorredoxina redutase expressa na unidade de nmol/L/min/mg proteína.

* p<0,05 *versus* controle; # p< 0,05 *versus* T4; ‡ p<0,05 *versus* vitamina E.

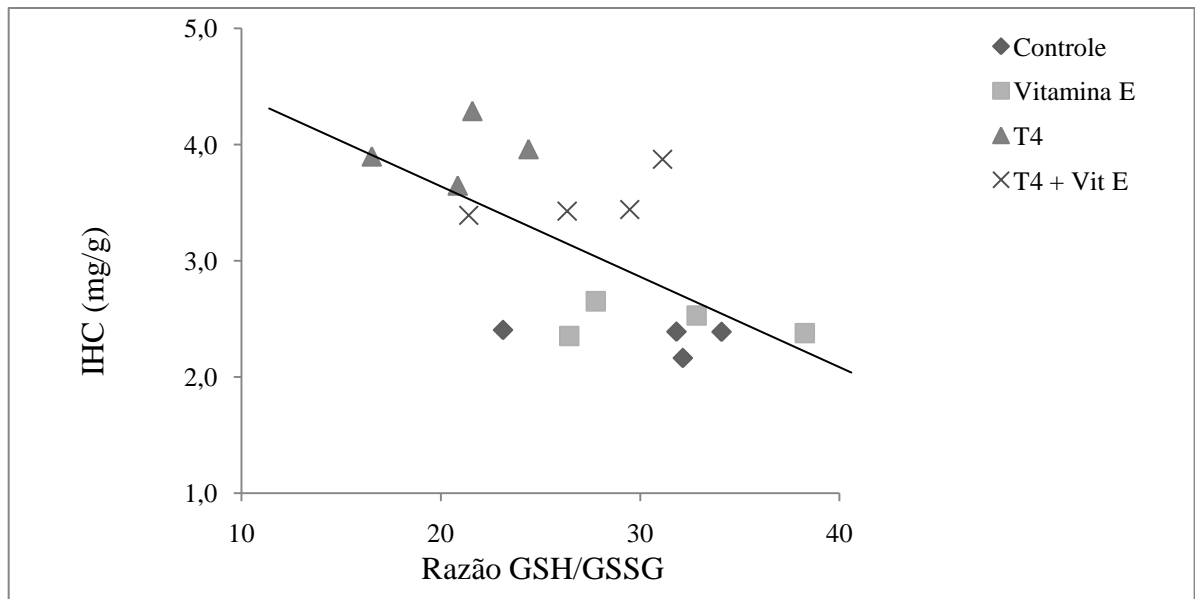


Figura 5: Correlação entre Índice de Hipertrofia Cardíaca (IHC) e razão GSH/GSSG, apresentando $r = -0,63$; $p < 0,01$.

6.3. Expressão de proteínas relacionadas com o sistema antioxidante

No período de duas semanas de tratamento com hormônio tireoidiano e vitamina E, não foram encontradas diferenças significativas na expressão da proteína Tiorredoxina 1 (Figura 6-A) e do fator de transcrição Nrf-2 (Figura 6-B).

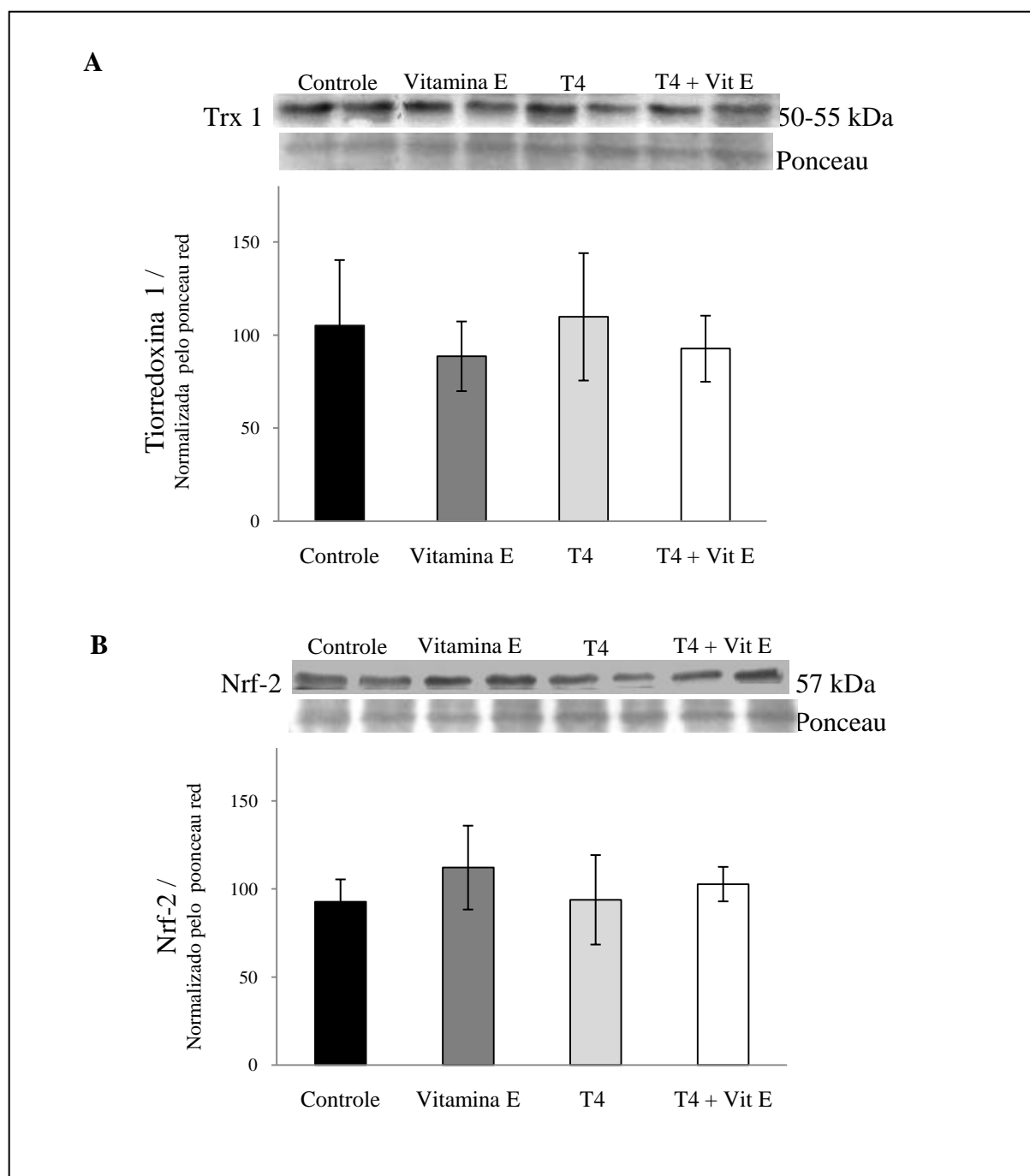


Figura 6: Expressão protéica analisada por Western Blot de homogeneizado cardíaco: (A) Tiorredoxina 1, (B) Nrf-2. Representação da imagem dos blots mostrando duas bandas para cada grupo experimental. Dados expressos como média \pm DP de 4 animais por grupo.

6.4. Expressão de proteínas relacionadas com sobrevivência/crescimento celular

A expressão da Akt total no grupo T4 apresentou uma redução significativa de 63% em relação ao grupo controle, assim como no T4 + Vit E, que reduziu 50% em relação ao grupo vitamina E, não havendo diferença entre os grupos hipertireoideos (Figura 7-A). Os níveis de fosforilação da Akt (p-Akt) apresentaram redução significativa nos grupos vitamina E (37%), T4 (53%) e T4 + Vit E (50%), quando comparados ao grupo controle (Figura 7-B). Apesar de se observar um aparente aumento na razão p-Akt/Akt total (Figura 7-C) nos grupos hipertireoideos em comparação aos grupos controles, esses não apresentam diferença significativa ($p= 0,09$). A razão p-Akt/Akt total correlacionou-se positivamente com o IHC ($r= 0,58$; $p<0,01$) (Figura 8).

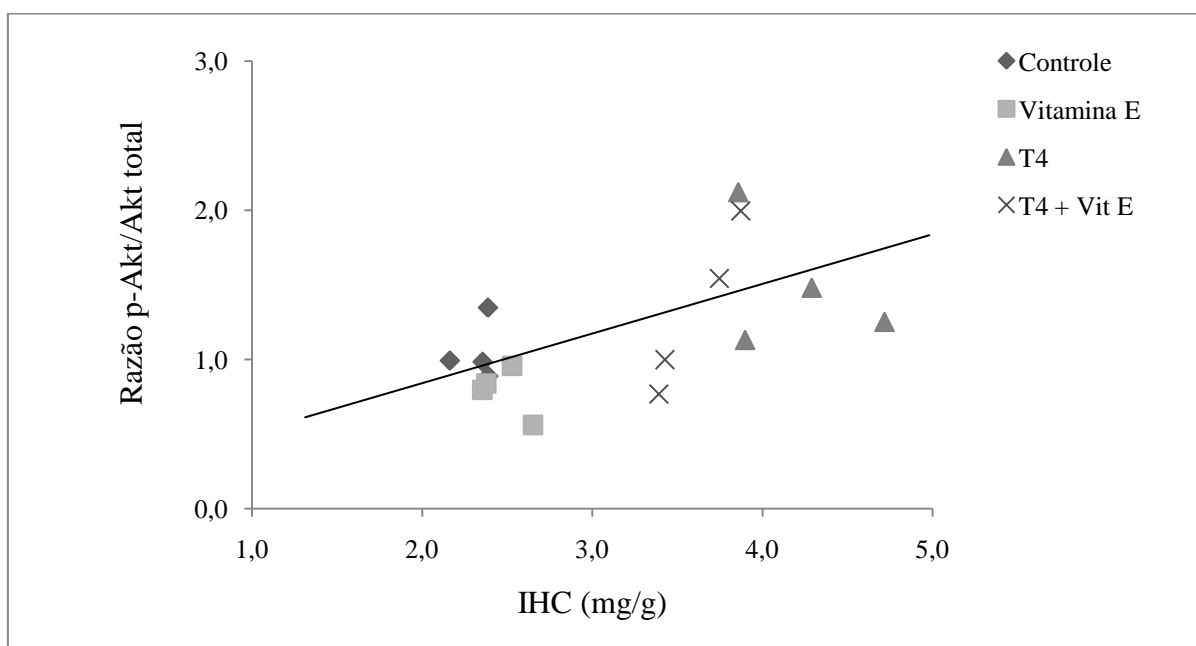


Figura 8: Correlação entre razão p-Akt/Akt total e o Índice de hipertrofia cardíaca (IHC), apresentando $r= 0,58$, $p<0,01$.

