

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA**

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM TIROXINA NO REMODELAMENTO
CARDÍACO PÓS-INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO E EM PARÂMETROS DE
ESTRESSE OXIDATIVO**

BRUNO DA ROCHA BERGER

Porto Alegre

2012

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

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM TIROXINA NO REMODELAMENTO
CARDÍACO PÓS-INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO E EM PARÂMETROS DE
ESTRESSE OXIDATIVO**

Bruno da Rocha Berger

Dissertação Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas – Fisiologia.

Orientadora: Doutora Adriane Belló-Klein
Co-orientadora: Doutora Ângela Maria Vicente Tavares

Porto Alegre

2012

AGRADECIMENTOS

Meus pais me trouxeram ao mundo e me mostraram os caminhos. Se não fosse por eles eu não teria evoluído a ponto de chegar até aqui. Carlos Borromeu Machado Berger e Maria Helena da Rocha Cherubini, o meu muito obrigado, mas ainda preciso muito de vocês.

Muito obrigado à Profa. Dra. Maristela Padilha que me proporcionou o acesso ao mundo da pesquisa e me ensinou e ainda ensina o que ninguém jamais vai ensinar.

Um muito obrigado especial à minha orientadora Profa. Dra. Adriane Belló-Klein, por ter permitido que eu entrasse para o Laboratório de Fisiologia Cardiovascular e Estresse Oxidativo e por todo o conhecimento a mim proporcionado. Obrigado, também, pela paciência quando demonstrei imaturidade ou um desempenho abaixo do esperado.

À Dra. Ângela Tavares por todo o esforço em tornar possível uma boa parte deste trabalho e pela ajuda sempre disponível. Também agradeço a paciência durante o meu desenvolvimento neste mestrado.

Agradeço à Dra. Carmem Sartório pela ajuda na realização de uma técnica muito importante no desenvolvimento deste estudo. Muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araújo, pelo suporte teórico e pela ajuda em todos os momentos em que necessitei. À Tânia, que apesar de já saber de toda a minha admiração pela mão sempre estendida para me ajudar, muito obrigado.

A todos os alunos do laboratório que nunca mediram esforços para me ajudar e que fizeram com que o andamento deste trabalho fosse mais prazeroso. Faltam palavras para agradecer-lhes. Muito obrigado pessoal.

Adriana Conzatti, não tenho palavras para descrever a tua ajuda e teu apoio. Tu sabes bem o quanto foi importante. Muito obrigado.

Por fim, um agradecimento para a minha maior aquisição durante o mestrado. O maior tesouro que o PPGFISIO poderia me oferecer. Àqueles que, enquanto a carne estava na brasa ou enquanto estudávamos seriamente, fizeram com que tudo fosse mais fácil. Muito obrigado à turma de mestrandos 2010/1 do PPGFISIO.

"Pensa! O pensamento tem poder.
Mas não adianta só pensar.
Você também tem que dizer!
Diz! Porque as palavras têm poder.
Mas não adianta só dizer.
Você também tem que fazer!
Faz! Porque você só vai saber se o final vai ser feliz depois que tudo acontecer."