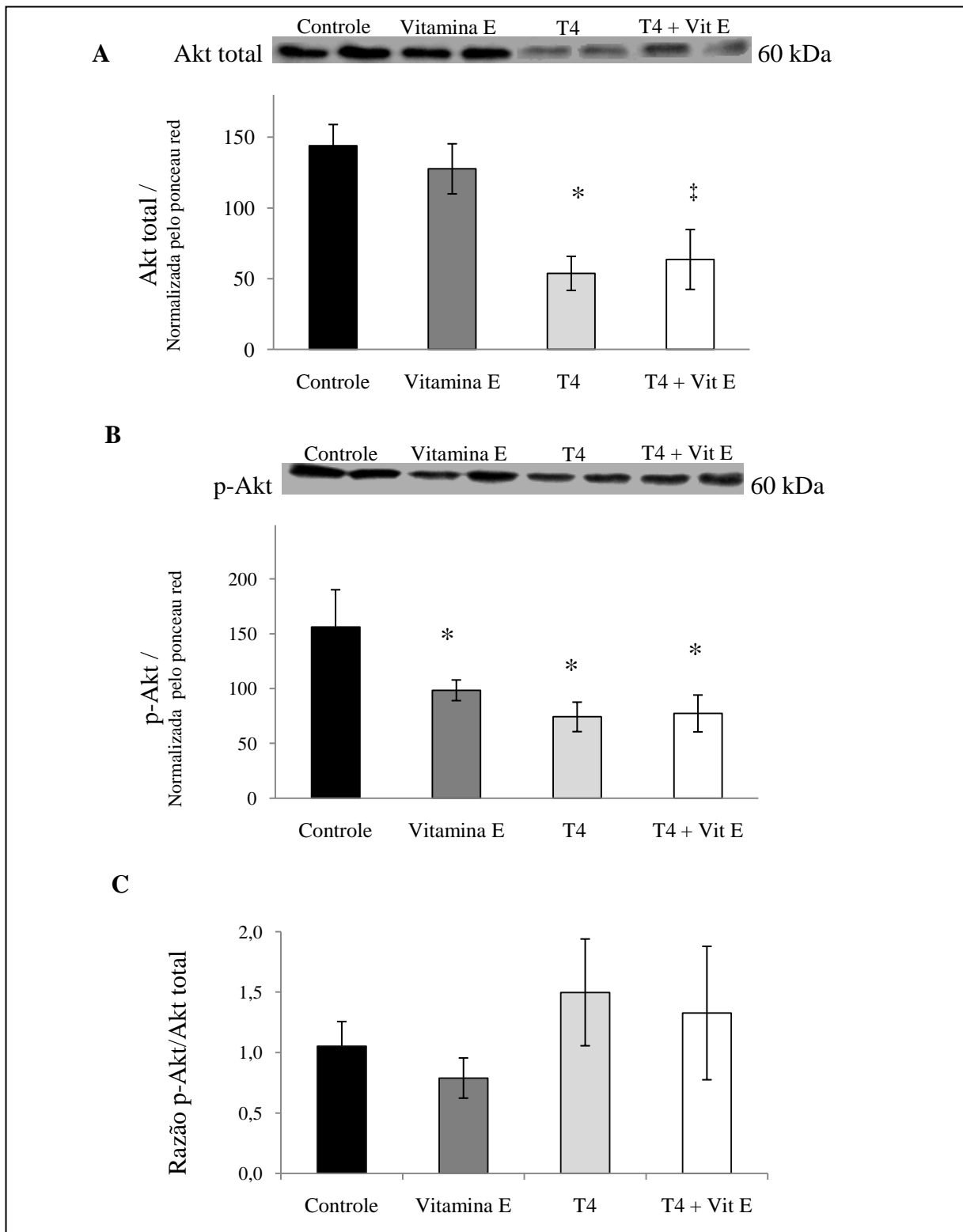


Figura 7: Expressão protéica analisada por Western Blot de homogeneizado cardíaco: (A) Akt total, (B) p-Akt, (C) razão p-Akt/Akt total. Representação da imagem dos blots mostrando duas bandas para cada grupo experimental. Dados expressos como média \pm DP de 4 animais por grupo.

* $p < 0,001$ versus controle; ‡ $p < 0,01$ versus vitamina E;

Mostrou-se correlação positiva entre a expressão da Akt-total e p-Akt com a razão GSH/GSSG, respectivamente representados nos figura 9 e 10, ambas com $r = 0,60$; $p < 0,05$.

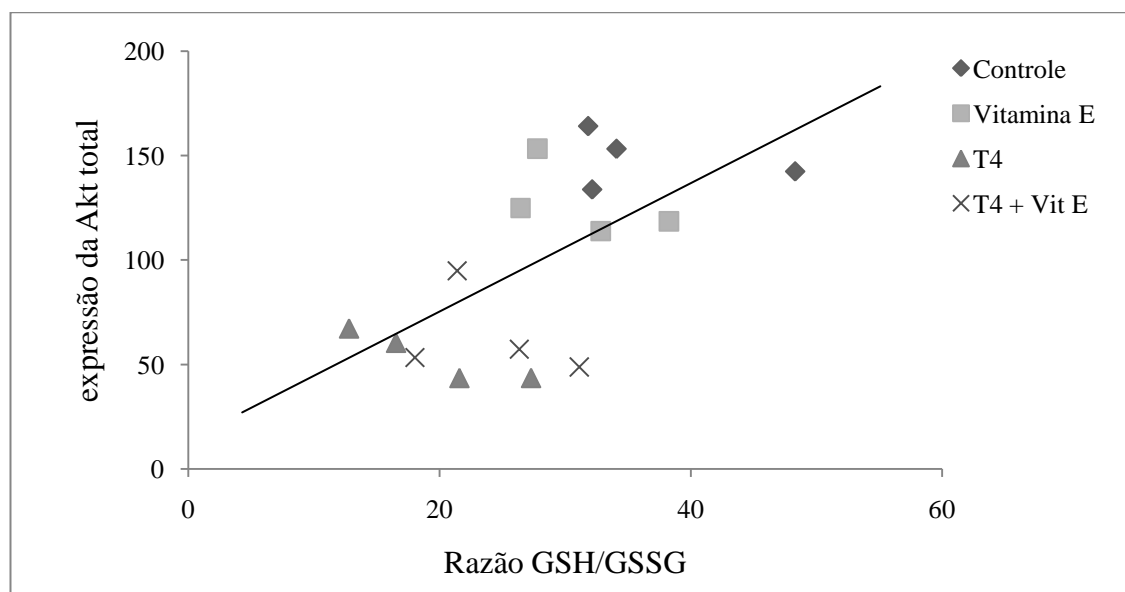


Figura 9: Correlação da expressão da Akt-total e a razão GSH/GSSG, com $r = 0,60$; $p < 0,05$.

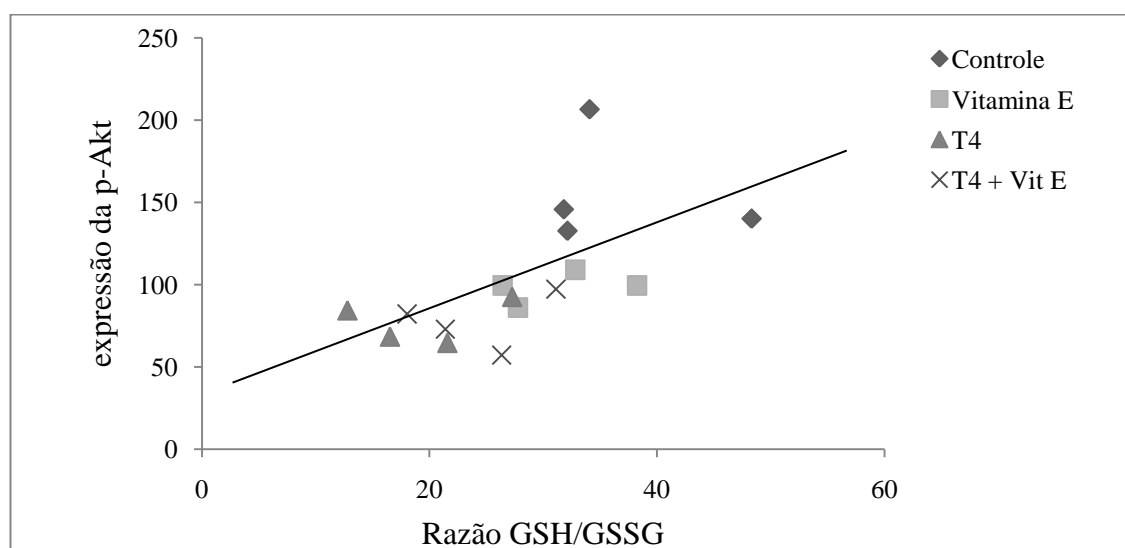


Figura 10: Correlação da expressão da p-Akt e a razão GSH/GSSG, com um $r = 0,60$; $p < 0,05$.

A expressão da ERK total, diferentemente da expressão da Akt total, não apresentou diferença significativa entre os grupos (Figura 11-A). A expressão da ERK fosforilada (p-ERK) aumentou significativamente nos grupos T4 (101%) e T4 + Vit E (85%) em comparação com seus respectivos controles (Figura 11-B). O nível de fosforilação da ERK

(razão p-ERK/ERK total) aumentou 200% no grupo T4 em comparação ao grupo controle, assim como no grupo T4 +Vit E em relação ao grupo vitamina E (65%) (Figura 11-C). Encontrada forte correlação positiva entre o nível de fosforilação da ERK com a hipertrofia cardíaca (IHC) ($r= 0,87$, $p<0,0001$) e negativa com o estado redox cardíaco (razão GSH/GSSG) ($r= -0,71$; $p<0,01$), mostrados nas figuras 12 e 13, respectivamente.

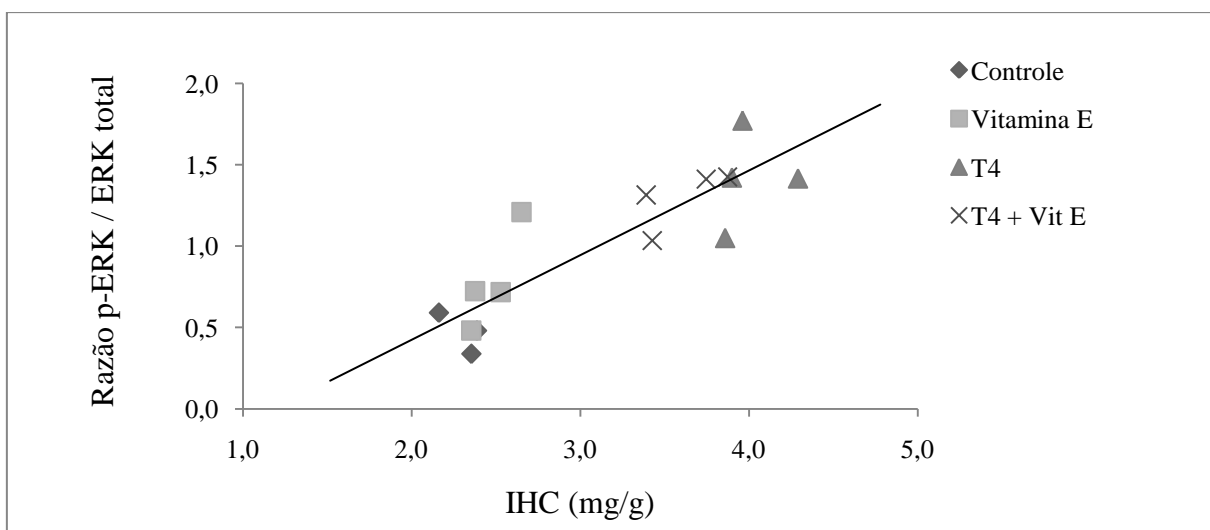


Figura 12: Correlação entre Razão da p-ERK/ERK total e o Índice de Hipertrofia Cardíaca (IHC), apresentando um $r= 0,87$; $p< 0,0001$.

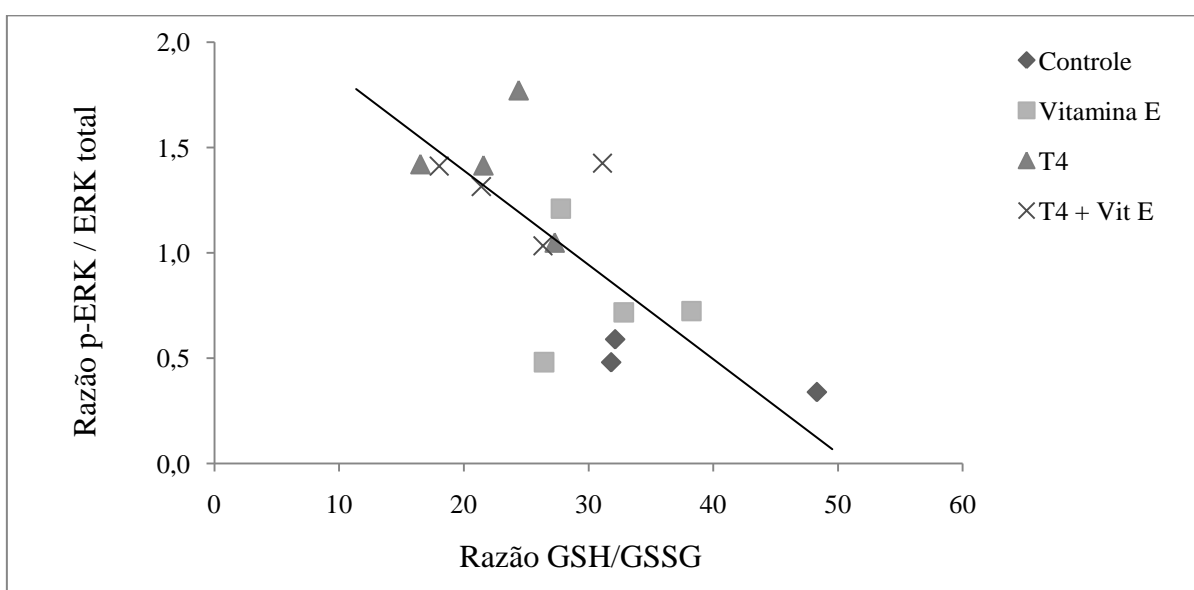


Figura 13: Correlação entre Razão da p-ERK/ERK total e a Razão da GSH/GSSG, apresentando um $r= -0,71$; $p< 0,01$.

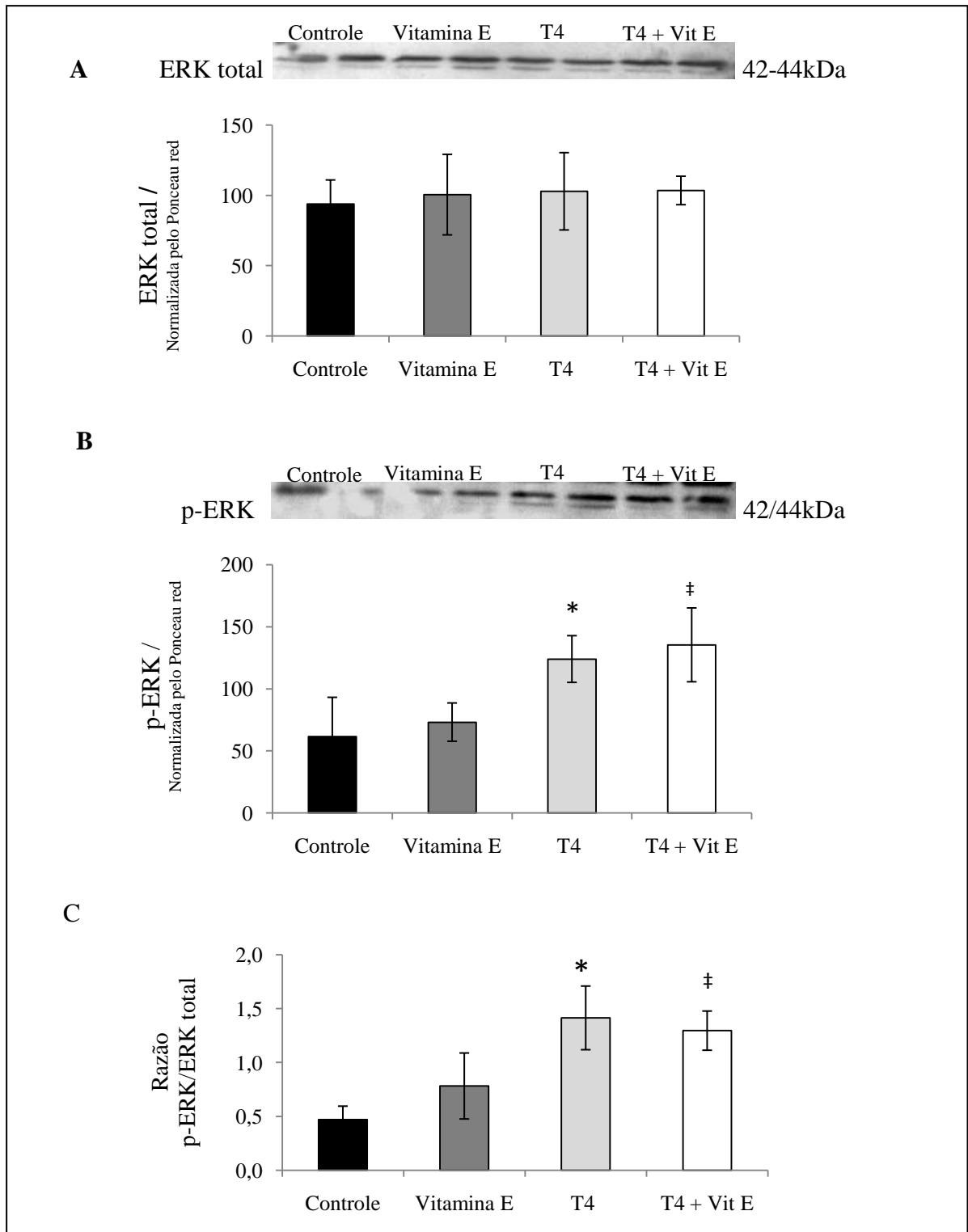


Figura 11: Expressão protéica analisada por Western Blot de homogeneizado cardíaco: (A) ERK total, (B) p-ERK, (C) razão p-ERK/ERK total. Representação da imagem dos blots mostrando duas bandas para cada grupo experimental. Dados expressos como média \pm DP de 4 animais por grupo.

* $p < 0,01$ versus Controle; ‡ $p \leq 0,05$ versus Vitamina E;

6.5. Expressão de proteínas relacionadas com morte celular

Ao final das duas semanas de tratamento, a expressão do AIF não apresentou diferença significativa entre os grupos (Figura 14).

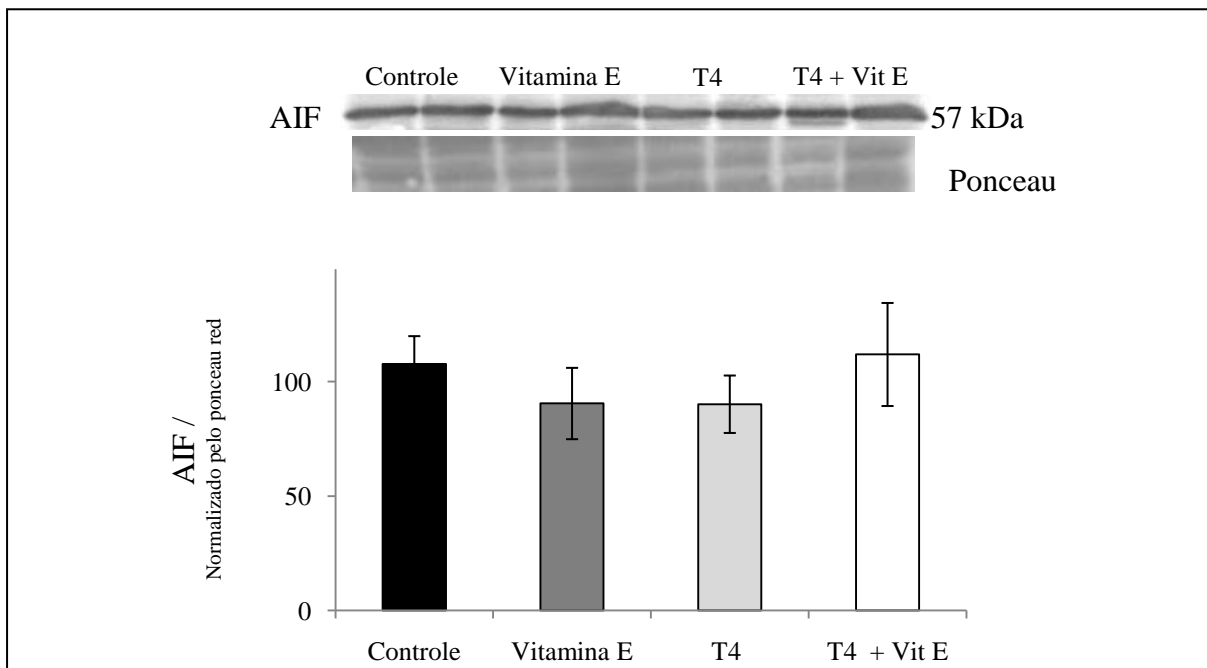


Figura 14: Expressão protéica analisada por Western Blot de homogeneizado cardíaco: AIF. Representação da imagem dos blots mostrando duas bandas para cada grupo experimental. Dados expressos como média \pm desvio padrão de 4 animais por grupo.

Assim como o AIF, não foram encontradas diferenças na expressão protéica da JNK total (Figura 15-A), na expressão da JNK fosforilada (p-JNK) (Figura 15-B) e no seu nível de fosforilação, representada pela razão p-JNK/JNK total (Figura 15-C).