Gabriel O Pensador

RESUMO

O infarto agudo do miocárdio (IAM) é um evento que acomete milhares de pessoas ao redor do mundo. Após o IAM são desencadeados diversos processos, como alterações na expressão de proteínas envolvidas na contratilidade cardíaca e no remodelamento cardíaco após o IAM, bem como o desequilíbrio no estado redox da célula, que podem levar a um grave prognóstico. A utilização dos hormônios da tireoide vem sendo amplamente estudada na tentativa de desenvolver um método terapêutico eficiente para o tratamento do IAM. Desta forma, o objetivo deste estudo foi verificar os efeitos da tiroxina (T4) sobre a expressão e a concentração de antioxidantes e pró-oxidantes e sobre a expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo do cálcio, e suas possíveis relações com a melhora na função cardíaca após o IAM. Foram utilizados ratos Wistar, divididos nos seguintes grupos experimentais: SHAM, infartado (IAM) e infartado e tratado com T4 nas doses de 1,2, 2,4 e 6,0 mg/L de água de beber. O tratamento foi iniciado 24 horas após a indução do IAM e após 14 dias foram coletados dados morfométricos e ecocardiográficos, além de analisadas as expressões das proteínas cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2a), fosfolambam (PLB), fator nuclear eritroide do tipo 2 (Nrf2) e hemeoxigenase 1 (HO-1). Também foram quantificadas as concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de glutathiona total em homogeneizado de tecido cardíaco. Os animais infartados, tratados ou não, apresentaram hipertrofia cardíaca independente da dose do tratamento. O IAM provocou uma redução da função cardíaca, e o tratamento com T4 não foi capaz de reverter esses efeitos. A expressão das proteínas PLB e Nrf2 diminuiu após o IAM. Os animais tratados com T4 em suas doses mais altas apresentaram valores da expressão da proteína Nrf2 semelhantes aos animais do grupo SHAM. Os grupos infartado e tratado com T4 nas doses de 2,4 e 6,0 mg/L apresentaram valores de expressão da SERCA2a maiores quando comparados com o grupo SHAM. As concentrações de H_2O_2 e de glutathiona total não foram alteradas após o IAM, e o tratamento com T4 também não alterou estes parâmetros. Em suma, uma vez que a dose de T4 de 6,0 mg/L modulou a expressão do Nrf2, uma proteína importante para o estado redox da célula, sugerimos que poderia estar ocorrendo uma adaptação de sistemas antioxidantes distintos dos analisados neste estudo e que também são regulados por este fator de transcrição.

Palavras-chave: infarto agudo do miocárdio; hormônios da tireoide; estresse oxidativo; função cardíaca; metabolismo do cálcio.

ABSTRACT

The acute myocardial infarction (AMI) is an event that affects thousands of people around the world. After AMI are triggered several processes, such as changes in expression of proteins involved in cardiac contractility and cardiac remodeling, as well as the cell redox state imbalance, which can lead to serious prognosis. The use of thyroid hormones has been widely studied in an attempt to develop an efficient therapeutic method for treatment of AMI. Thus, the objective of this study was to investigate the effects of thyroxine (T4) on expression and concentration of antioxidant and pro-oxidants and the expression of proteins related to calcium metabolism, and their possible relationships with improvement in cardiac function after AMI. Wistar rats were divided into the following groups: SHAM, myocardial infarction (AMI) and myocardial infarction and treated with T4 at doses of 1,2, 2,4 and 6,0 mg / L of drinking water. Treatment was initiated 24 hours after induction of AMI and after 14 days were collected morphometric and echocardiographic data, and analyzed protein expression of sarcoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA2a), phospholamban (PLB), nuclear factor erythroid type 2 (Nrf2) and hemeoxygenase 1 (HO-1). Also were quantitated concentrations of hydrogen peroxide (H₂O₂) and total glutathione in homogenized of cardiac tissue. The infarcted animals, treated or not, showed cardiac hypertrophy, independent of the dose of treatment. The AMI has caused a decline in cardiac function parameters, and treatment with T4 was not able to reverse these effects. The protein expression of PLB and Nrf2 decreased after AMI. Animals treated with T4 in their higher doses had values of Nrf2 protein expression similar to those animals of the SHAM group. The infarcted groups and treated with T4 at doses of 2.4 and 6.0 mg / L had higher SERCA2a expression when compared to the sham group. The concentrations of H₂O₂ and total glutathione were not altered after AMI, and treatment with T4 did not alter these parameters. In short, since the treatment dose of 6.0 mg / L modulates the expression of Nrf2, an important protein for the redox state of the cell, we suggest what might be going on an adaptation of antioxidant systems distinct from those analyzed in this study and are also regulated by this transcription factor.

Keywords: acute myocardial infarction, thyroid hormones, oxidative stress, cardiac function, calcium metabolism.