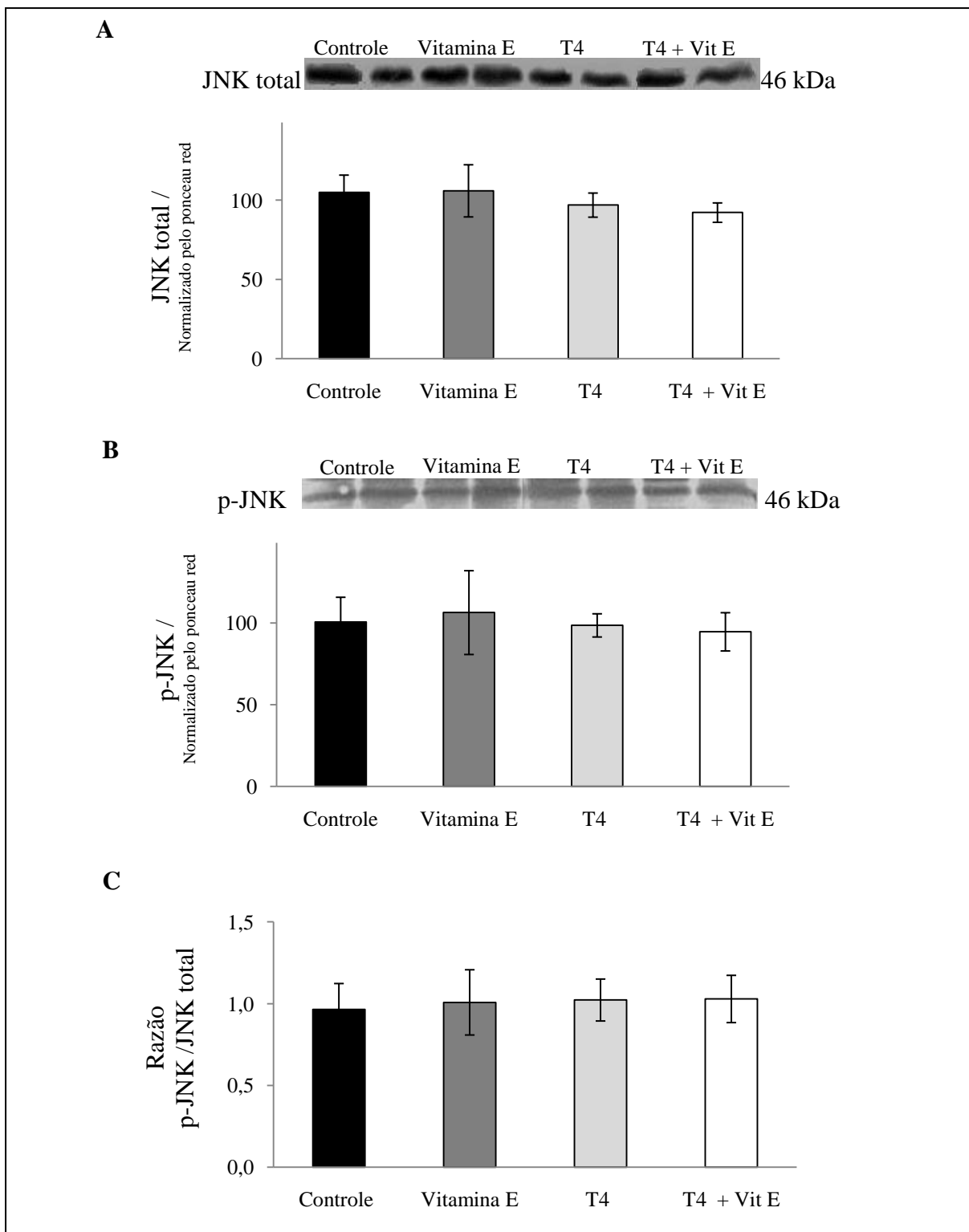


Figura 15: Expressão protéica analisada por Western Blot de homogeneizado cardíaco: (A) JNK total, (B) p-JNK e razão p-JNK/JNK total (C). Representação da imagem dos blots mostrando duas bandas para cada grupo experimental. Dados expressos como média \pm desvio padrão de 4 animais por grupo.

Analisando as proteínas da família das Bcl-2, a razão entre a expressão da Bax (pró-apoptótica) e Bcl-2 (anti-apoptótica) não apresentou diferença significativa entre os diferentes grupos nesse período de tratamento (Figura 16-A). A expressão da Caspase-3 apresentou aumento significativo de 53% no grupo T4 em comparação ao controle. (Figura 16-B). Mostrou-se correlação positiva entre a caspase-3 e a razão Bax/Bcl-2 ($r= 0,55$; $p< 0,05$) (Figura 17).

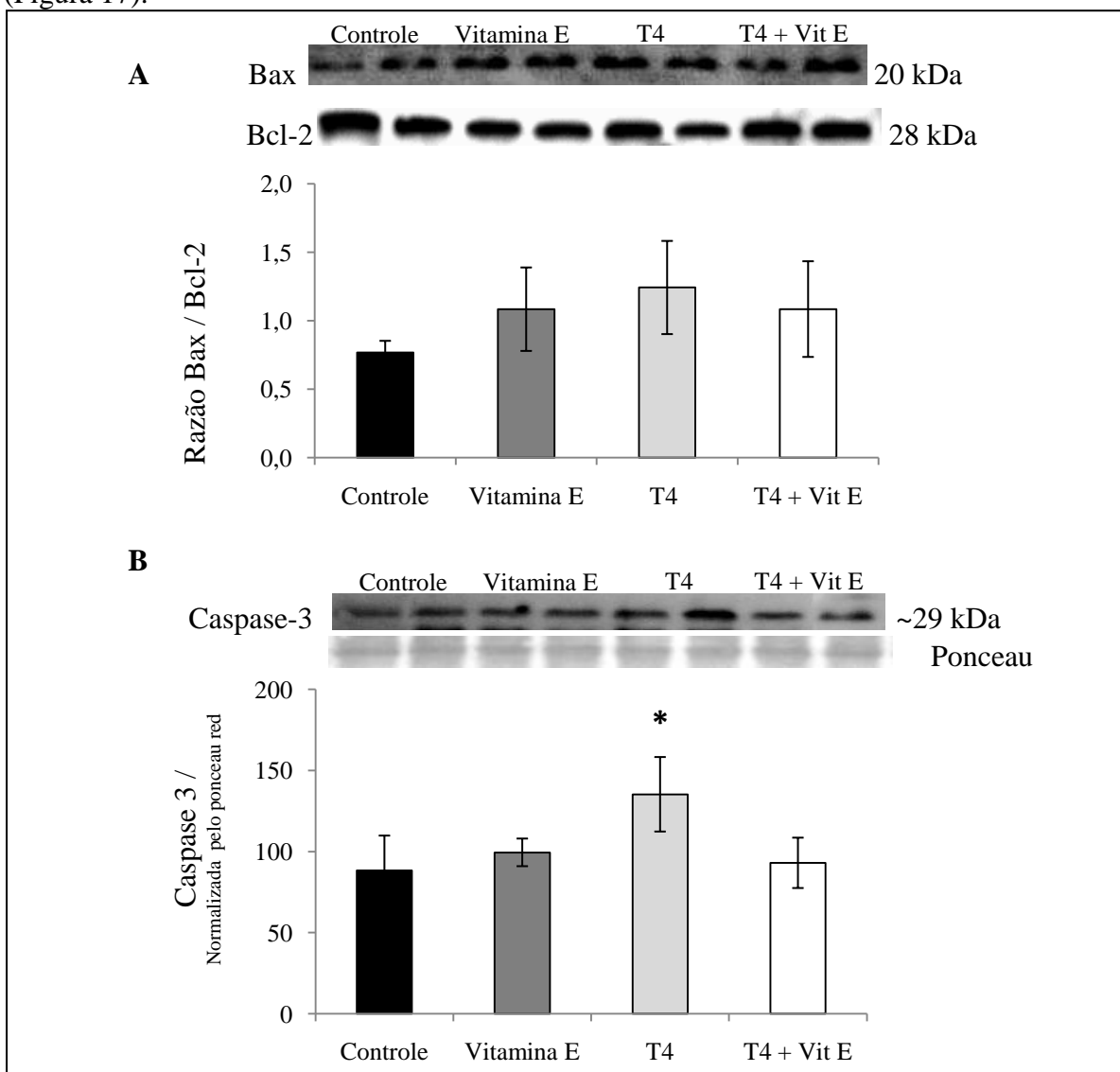


Figura 16: Expressão protéica analisada por Western Blot de homogeneizado cardíaco: (A) razão Bax/Bcl-2 e (B) Caspase-3. Representação da imagem dos blots mostrando duas bandas para cada grupo experimental. Dados expressos como média \pm DP de 4 animais por grupo. Na expressão da caspase-3, o grupo vitamina E apresenta uma média de 3 animais.

* $p< 0,05$ versus controle;

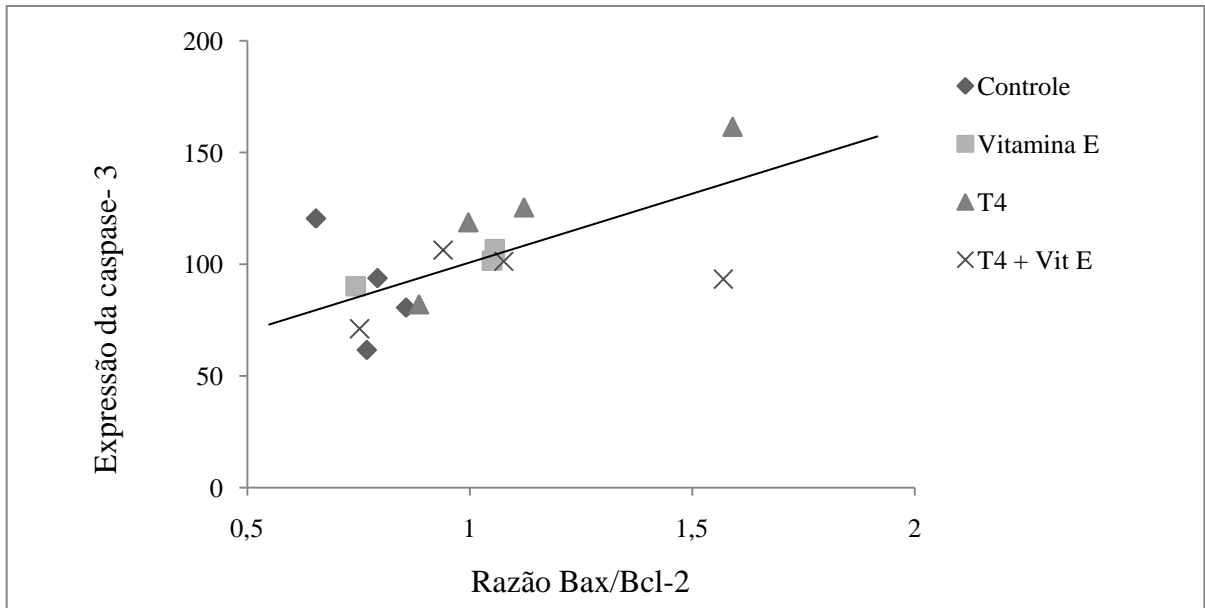


Figura 17: Correlação entre a expressão da caspase-3 e a razão da Bax/Bcl-2, apresentando um $r= 0,55$; $p< 0,05$.

7. DISCUSSÃO

A resposta hipertrófica cardíaca neste modelo experimental de hipertireoidismo apresentou associação com o estresse oxidativo, sugerindo que o estado redox está envolvido no processo de crescimento do tecido cardíaco induzido pelos hormônios da tireóide (HT). Os achados deste estudo sugerem que as vias de sinalização intracelular pró-sobrevivência participam desta resposta cardíaca, sendo que a fosforilação da ERK1/2 apresentou-se maior no tecido cardíaco neste modelo. Diferentemente, a Akt parece não estar ativada nesta janela temporal como é relatado pela literatura em outros protocolos experimentais de hipertireoidismo (Kuzman, 2007; Kenessey & Ojamaa, 2006). Neste período, não se observam alterações sobre vias de sinalização pró-apoptóticas. Neste trabalho, as proteínas de sobrevivência e crescimento celular avaliadas se correlacionaram com um importante indicador do estado oxidativo (razão GSH/GSSG), sugerindo que há uma associação entre a ativação dessas vias e o desbalanço redox, no coração de animais tratados com L-tiroxina.

Ao final dos quatorze dias de tratamento, foi confirmada a eficácia da indução do hipertireoidismo crônico através dos sinais característicos desta disfunção. Ocorreu elevação dos níveis séricos plasmáticos de T4 e T3, redução do peso corporal e crescimento da massa cardíaca nos animais tratados com o hormônio L-tiroxina. Os níveis hormonais foram quantificados em apenas 3 ratos por grupo para confirmarmos que estavam dentro do padrão esperado, uma vez que esse modelo vem sendo estudado pelo nosso grupo, onde já possuímos conhecimentos dos padrões dos parâmetros hemodinâmicos, morfométricos e bioquímicos da 1ª à 4ª semana de tratamento. A perda de peso ocorre devido à ação dos HT promovendo aumento da taxa metabólica basal em função da elevação do consumo de oxigênio (Dillmann, 2009). O aumento da massa cardíaca ocorre tanto em nível celular, pelo aumento do tamanho dos cardiomiócitos, como em nível do órgão, através do aumento e proliferação dos outros

tipos celulares (Ojamaa, 2009). Estudos pioneiros mostram que a hipertrofia induzida pelos HT resulta da maior síntese protéica devido ao aumento da atividade de tradução ribossomal e da quantidade de RNAm, promovendo o crescimento do órgão (Morgan *et al*, 1987). Há dois tipos de hipertrofia cardíaca: a do tipo concêntrica e a do tipo excêntrica. O hipertireoidismo parece promover ambos os padrões de hipertrofia (hipertrofia cardíaca mista), uma vez que gera aumento da síntese protéica, assim como sobrecarga de trabalho imposta ao coração. A sobrecarga de volume ocorre pelo efeito vasodilatador que os HT possuem na circulação periférica e pelo aumento do volume sanguíneo, elevando o retorno venoso para os ventrículos (Klein & Ojamaa, 2001). No entanto, em limitado período, o hipertireoidismo pode causar hipertrofia concêntrica, a qual ao longo do tempo pode evoluir para cardiomiopatia dilatada e consequentemente insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (Dillmann, 2009). Legaut *et al* (1990) mostraram que, após um período de tolerância inicial do sistema cardíaco, a combinação de hipertrofia cardíaca somada à sobrecarga de volume são as responsáveis por gerar a insuficiência cardíaca (IC).

A hipertrofia cardíaca é descrita como um fator de risco independente para o aumento da mortalidade nos seres humanos (Vakili *et al*, 2001). Entretanto, a resposta cardíaca aos HT tem sido definida como levando ao desenvolvimento da hipertrofia fisiológica (Kenessey & Ojamaa, 2006; Kuzman *et al*, 2005; Dillmann, 2009), a qual se caracteriza pela manutenção e/ou melhora da função de bomba cardíaca, sendo conhecida funcionalmente como uma resposta hipertrófica compensada. No entanto, no hipertireoidismo severo, esta hipertrofia não deve receber a mesma denominação, uma vez que o estímulo que induz o crescimento cardíaco é patológico e, consequentemente, pode levar à disfunção ventricular. Essa disfunção culmina em diminuição da função sistólica, resultando no desenvolvimento da IC. Como a hipertrofia é uma resposta adaptativa do miocárdio a uma sobrecarga de trabalho, uma vez sendo o estímulo do tipo patológico, inicialmente o coração responde de uma forma

compensada, conseqüentemente progredindo para o estado descompensado, resultando na sua disfunção (Wakatsuki *et al*, 2004).

Neste trabalho, a hipertrofia cardíaca não foi acompanhada pelos sinais de ICC como congestão hepática e pulmonar, sugerindo que o coração se encontra em um estágio de função ventricular compensada. Os sinais de congestão hepática e pulmonar são achados aceitos e muito utilizados tanto na clínica quanto em modelos experimentais para demonstrar o estado de função cardíaca (Flumignan *et al*, 2006; Khaper & Singal, 1997). Corrobora com isso, um estudo temporal realizado durante 28 dias de tratamento com mesmo modelo, em que os sinais de ICC surgiram apenas na última semana de tratamento (congestão de órgãos e elevação da PDFVE) (Araujo *et al*, 2006), mostrando que ao longo deste período o coração sofre um processo de descompensação cardíaca.

Em vários modelos de desenvolvimento de hipertrofia cardíaca, inclusive no hipertireoidismo, o estresse oxidativo e espécies ativas de oxigênio (EAO) participam como agentes reguladores deste fenótipo cardíaco (Araujo *et al*, 2008; Bertagnolli *et al*, 2008; Singal *et al*, 1999). Neste trabalho, mostramos que a hipertrofia cardíaca nos animais hipertireoideos foi reduzida quando administrada a vitamina E, um antioxidante clássico, confirmando que o estresse oxidativo pode estar envolvido no processo de remodelamento cardíaco observado neste modelo. Outro trabalho utilizando diferente antioxidante (resveratrol) demonstrou prevenir o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca patológica e disfunção contrátil em animais espontaneamente hipertensos (SHR, *spontaneous hypertensive rats*), sendo esse efeito cardioprotetor devido parcialmente à redução do estresse oxidativo (Thandapilly *et al*, 2009).

O desbalanço redox do tecido cardíaco foi observado nos animais hipertireoideos pela redução da razão GSH/GSSG, aumento da formação de glutatona oxidada (GSSG) e elevação da concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Há a ocorrência de estresse oxidativo uma

vez que os HT aumentam o consumo de oxigênio, levando a maior formação das EAO (Venditti & Di Meo, 2006). A elevação da produção de H_2O_2 no miocárdio induzida pelo hormônio T4 já tem sido bem descrita (Venditti & Di Meo, 2006; Araujo *et al*, 2008). Observamos também que o tratamento dos ratos hipertireoideos com a vitamina E foi capaz de reduzir o estresse oxidativo cardíaco, pela redução das concentrações dos produtos oxidativos GSSG e H_2O_2 . A vitamina E tem a capacidade de reduzir a formação de EAO, especialmente por neutralizar o radical superóxido (O_2^{\cdot}) (Navarro *et al*, 1998; Venditti *et al*, 2007), além de atuar na interrupção das reações em cadeia da lipoperoxidação (Halliwell, 2000). Cabe ressaltar que o desbalanço redox observado nesse trabalho parece não ser de grande magnitude, uma vez que no estudo de Araujo *et al* (2008), observou-se variação da razão GSH/GSSG de aproximadamente 80% entre os animais hipertireoideos e controles tratados por 28 dias, enquanto neste trabalho, a variação ficou ao redor dos 30%. Também nestes 14 dias, não foi observada alteração dos níveis da GSH entre os grupos, podendo ser isso explicado nos animais hipertireoideos pela maior capacidade de reciclar a GSH pela enzima glutathiona redutase. Estudos prévios já demonstraram que esta enzima, assim como outras enzimas antioxidantes, apresentam maior atividade enzimática na segunda semana de tratamento com L-tiroxina (Araujo *et al*, 2006). O desbalanço redox pode ser o responsável por modular a resposta hipertrófica, além de uma ação direta das EAO, como o H_2O_2 , nesse processo. Em nosso trabalho, foi observado correlação do índice de desbalanço redox (razão GSH/GSSG) com o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. Resultados de Araujo *et al* (2008) fortemente sugerem que o desbalanço redox e o H_2O_2 são possíveis mediadores da ativação de proteínas que sinalizam para crescimento celular associadas com a hipertrofia cardíaca e que serão discutidas abaixo.

A bem caracterizada ação dos HT sobre a expressão gênica (ação genômica) falha em explicar satisfatoriamente os efeitos sobre o crescimento dos cardiomiócitos (Kenessey &

Ojamaa, 2006; Ojamaa, 2009). Além desse mecanismo genômico, tem-se acumulado evidências mostrando que os HT não apenas funcionam na tradução ativa de proteínas, mas também atuam sobre os processos de sinalização iniciados no citoplasma e membrana plasmática, resultando nas respostas biológicas (Davis *et al*, 2008). Portanto, foi avaliada a participação das vias de sinalização da proteína cinase B (Akt) e das proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPKs, *mitogen-activated protein kinases*), cuja relação com o aumento da massa ventricular, em resposta a altos níveis de L-tiroxina, tem sido recentemente demonstrada em diferentes períodos e formas de indução do hipertireoidismo (Kuzman *et al*, 2007; Araujo *et al*, 2008).

Os dados da literatura demonstram que a via de sinalização da Akt modula o processo de hipertrofia cardíaca, estando relacionada, principalmente, com o tipo fisiológico de crescimento (Wakatsuki *et al*, 2004; DeBosch *et al*, 2006) e, se mostra implicada no mecanismo de ação não-genômica dos HT (Ojamaa, 2009; Diniz *et al*, 2009). Neste período de experimento, observamos uma diminuição da expressão da Akt total nos animais hipertireoideos, assim como uma redução na fosforilação da Akt (p-Akt). A redução observada na expressão da Akt total no nosso estudo, não havia sido demonstrada previamente e necessita ser investigada. Diniz *et al* (2009) observaram mesma redução na expressão da Akt total em cultura de cardiomiócitos tratados com T3 e que passaram pelo procedimento de silenciamento do receptor AT₁ (Ang II). É possível que esse método de silenciamento possa influenciar no citoesqueleto celular, sendo este importante para a manutenção dos níveis da Akt (Diniz *et al*, 2009). Flusberg *et al* (2001) observaram que parece ser importante o citoesqueleto intacto para a manutenção dos níveis de Akt. Ferreira *et al* (2003) mostraram que ocorre desorganização do citoesqueleto das células musculares cardíacas na segunda semana após a indução do hipertireoidismo em ratos Wistar, com tratamento de 0,1 mg/100g peso corporal com T4. A redução na expressão da p-Akt nos

animais tratados apenas com a vitamina E, está de acordo com os achados de Araujo *et al* (2008), que observaram semelhante resposta nesse mesmo grupo, em animais tratados por 28 dias. Kempná *et al* (2004) encontraram mesmo padrão de alteração da p-Akt com o uso de α -tocoferol, em células HMC-1, e mostraram ocorrer uma ação direta da vitamina E sobre a proteína, e não secundariamente pela sua ação na modificação do estado redox. No nosso estudo, houve também redução da p-Akt nos animais hipertireoideos. Sabe-se que o estresse oxidativo é capaz de modificar o nível de fosforilação da Akt, uma vez que ela e proteínas *upstream* da via são moléculas redox-sensíveis (Trachootham *et al*, 2008). Esse poderia ser o motivo de ocorrer diminuição da fosforilação da Akt nos animais do grupo T4. Esta ideia é sugerida uma vez que foi observada correlação entre esses achados (razão GSH/GSSG com p-Akt, figura 10). Essa redução da expressão da p-Akt em ambos os grupos hipertireoideos, pode ser devido à diminuição encontrada do conteúdo da Akt total. Kuzman e colaboradores (2007), em um estudo temporal com animais tratados com L-T4, mostraram que não há aumento da taxa de fosforilação da Akt (p-Akt/Akt total) na fase de 14 dias. Em parte, os achados de Kuzman vão ao encontro de nossos resultados, uma vez que a relação p-Akt/Akt total não apresentou diferença no grupo T4, neste período de tratamento.