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT – catalase

DCVs – doenças cardiovasculares

DD – diâmetro diastólico

DS – diâmetro sistólico

+dP/dt – índice de contratilidade

-dP/dt – índice de relaxamento

DITPA – ácido 3,5-diiodotiropropilônico

EO – estresse oxidativo

EROs – espécies reativas de oxigênio

FAC – mudança de área fracional

FE – fração de ejeção

FEnc – fração de encurtamento

GPX – glutaciona peroxidase

GSH – glutaciona reduzida

GSH/GSSG – relação da glutaciona reduzida pela glutaciona oxidada

GSSG – glutaciona oxidada

HO-1 – hemeoxigenase 1

HT – hormônios da tireoide

Nrf2 – fator nuclear eritróide do tipo 2

IAM – infarto agudo do miocárdio

ICC – insuficiência cardíaca congestiva

ICH – índice de congestão hepática

ICP – índice de congestão pulmonar

IHC – índice de hipertrofia cardíaca

MHC- α – cadeia pesada de miosina alfa

MHC- β – cadeia pesada de miosina beta

MPI – índice de performance do miocárdio

PLB – fosfolambam

RLs – radicais livres

RyR – receptor de rianodina

SERCA2a – proteína cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático

SOD – superóxido dismutase

-SH – grupos sulfidríla

T3 – triiodotironina

T4 – tetraiodotironina ou tiroxina

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

VE – ventrículo esquerdo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados morfométricos.....	33
Tabela 2. Dados de função sistólica do ventrículo esquerdo.....	35
Tabela 3. Dados de função diastólica do ventrículo esquerdo.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Protocolo experimental.....	27
Figura 2. Ecocardiograma do grupo SHAM no módulo M.....	34
Figura 3. Ecocardiograma do grupo IAM no módulo M.....	34
Figura 4. Ecocardiograma do grupo SHAM no módulo bidimensional.....	35
Figura 5. Ecocardiograma do grupo IAM no módulo bidimensional.....	35
Figura 6. Índice de performance do miocárdio (MPI).....	36
Figura 7. Expressão da SERCA2.....	37
Figura 8. Expressão da PLB.....	38
Figura 9. Expressão do Nrf2.....	39
Figura 10. Expressão da HO-1.....	40
Figura 11. Glutathiona total.....	40
Figura 12. Concentração de peróxido de hidrogênio.....	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	EPIDEMIOLOGIA	13
1.2	INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO (IAM)	13
1.3	ESTRESSE OXIDATIVO E IAM.....	15
1.4	HORMÔNIOS DA TIREÓIDE E ESTRESSE OXIDATIVO.....	19
1.5	HORMÔNIOS DA TIREÓIDE COMO MEDIDA TERAPÊUTICA APÓS O INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO (IAM).....	19
2	HIPÓTESE	23
3	OBJETIVOS	24
3.1	OBJETIVO GERAL	24
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1	EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	25
4.1.1	Animais	25
4.1.2	Considerações éticas	25
4.1.3	Manuseio de reagentes e animais	25
4.1.4	Grupos Experimentais	26
4.1.5	Protocolo experimental	26
4.1.6	Ligadura da artéria coronária	27
4.1.7	Administração de tiroxina (T4)	28
4.2	ANÁLISES	28
4.2.1	Hipertrofia cardíaca	28
4.2.2	Congestão hepática e pulmonar	28
4.2.3	Ecocardiograma	28
4.2.4	Tamanho da área infartada	29

4.2.5	Concentração de tiroxina (T4) no plasma	30
4.2.6	Estresse oxidativo	30
4.2.6.1	Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	30
4.2.6.2	Glutaciona total	31
4.2.7	Análise da expressão proteica por <i>Western Blot</i>	31
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
5	RESULTADOS	33
5.1	CONCENTRAÇÃO HORMONAL.....	33
5.2	MORFOMETRIA	33
5.3	ECOCARDIOGRAMA	34
5.3.1	Função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo.....	34
5.4	EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS AO METABOLISMO DO CÁLCIO.....	37
5.4.1	Expressão da cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2a) 37	
5.4.2	Expressão da fosfolambam (PLB).....	38
5.5	PARÂMETROS ESTRESSE OXIDATIVO CARDÍACO	38
5.5.1	Expressão do fator nuclear eritroide do tipo 2 (Nrf2).....	38
5.5.2	Expressão da hemeoxigenase 1 (HO-1).....	39
5.5.3	Glutaciona total	40
5.5.4	Concentração de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	41
6	DISCUSSÃO.....	42
7	CONCLUSÃO	49
8	PERSPECTIVAS	50
9	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA

Dados epidemiológicos mundiais mostram que as doenças cardiovasculares são as principais causas de morte na população em geral. No ano de 2008, 12,2% das mortes foram causadas por doenças isquêmicas do coração, somando 7,2 milhões de mortes em todo o mundo. Além disso, a projeção para o ano de 2030 é de que as doenças isquêmicas do coração causem mais de 8 milhões de mortes em todo o mundo (World Health Organization. 2008). O Brasil também apresenta números elevados de morbidade e mortalidade relacionadas às DCVs. 69% dos óbitos possuem causa bem definida e destes, 32% estão relacionados às doenças cardiovasculares, seguido das neoplasias que possuem menos da metade deste percentual (15%). Mais de 1.700.000 pessoas com mais de 65 anos apresentam doença cardiovascular grave (Azambuja et al. 2008; Ministério da Saúde. 2009).

Estes dados implicam em altos custos governamentais com saúde pública. Nos Estados Unidos, as doenças cardiovasculares lideram o quadro de custos com a saúde pública (Smith et al. 2008). No Brasil, somando os gastos com hospitalização e assistência ambulatorial do Sistema Único de Saúde (SUS), saúde suplementar e desembolso direto de todo este contingente, os valores anuais ultrapassam R\$11 bilhões (Azambuja et al. 2008).

1.2 INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO (IAM)

As artérias coronárias exercem um papel importante na funcionalidade cardíaca, pois através delas chega ao tecido miocárdico o sangue rico em nutrientes e substâncias fundamentais para a função cardíaca. Entretanto, eventos cardíacos onde o fluxo sanguíneo se torna nulo ou limitado comprometem a sobrevivência e a funcionalidade do miocárdio. A aterosclerose é a principal causa de obstrução aguda das coronárias e ocorre por predisposição genética e/ou por ingestão excessiva de gorduras e colesterol (Dalal et al. 2004). A região do miocárdio onde o aporte sanguíneo se torna nulo ou limitado é denominada região infartada e o evento isquêmico cardíaco é denominado infarto agudo do miocárdio (IAM) (Boersma et al. 2003). O músculo cardíaco é capaz de sobreviver com até 15% do fluxo sanguíneo

normal. Entretanto, na área central da região infartada, onde o fluxo sanguíneo pode se tornar nulo ocorre a morte do miócito (Boersma et al. 2003).

No IAM, a perda de miócitos conduz a uma condição de sobrecarga e promove mudanças metabólicas, bioquímicas, moleculares e estruturais no tecido cardíaco. Estas alterações promovem um remodelamento ventricular que envolve dilatação cardíaca, hipertrofia da área remanescente do miocárdio e deposição de colágeno na zona infartada (Jugdutt 2003; Jugdutt 2012). Neste sentido, o remodelamento cardíaco após o IAM pode ser dividido em precoce e tardio, com características temporais distintas. Precocemente após o evento isquêmico, ocorre a expansão da zona de infarto com conseqüente afinamento da parede e dilatação ventricular, acarretando um aumento do estresse de parede. Após este período, ocorrem alterações na arquitetura ventricular bem como na estrutura da célula muscular cardíaca na tentativa de normalizar o estresse de parede e a função cardíaca (Sutton; Sharpe 2000).

Para o melhor entendimento da fisiopatologia do IAM, foram desenvolvidos modelos experimentais utilizando diferentes animais. O modelo experimental utilizado neste trabalho foi o de indução do IAM em rato, o qual é um dos animais mais utilizados para a realização de modelos experimentais de IAM. O baixo custo e o fácil manejo desta espécie são alguns dos benefícios de sua utilização. Além disso, o metabolismo dos ratos possibilita que o estudo das fases envolvidas no IAM, como necrose, cicatrização e remodelamento, seja possível em um curto período de tempo. Por fim, estes animais são acometidos por alterações decorrentes do IAM semelhantes às que ocorreriam em humanos (Zornoff et al. 2009).

Apesar da alta mortalidade encontrada na utilização de ratos em pesquisas envolvendo IAM, em estudo recente do nosso laboratório foi possível observar uma redução nos níveis de mortalidade. Tavares e colaboradores (2010) alcançaram uma taxa de morte dos animais em torno de 10%.