Uma vez que se observou diminuição da fosforilação da Akt, poderia haver outras vias sendo recrutadas para a resposta cardíaca hipertrófica induzida pelos HT. Por isso, investigamos a expressão da ERK 1/2 e JNK que fazem parte da família das proteínas das MAPK, as quais são importantes mediadoras do crescimento cardíaco (Heineke & Molkentin, 2006). A via de sinalização da ERK 1/2, quando ativada isoladamente ou em associação com a via da Akt, está relacionada principalmente com a estimulação da hipertrofia fisiológica. No entanto, quando ocorre a ativação conjunta das proteínas da família das MAPKs (ERK 1/2, JNK e/ou p38), essas se correlacionam com o desenvolvimento do tipo patológico de hipertrofia (Wakatsuki *et al*, 2004). Neste período de tratamento, observamos maior expressão

protéica da ERK1/2 fosforilada nos grupos hipertireoideos, sugerindo que esta via seria uma das responsáveis por estimular o crescimento dos cardiomiócitos. Diferentemente, a expressão da JNK não apresentou variações entre os grupos, fortalecendo a conclusão de que os HT sinalizam, principalmente, para o crescimento fisiológico dos cardiomiócitos. Semelhante resultado foi observado por Kuzman *et al* (2005). Outros experimentos utilizando HT mostraram que, em fases iniciais do desenvolvimento hipertrófico, a via da Akt se mostra mais ativa, sendo acompanhado depois pelo aumento da atividade da ERK (Kuzman *et al*, 2007). Além dos HT atuarem sobre seus receptores intracelulares presentes na membrana plasmática e citoplasma, recentemente Bergh *et al*, (2005) identificaram que a proteína integrina $\alpha V\beta 3$, presente nas membranas de células endoteliais, interage com os HT, e isso resulta em rápida fosforilação da ERK1/2 (Davis et al, 2000). Ojamaa (2009) cita que o hormônio T4 (T3 com baixa afinidade) atua sobre $\alpha V\beta 3$, fosforilando a ERK1/2 a qual, subsequentemente, promove a translocação do receptor RT $\beta 1$ para o núcleo, aumentando sua atividade de transcrição gênica. Em adição, a forte correlação positiva entre o índice de hipertrofia cardíaca (IHC) e o nível de fosforilação da ERK (razão p-Erk/Erk total) encontrada em nosso estudo, reforça seu papel como uma importante via de sinalização para a hipertrofia neste modelo experimental.

Além da ação direta dos HT sobre a modulação dessas vias de sinalização, o estado redox parece atuar como um coadjuvante nesses processos, uma vez que muitas destas proteínas apresentam susceptibilidade a modificações redox (Trachootham *et al*, 2008; Araujo *et al*, 2008). Como o foco deste trabalho foi analisar o papel do estresse oxidativo como provável modulador e sinalizador de vias para hipertrofia cardíaca no hipertireoidismo, tínhamos a necessidade de analisarmos marcadores do ambiente redox no tecido cardíaco. Para isso, analisamos componentes do sistema da glutatona e da tiorredoxina, que são os principais mantenedores do ambiente redox intracelular (Maulik & Das, 2008). Dröge (2002),

em uma revisão, mostrou que o estado redox intracelular tiol/dissulfeto (-SH/-SS-) também atua sobre essas sinalizações, assim como o H₂O₂, uma EAO que já está bem caracterizada por disparar vias e proteínas de sinalização redox sensíveis (Stone & Yang, 2006). Nós observamos que há correlações significativas entre as proteínas ERK1/2 e Akt apenas com o indicador do estado redox GSH/GSSG, e não com as concentrações de H₂O₂. Acreditamos que, nesse período, o desbalanço redox é o provável agente que pode estar contribuindo com as respostas destas proteínas.

Como já citado anteriormente, o gradiente de variação da razão GSH/GSSG parece pequeno entre os diferentes grupos, assim como houve a manutenção das concentrações de GSH no coração desses animais, sugerindo um grau moderado de estresse oxidativo. Quando avaliamos os componentes do sistema Tiorredoxina, os resultados não mostraram diferença na atividade da enzima Tiorredoxina redutase (TrxR) e na expressão da proteína Trx-1. O sistema da Trx é mais efetivo na redução de proteínas dissulfídicas, enquanto o sistema da GSH é considerado mais efetivo na redução de pequenas moléculas dissulfídicas e EAO. Provavelmente nesse período de duas semanas, o grau de oxidação de proteínas nos animais T4 pode não ser significativo ao ponto de ativar a oxidação das cisteínas da Trx-1, uma vez que este é um dos estímulos importantes para este sistema (Winyard *et al*, 2005; Hansen *et al*, 2004). Araujo *et al* (2008) observaram aumento da oxidação de proteínas (carbonilas) no estágio de ICC nesse modelo (quarta semana). Além da ação antioxidante, a tiorredoxina atua sobre a hipertrofia cardíaca, sendo que esta é estimulada na situação de inibição da Trx-1 (Yamamoto *et al*, 2003).

Poderíamos esperar uma maior atividade da TrxR no grupo T4, uma vez que esse apresenta estresse oxidativo, e que, provavelmente, estaria a Trx sofrendo oxidação (Trx-SS) para manter o ambiente reduzido, uma vez que ocorreu com a maior formação de GSSG. No entanto, Jones (2006) deixa bem claro que os sistemas de defesa antioxidantes podem ser

ativados independentemente para combater um distúrbio redox. Esse autor mostra que a GSH, a Trx e as Cisteínas (Cis/Cis-SS, outro grande sistema tiol/dissulfeto celular) não estão em equilíbrio e são controlados independentemente um do outro (Jones, 2006).

Níveis intracelulares de tiol/dissulfeto podem ser controlados por fatores de transcrição responsivos ao estresse oxidativo como o Nrf-2 (Qiang *et al*, 2004). Nossos resultados também não apresentaram variações na expressão do Nrf-2. Ambas GSH e Trx-1 atuam, independentemente, sobre a sinalização do Nrf-2, sendo que a concentração de GSH e/ou razão GSH/GSSG, são de fato os determinantes da dissociação e translocação deste fator de transcrição para o núcleo. Já a Trx-1 não atua nesses processos, mas sim sobre os ARE (elementos responsivos a antioxidantes), locais no DNA onde o Nrf-2 se liga para iniciar a transcrição de genes antioxidantes (Hansen *et al*, 2004). Uma vez que encontramos leve alteração na razão GSH/GSSG nos animais hipertireoideos, pode não ter havido estímulo suficiente para ativação do Nrf-2. Desta forma, também não se mostrou aumento da expressão da Trx-1, cuja expressão gênica é dependente do Nrf-2 (Vicent *et al*, 2009). Em trabalhos do nosso laboratório, ainda não publicados, com mesmo modelo experimental no período de 28 dias, além de mostrar elevado desbalanço redox, observou-se aumento da expressão do Nrf-2, assim como da Trx-1, fortalecendo a dependência do nível de desbalanço redox com a atividade dos sistemas antioxidantes da GSH e Trx-1. Mesmo ocorrendo estresse oxidativo no grupo T4, observado pelo aumento dos níveis de H₂O₂, importante ativador do Nrf-2, sua ativação parece também ser dependente da Akt, a qual atua inibindo a GSK-3 β , permitindo a translocação do Nrf-2 para o núcleo, onde se liga aos elementos responsivos para genes antioxidantes (Piantadosi *et al*, 2008). Como, no presente estudo, ocorreu diminuição dos níveis de fosforilação da Akt, este pode ser um fator que controlaria adicionalmente a resposta do Nrf-2.

Já está estabelecido que o severo desbalanço redox, assim como altos níveis de EAO, são capazes de disparar morte celular programada (apoptose) em diversos órgãos e situações patológicas (Ryter *et al*, 2007). No coração, essa perda do número celular ganha magnitude preocupante por favorecer o desenvolvimento de IC. No Brasil, de acordo com o DATASUS, ocorreram 340.000 admissões hospitalares no ano de 2004 de pacientes com IC (Latado *et al*, 2006), sendo que no mundo, ela é o maior problema de saúde pública. Pesquisando a disfunção ventricular do hipertireoidismo, há poucos estudos analisando vias para a apoptose no tecido cardíaco. Na tireotoxicose, é comum disfunção hepática e, Kumar *et al* (2007), mostraram que a apoptose é ativada no fígado de ratos tratados com T3. Este é, provavelmente, o principal mecanismo causador da disfunção desse órgão, através da ativação das vias de apoptose pela mitocôndria (via intrínseca) e pelos receptores de morte (via extrínseca). Neste período de 14 dias de tratamento com T4, não foi observado aumento da razão Bax/Bcl-2. A razão entre a proteína pró-apoptótica (Bax) com a anti-apoptótica (Bcl-2) regula a integridade mitocondrial e sobrevivência por controlar a permeabilidade da membrana mitocondrial (Bishopric *et al*, 2001). A perda desta estabilidade promove a formação de poros de liberação de citocromo-*c*, o qual forma no citoplasma os apoptossomos, complexos que subsequentemente ativam caspase-9 e caspase-3, efetoras do processo de morte celular programada (Kwak *et al*, 2006). No entanto, encontramos aumento da expressão protéica da caspase-3, a qual se correlacionou significativamente com esse parâmetro que identifica estabilidade mitocondrial. A caspase-3 pode estar sendo estimulada via mecanismo intrínseco apoptótico, porém a permeabilidade mitocondrial parece estar normalizada, levando-nos a supor que receptores de morte celular podem estar sendo recrutados para essa resposta (Kumar *et al*, 2007).

Além de proteínas apoptóticas dependentes de caspase, analisamos, neste modelo, proteínas que sinalizam para a morte celular programada independente de caspases, como o

fator indutor de apoptose (*apoptosis-inducing factor*, AIF). Nessa fase, não foi observada alteração do AIF nos diferentes grupos. Trabalhos mostram que a ativação destas vias apoptóticas ocorre tardiamente, contribuindo para desenvolvimento da IC patológica (Siu *et al*, 2007). Essa não variação da expressão do AIF, assim como a manutenção da estrutura mitocondrial em trabalhos utilizando HT em períodos semelhantes de tratamento (Hu *et al*, 2005; Ferreira *et al*, 2003), reforçam a ideia de que a mitocôndria nesses corações tratados com HT não apresentam importantes alterações na sua estrutura. Em resumo, observamos que já pode ter ativação da sinalização de morte celular nesse modelo, a qual pode contribuir para a progressão da disfunção cardíaca, observada após quatro semanas no trabalho de Araujo *et al* (2006).

Os mecanismos exatos pelos quais a hipertrofia cardíaca é induzida pelos HT são ainda pouco entendidos, sendo que nos últimos anos iniciou-se um interesse sobre o entendimento destes. O tipo de crescimento cardíaco, seja ele fisiológico ou patológico, depende da ativação de vias de sinalização intracelulares características. Com isso, o entendimento das alterações moleculares e bioquímicas que ocorrem durante a hipertrofia, assim como da sua transição de um estágio compensado para o descompensado, pode contribuir diretamente para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para pacientes com IC. Para isso, futuros estudos *in vivo* e *in vitro* são necessários para analisarmos essas vias de sinalização que possuem ação sobre as respostas cardíacas, assim como para aprofundar os possíveis mecanismos da modulação redox das mesmas. Neste trabalho, foram estudadas proteínas envolvidas em duas importantes vias que atuam no tecido cardíaco, no entanto, não podemos esquecer de que há diversas outras vias que agem sobre esse órgão e que, podem estar contribuindo para essas respostas induzidas pelos hormônios da tireóide.

8. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, ao final dos 14 dias de tratamento com L-tiroxina, pode-se concluir que:

- 1- a resposta hipertrófica cardíaca parece estar com sua função compensada, sem sinais de insuficiência cardíaca;
- 2- a redução de GSSG e H₂O₂ promovida pela administração de vitamina E se mostrou associada à diminuição do crescimento da massa cardíaca nos animais hipertireoideos;
- 3- o sistema tiorredoxina não se mostrou fundamental para a manutenção do estado redox nesta fase;
- 4- a Akt parece não contribuir significativamente para a resposta hipertrófica nesse período de tratamento;
- 5- o aumento da fosforilação da proteína ERK1/2, associado a não ativação da JNK, poderia contribuir para a resposta trófica cardíaca compensada nos animais hipertireoideos;
- 6- há um provável início da ativação da via de morte celular dependente das caspases.

Os dados em conjunto reforçam a ideia de que, nessa fase, há moderado desbalanço redox cardíaco, sem haver início de sinalização que favoreça a hipertrofia cardíaca patológica, porém com provável início de sinalização apoptótica, a qual pode contribuir para o desenvolvimento de subsequente disfunção cardíaca.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ago T, Sadoshima J. **Thioredoxin and ventricular remodeling.** J Mol Cell Cardiol. 2006 Nov; 41(5):762-73.

Akerboom T, Sies H. **Assay glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples.** Meth Enzymol, 1981. 77: 373-82.

Araujo AS, Ribeiro MF, Enzweiler A, Schenkel P, Fernandes TR, Partata WA, Irigoyen MC, Llesuy S, Belló-Klein A. **Myocardial antioxidant enzyme activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism.** Mol Cell Endocrinol. 2006 Apr 25; 249(1-2):133-9.

Araujo AS, Enzweiler AT, Schenkel P, Fernandes TR, Ribeiro MF, Partata WA, Llesuy S, Belló-Klein A. **Oxidative stress activates insulin-like growth factor I receptor protein expression, mediating cardiac hypertrophy induced by thyroxine.** Mol Cell Biochem. 2007 Sep; 303(1-2):89-95.

Araujo AS, Schenkel P, Enzweiler AT, Fernandes TR, Partata WA, Llesuy S, Ribeiro MF, Khaper N, Singal PK, Belló-Klein A. **The role of redox signaling in cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism.** J Mol Endocrinol. 2008 Dec; 41(6):423-30.

Augusto O. **Radicais Livres: bons, maus e naturais.** São Paulo, 2006, Abril. Editora: Oficina de textos.

Baines CP, Molckentin JD. **STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis.** J Mol Cell Cardiol. 2005 Jan; 38(1):47-62.

Berenji K, Drazner MH, Rothermel BA, Hill JA. **Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure?** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005 Jul; 289(1):H8-H16

Bergh JJ, Lin HY, Lansing L, Mohamed SN, Davis FB, Mousa S, **Integrin alphaVbeta3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis.** Davis PJEndocrinology. 2005 Jul; 146(7):2864-71.

Bertagnolli M, Schenkel PC, Campos C, Mostarda CT, Casarini DE, Belló-Klein A, Irigoyen MC, Rigatto K. **Exercise training reduces sympathetic modulation on cardiovascular system and cardiac oxidative stress in spontaneously hypertensive rats.** Am J Hypertens. 2008 Nov; 21(11):1188-93.

Bishopric NH, Andreka P, Slepak T, Webster KA. **Molecular mechanisms of apoptosis in the cardiac myocyte.** *Curr Opin Pharmacol.* 2001 Apr; 1(2):141-50.

Bhuiyan MS, Fukunaga K. **Cardioprotection by vanadium compounds targeting Akt-mediated signaling.** *J Pharmacol Sci.* 2009 May; 110(1):1-13.

Bradford MM. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem.* 1976 May 7; 72:248-54.

Cai H, Li Z, Davis ME, Kanner W, Harrison DG, Dudley SC Jr. **Akt-dependent phosphorylation of serine 1179 and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 cooperatively mediate activation of the endothelial nitric-oxide synthase by hydrogen peroxide.** *Mol Pharmacol.* 2003 Feb; 63(2):325-31.

Clerk A, Cullingford TE, Fuller SJ, Giraldo A, Markou T, Pikkarainen S, Sugden PH. **Signaling pathways mediating cardiac myocyte gene expression in physiological and stress responses.** *J Cell Physiol.* 2007 Aug; 212(2):311-22.

Clerk A, Cullingford TE, Kemp TJ, Kennedy RA, Sugden PH. **Regulation of gene and protein expression in cardiac myocyte hypertrophy and apoptosis.** *Adv Enzyme Regul.* 2005; 45:94-111.

Cooper DS. **Hyperthyroidism.** *Lancet.* 2003 Aug 9; 362(9382):459-68.

Danzi S, Klein I. **Thyroid hormone and the cardiovascular system.** *Minerva Endocrinol.* 2004 Sep; 29(3):139-50.

Davis PJ, Leonard JL, Davis FB. **Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone.** *Front Neuroendocrinol.* 2008 May; 29(2):211-8.

Davis PJ, Shih A, Lin HY, Martino LJ, Davis FB. **Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR.** *J Biol Chem.* 2000 Dec 1; 275(48):38032-9.

DeBosch B, Treskov I, Lupu TS, Weinheimer C, Kovacs A, Courtois M, Muslin AJ. **Akt1 is required for physiological cardiac growth.** *Circulation.* 2006 May 2; 113(17):2097-104.

Dillmann W. **Cardiac hypertrophy and thyroid hormone signaling.** *Heart Fail Rev.* 2010 Mar; 15(2):125-32.

Dillmann WH. **Cellular action of thyroid hormone on the heart.** *Thyroid.* 2002 Jun; 12(6):447-52.

Diniz GP, Carneiro-Ramos MS, Barreto-Chaves ML. **Angiotensin type 1 receptor mediates thyroid hormone-induced cardiomyocyte hypertrophy through the Akt/GSK-3beta/mTOR signaling pathway.** Basic Res Cardiol. 2009 Nov; 104(6):653-67.

Dörr M, Wolff B, Robinson DM, John U, Lüdemann J, Meng W, Felix SB, Völzke H. **The association of thyroid function with cardiac mass and left ventricular hypertrophy.** J Clin Endocrinol Metab. 2005 Feb; 90(2):673-7.

Dröge W. **Free radicals in the physiological control of cell function.** Physiol Rev. 2002 Jan; 82(1):47-95.

Flumignan RL, Kanashiro RM, Saraiva RM, Portes LA, Antonio EL, Ishigai MM, Tucci PJ **Incidence of heart failure in infarcted rats that die spontaneously.** Braz J Med Biol Res. 2006 Oct; 39(10):1323-8.

Flusberg DA, Numaguchi Y, Ingber DE. **Cooperative control of Akt phosphorylation, bcl-2 expression, and apoptosis by cytoskeletal microfilaments and microtubules in capillary endothelial cells.** Mol Biol Cell. 2001 Oct; 12(10):3087-94.

Ferreira PJ, L'Abbate C, Abrahamsohn PA, Gouveia CA, Moriscot AS. **Temporal and topographic ultrastructural alterations of rat heart myofibrils caused by thyroid hormone.** Microsc Res Tech. 2003 Dec 1; 62(5):451-9.

Gago-Dominguez M, Castelao JE. **Role of lipid peroxidation and oxidative stress in the association between thyroid diseases and breast cancer.** Crit Rev Oncol Hematol. 2008 Nov; 68(2):107-14.

Giordano FJ. **Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure.** J Clin Invest. 2005 Mar; 115(3):500-8.

Halliwell B. **Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: How should we move forward?** Cardiovasc Res 2000; 47:410-18.

Hansen JM, Watson WH, Jones DP. **Compartmentation of Nrf-2 redox control: regulation of cytoplasmic activation by glutathione and DNA binding by thioredoxin-1.** Toxicol Sci. 2004 Nov;82(1):308-17.

Heineke J, Molkentin JD. **Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2006 Aug; 7(8):589-600.

Hill MF, Singal PK. **Right and left myocardial antioxidant responses during heart failure subsequent to myocardial infarction.** Circulation. 1997 Oct 7; 96(7):2414-20.

Holmgren SP, Huang DC, Adams JM, Cory S. **Survival activity of Bcl-2 homologs Bcl-w and A1 only partially correlates with their ability to bind pro-apoptotic family members.** Cell Death Differ. 1999 Jun; 6(6):525-32.

Holmgren A, Björnstedt M. **Thioredoxin and Thioredoxin reductase.** Methods Enzymol, 1995. 252: 199-208.

Hu LW, Benvenuti LA, Liberti EA, Carneiro-Ramos MS, Barreto-Chaves ML. **Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: influence of adrenergic nervous system versus renin-angiotensin system on myocyte remodeling.** Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2003 Dec; 285(6):R1473-80.

Hu LW, Liberti EA, Barreto-Chaves ML. **Myocardial ultrastructure in cardiac hypertrophy induced by thyroid hormone: an acute study in rats.** Virchows Arch. 2005 Mar; 446(3):265-9.

Johar S, Cave AC, Narayanapanicker A, Grieve DJ, Shah AM. **Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase.** FASEB J. 2006 Jul; 20(9):1546-8.

Jones DP. **Redefining Oxidative Stress.** Antioxid Redox Signal. 2006 Sep-Oct; 8(9-10):1865-79.

Joza N, Oudit GY, Brown D, Bénit P, Kassiri Z, Vahsen N, Benoit L, Patel MM, Nowikovsky K, Vassault A, Backx PH, Wada T, Kroemer G, Rustin P, Penninger JM. **Muscle-specific loss of apoptosis-inducing factor leads to mitochondrial dysfunction, skeletal muscle atrophy, and dilated cardiomyopathy.** Mol Cell Biol. 2005 Dec; 25(23):10261-72.

Khaper N, Singal PK. **Effects of afterload-reducing drugs on pathogenesis of antioxidant changes and congestive heart failure in rats.** J Am Coll Cardiol. 1997 Mar 15; 29(4):856-61.