As alterações que ocorrem após o IAM conduzem a uma diminuição imediata da função cardíaca. A fração de ejeção, a fração de encurtamento e a mudança de área fracional do ventrículo esquerdo (VE) são reduzidas de maneira acentuada (Pfeffer et al. 1979; Lymvaios et al. 2011). Assim, estas alterações da função cardíaca são responsáveis por tornar o IAM uma das principais causas de desenvolvimento de insuficiência cardíaca.

Diversos processos bioquímicos são desencadeados no miocárdio e contribuem para a perda de função após o IAM. A diminuição na expressão da cadeia pesada de miosina alfa (MHC- α) e o aumento na expressão da cadeia pesada de miosina beta (MHC- β) prejudicam diretamente a capacidade contrátil após o IAM (Pantos et al. 2007; Pantos et al. 2009). Estas duas isoformas da miosina são componentes contráteis do miócito. A MHC- α possui atividade ATPásica mais alta, o que gera uma contração cardíaca mais eficiente. Por outro lado, a MHC- β possui atividade ATPásica mais lenta, contribuindo para uma contração menos eficiente (Morkin 1993). Da mesma forma, ocorre uma diminuição na expressão da proteína cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2a) e um aumento da fosfolambam (PLB). Assim, a capacidade de recaptar cálcio do mioplasma fica comprometida, contribuindo ainda mais para a disfunção contrátil (Pantos et al. 2007; Calise et al. 2009; Bernardo et al. 2010).

Outro fator importante se refere ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) concomitante ao IAM. Já foi demonstrado que há uma produção elevada destas moléculas com consequente diminuição da fração de encurtamento, aumento do diâmetro do ventrículo esquerdo no final da diástole e aumento do volume do ventrículo esquerdo no final da diástole (Kinugawa et al. 2000; Schenkel et al. 2010).

1.3 ESTRESSE OXIDATIVO E IAM

As EROs são moléculas geradas, principalmente, a partir da redução monovalente do oxigênio molecular. Uma vez formadas, as EROs podem dar origem aos radicais livres (RLs), que são moléculas com um ou mais elétrons desemparelhados, geralmente em seu último orbital. Essas moléculas exercem importantes funções no metabolismo celular. Estudos iniciais envolvendo EROs e RLs indicaram que uma produção em excesso dessas espécies acarretaria em severos prejuízos celulares, incluindo danos a lipídeos, proteínas e DNA, inibindo a função celular normal (Sies; Cadenas 1985; Fujii et al. 2011). Desta forma, o estresse oxidativo (EO) está associado ao desenvolvimento de diversas patologias, principalmente as doenças cardiovasculares (Hill; Singal 1996).

As EROs, ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (HO^{\cdot}) podem agir de maneira deletéria ou benéfica, dependendo de suas concentrações. Já está descrito que em baixas concentrações os agentes oxidantes estão envolvidos com o crescimento e com a melhora da capacidade contrátil dos músculos cardíaco e esquelético (Suzuki; Ford 1999). Kwon e colaboradores (2003) descreveram que o H_2O_2 em baixas concentrações foi capaz de estimular a hipertrofia cardíaca, entretanto, em concentrações maiores esta molécula causou apoptose e necrose de células cardíacas. Da mesma forma, o H_2O_2 pode modular a capacidade contrátil do miocárdio através da modulação da função de canais de cálcio presentes no retículo sarcoplasmático e na membrana celular (Zima; Blatter 2006).

Os sistemas biológicos apresentam mecanismos capazes de desenvolver sistemas de defesa contra as EROs e RLs. Estes mecanismos são chamados de sistemas de defesa antioxidante e são divididos em enzimáticos e não enzimáticos. O sistema de defesa enzimático é constituído por enzimas tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), hemeoxigenase 1 (HO-1), entre outras (Valko et al. 2007).

Dentre os mecanismos de defesa enzimáticos, a enzima HO-1 exerce um papel fundamental, principalmente em lesões induzidas por isquemia. Esta enzima tem a função de converter o grupo heme liberado pela mioglobina e hemoglobina, em biliverdina, monóxido de carbono e ferro livre. Além disso, esta proteína é altamente induzível pelo aumento das concentrações de EROs (Wagener et al. 2003; Valko et al. 2007).