Kenessey A, Ojamaa K. **Thyroid hormone stimulates protein synthesis in the cardiomyocyte by activating the Akt-mTOR and p70S6K pathways.** J Biol Chem. 2006 Jul 28; 281(30):20666-72.

Kempná P, Reiter E, Arock M, Azzi A, Zingg JM. **Inhibition of HMC-1 mast cell proliferation by vitamin E: involvement of the protein kinase B pathway.** J Biol Chem. 2004 Dec 3; 279(49):50700-9.

Klein I, Ojamaa K. **Thyroid hormone and the cardiovascular system.** N Engl J Med. 2001 Feb 15; 344(7):501-9.

Klein D, Kern RM, Sokol RZ. **A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes.** Biochem Mol Biol Int, 1995; 36(1): 59-66.

Kobayashi-Miura M, Shioji K, Hoshino Y, Masutani H, Nakamura H, Yodoi J. **Oxygen sensing and redox signaling: the role of thioredoxin in embryonic development and cardiac diseases.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 May; 292(5):H2040-50.

Kumar A, Sinha RA, Tiwari M, Singh R, Koji T, Manhas N, Rastogi L, Pal L, Shrivastava A, Sahu RP, Godbole MM. **Hyperthyroidism induces apoptosis in rat liver through activation of death receptor-mediated pathways.** *J Hepatol.* 2007 May; 46(5):888-98.

Kuzman JA, Vogelsang KA, Thomas TA, Gerdes AM. **L-Thyroxine activates Akt signaling in the heart.** *J Mol Cell Cardiol.* 2005 Aug; 39(2):251-8.

Kuzman JA, O'Connell TD, Gerdes AM. Mar 29. **Rapamycin prevents thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy.** *Endocrinology.* 2007 Jul; 148(7):3477-84.

Kwak HB, Song W, Lawler JM. **Exercise training attenuates age-induced elevation in Bax/Bcl-2 ratio, apoptosis, and remodeling in the rat heart.** *FASEB J.* 2006 Apr; 20(6):791-3.

Latado, AL, Passos LCS, Braga JCV, Santos A, Guedes R, Moura SS, Almeida D. **Preditores de letalidade hospitalar em pacientes com insuficiência cardíaca avançada.** *Arq Bras Cardiol.* 2006 Ago; 87(2):185-192.

Ladenson PW, Kieffer JD, Farwell AP, Ridgway EC. **Modulation of myocardial L-triiodothyronine receptors in normal, hypothyroid, and hyperthyroid rats.** *Metabolism.* 1986 Jan; 35(1):5-12.

Legault F, Rouleau JL, Juneau C, Rose C, Rakusan K. **Functional and morphological characteristics of compensated and decompensated cardiac hypertrophy in dogs with chronic infrarenal aorto-caval fistulas.** *Circ Res.* 1990 Mar; 66(3):846-59.

Li T, Danelisen I, Belló-Klein A, Singal PK. **Effects of probucol on changes of antioxidant enzymes in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats.** *Cardiovasc Res.* 2000 Jun; 46(3):523-30.

Liu H, Colavitti R, Rovira II, Finkel T. **Redox-dependent transcriptional regulation.** *Circ Res.* 2005 Nov 11; 97(10):967-74.

Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S. **Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice.** *Tumori.* 1985 Jun 30; 71(3):241-9.

López-Torres M, Romero M, Barja G. **Effect of thyroid hormones on mitochondrial oxygen free radical production and DNA oxidative damage in the rat heart.** *Mol Cell Endocrinol.* 2000 Oct 25; 168(1-2):127-34.

Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, Kroemer G. **Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death.** Cell Death Differ. 1999 Jun; 6(6):516-24.

Lowry ON, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** J Biol Chem. 1951 Nov; 193(1):265-75.

Maulik N, Das DK. **Emerging potential of thioredoxin and thioredoxin interacting proteins in various disease conditions.** Biochim Biophys Acta. 2008 Nov; 1780(11):1368-82.

Matsuzawa A, Ichijo H **Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling.** Antioxid Redox Signal. 2005 Mar-Apr; 7(3-4):472-81

Messarah M, Boulakoud MS, Boumendjel A, Abdennour C, El Feki A. **The impact of thyroid activity variations on some oxidizing-stress parameters in rats.** C R Biol. 2007 Feb; 330(2):107-12.

Mill JG, Vassalo, DV. **Hipertrofia cardíaca.** Ver Bras Hpertens. 2001 Jan/Mar; 8(1): 63-75.

Morgan HE, Gordon EE, Kira Y, Chua HL, Russo LA, Peterson CJ, McDermott PJ, Watson PA. **Biochemical mechanisms of cardiac hypertrophy.** Annu Rev Physiol. 1987; 49:533-43.

Mosterd A, Cost B, Hoes AW, de Bruijne MC, Deckers JW, Hofman A, Grobbee DE. **The prognosis of heart failure in the general population: The Rotterdam Study.** Eur Heart J. 2001 Aug; 22(15):1318-27.

Navarro F, Navas P, Burgess JR, Bello RI, De Cabo R, Arroyo A, Villalba JM. **Vitamin E and selenium deficiency induces expression of the ubiquinone-dependent antioxidant system at the plasma membrane.** FASEB J. 1998 Dec; 12(15):1665-73.

Ojamaa K. **Signaling mechanisms in thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy.** Vascul Pharmacol. 2010 Mar-Apr; 52(3-4):113-9.

Packer L, Weber SU, Rimbach G. **Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling.** J Nutr. 2001 Feb; 131(2):369S-73S.

Pantos C, Xinaris C, Mourouzis I, Malliopolou V, Kardami E, Cokkinos DV. **Thyroid hormone changes cardiomyocyte shape and geometry via ERK signaling pathway: potential therapeutic implications in reversing cardiac remodeling?** Mol Cell Biochem. 2007 Mar; 297(1-2):65-72.

Pantos C, Mourouzis I, Cokkinos DV. **Rebuilding the post-infarcted myocardium by activating 'physiologic' hypertrophic signaling pathways: the thyroid hormone paradigm.** Heart Fail Rev. 2010 Mar; 15(2):143-54.

Piantadosi CA, Carraway MS, Babiker A, Suliman HB. **Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1.** Circ Res. 2008 Nov 21; 103(11):1232-40.

Pick E, Keisari Y. **A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture.** J Immun Meth. 1980; 38: 161-70.

Proud CG. **Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy.** Cardiovasc Res. 2004 Aug 15; 63(3):403-13.

Qiang W, Cahill JM, Liu J, Kuang X, Liu N, Scofield VL, Voorhees JR, Reid AJ, Yan M, Lynn WS, Wong PK. **Activation of transcription factor Nrf-2 and its downstream targets in response to moloney murine leukemia virus ts1-induced thiol depletion and oxidative stress in astrocytes.** J Virol. 2004 Nov; 78(21):11926-38.

Robbins, SL et al. **Patologia Estrutural e Funcional-Robbins.** 7ª Edição. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan S.A., 2005.

Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X, Choi AM. **Mechanisms of cell death in oxidative stress.** Antioxid Redox Signal. 2007 Jan; 9(1):49-89.

Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, Pimentel DR, Singh K, Colucci WS. **Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure.** J Mol Cell Cardiol. 2002 Apr; 34(4):379-88.

Sies H, Cadenas E. **Oxidative stress: damage to intact cells and organs.** Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1985 Dec 17; 311(1152):617-31.

Singal PK, Khaper N, Farahmand F, Belló-Klein A. **Oxidative stress in congestive heart failure.** Curr Cardiol Rep. 2000 May; 2(3):206-11.

Singal PK, Khaper N, Belló-Klein A, Bhayana M. **Oxidative stress status in the transition of hypertrophy to heart failure.** Heart Failure Reviews. 1999; 4:353-60.

Siu PM, Bae S, Bodyak N, Rigor DL, Kang PM. **Response of caspase-independent apoptotic factors to high salt diet-induced heart failure.** J Mol Cell Cardiol. 2007 Mar; 42(3):678-86.

Stone JR, Yang S. **Hydrogen peroxide: a signaling messenger.** Antioxid Redox Signal. 2006 Mar-Apr; 8(3-4):243-70.

Sugden PH, Clerk A. **Oxidative stress and growth-regulating intracellular signaling pathways in cardiac myocytes.** *Antioxid Redox Signal.* 2006 Nov-Dec; 8(11-12):2111-24.

Thandapilly SJ, Wojciechowski P, Behbahani J, Louis XL, Yu L, Juric D, Kopilas MA, Anderson HD, Netticadan T. **Resveratrol Prevents the Development of Pathological Cardiac Hypertrophy and Contractile Dysfunction in the SHR Without Lowering Blood Pressure.** *Am J Hypertens.* 2010 Feb; 23(2):192-6.

Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. **Redox regulation of cell survival.** *Antioxid Redox Signal.* 2008 Aug; 10(8):1343-74.

Tsutsui H. **Oxidative stress in heart failure: the role of mitochondria.** *Intern Med.* 2001 Dec; 40(12):1177-82.

van Empel VP, Bertrand AT, van der Nagel R, Kostin S, Doevendans PA, Crijns HJ, de Wit E, Sluiter W, Ackerman SL, De Windt LJ. **Downregulation of apoptosis-inducing factor in harlequin mutant mice sensitizes the myocardium to oxidative stress-related cell death and pressure overload-induced decompensation.** *Circ Res.* 2005 Jun 24; 96(12):92-101.

Vakili BA, Okin PM, Devereux RB. **Prognostic implications of left ventricular hypertrophy.** *Am Heart J.* 2001 Mar; 141(3):334-41.

Venditti P, Di Meo S. **Thyroid hormone-induced oxidative stress.** *Cell Mol Life Sci.* 2006 Feb; 63(4):414-34.

Venditti P, Bari A, Di Stefano L, Di Meo S. **Vitamin E attenuates cold-induced rat liver oxidative damage reducing H₂O₂ mitochondrial release.** *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(9):1731-42.

Vincent AM, Kato K, McLean LL, Soules ME, Feldman EL. **Sensory neurons and schwann cells respond to oxidative stress by increasing antioxidant defense mechanisms.** *Antioxid Redox Signal.* 2009 Mar; 11(3):425-38.

Wajdowicz A, Dabroś W, Zaczek M. **Myocardial damage in thyrotoxicosis-ultrastructural studies.** *Pol J Pathol.* 1996; 47(3):127-33.

Wakatsuki T, Schlessinger J, Elson EL. **The biochemical response of the heart to hypertension and exercise.** *Trends Biochem Sci.* 2004 Nov; 29(11):609-17.

Winyard PG, Moody CJ, Jacob C. **Oxidative activation of antioxidant defence.** *Trends Biochem Sci.* 2005 Aug; 30(8):453-61

Yamamoto M, Yang G, Hong C, Liu J, Holle E, Yu X, Wagner T, Vatner SF, Sadoshima J. **Inhibition of endogenous thioredoxin in the heart increases oxidative stress and cardiac hypertrophy.** *J Clin Invest.* 2003 Nov; 112(9):1395-406.

Yang B, Oo TN, Rizzo V **Lipid rafts mediate H₂O₂ prosurvival effects in cultured endothelial cells.** FASEB J. 2006 Jul; 20(9):1501-3.