O sistema de defesa antioxidante não enzimático é representado pelo ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutathione reduzida (GSH), carotenoides e flavonoides (Valko et al. 2007). Destes, o principal “tampão redox” e antioxidante presente no organismo é a GSH. Esse tripeptídeo exerce diversas funções essenciais na adaptação celular ao estresse, pois é um cofator para diversas enzimas detoxificadoras (p.ex. GPX), participa do transporte de aminoácidos através da membrana plasmática, elimina o radical hidroxil e o oxigênio singlete, e regenera os antioxidantes vitamina C e E (Valko et al. 2007).

Todos estes achados acrescentaram conhecimento e novas perspectivas nas pesquisas relacionadas com EO. Sies e colaboradores (1985) conceituaram o estresse oxidativo como o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio

concomitante a uma redução dos mecanismos de defesa antioxidante. Atualmente são atribuídas ações benéficas destas espécies quando se encontram em baixas ou moderadas concentrações. Estas ações estão ligadas à resposta mitogênica e à defesa celular contra agentes infecciosos (Valko et al. 2007). Além disso, as EROs e RLs agem na sinalização celular interferindo em diversas funções celulares. Neste sentido, foi sugerido por Jones e colaboradores em um trabalho publicado em 2006, que o estresse oxidativo é definido por um desequilíbrio e um rompimento da sinalização redox (Jones 2006).

Ainda em relação ao EO envolvendo a sinalização celular, um fator de transcrição tem sido alvo de recentes estudos. O fator nuclear eritroide do tipo 2 (Nrf2), é induzível por diversas moléculas, principalmente o H_2O_2 , e possui um papel citoprotetor muito importante. O Nrf2, quando ativado, tem como alvo elementos responsivos a antioxidantes em regiões promotoras de diversos genes, estimulando a síntese de diversas enzimas antioxidantes, como a HO-1, a CAT, a SOD e a GPX. A enzima gama glutamylcisteína sintetase, responsável pela biossíntese da GSH, também tem sua expressão estimulada pelo Nrf2 (Lee; Johnson 2004; Kobayashi; Yamamoto 2005). Além disso, o Nrf2 também é capaz de estimular a atividade destas mesmas enzimas (Zhu et al. 2005).

O estresse oxidativo está diretamente envolvido com a fisiopatologia do IAM. Mudanças no estado redox de corações de ratos infartados são observadas precocemente pós-infarto. Estudos evidenciam um aumento da produção de EROs com consequente aumento do estresse oxidativo após o infarto do miocárdio em modelos experimentais e em humanos (Grieve et al. 2004). Fontes de EROs no IAM estão associadas com a infiltração de células inflamatórias e reações enzimáticas envolvendo a cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, xantina oxidase, NADPH oxidase, óxido nítrico sintase, lipoxigenase e citocromo P450 monooxigenase (Hill; Singal 1996; Singh et al. 1996; Kinugawa et al. 2000; Grieve et al. 2004; Takimoto; Kass 2007).

A análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é um método muito utilizado para quantificar a peroxidação de lipídeos. Aumento nos níveis de lipoperoxidação foi observado em 4, 8 e 16 semanas após o IAM (Hill; Singal 1996). O aumento do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) está relacionado com os níveis de lipoperoxidação. Schenkel e colaboradores (2012) observaram uma diminuição nos níveis de H_2O_2 dois dias após o IAM, entretanto em sete dias os

animais infartados apresentaram valores semelhantes aos animais controles. Após 28 dias os animais infartados apresentaram concentrações de H_2O_2 superiores aos animais controles (Schenkel et al. 2012).

Hill e Singal (1996) observaram atividade preservada da enzima superóxido dismutase (SOD) em uma, quatro e oito semanas após o IAM e das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) em uma semana após a isquemia. Da mesma forma, foram observados valores semelhantes aos animais controles na relação da glutathiona reduzida (GSH) pela glutathiona oxidada (GSH/GSSG) em animais infartados após uma, quatro e oito semanas (Hill; Singal 1996). Schenkel e colaboradores (2012) também apresentaram valores preservados de GSH/GSSG após uma semana do IAM.

As EROs e os RLs podem exercer papéis fisiológicos importantes, mas em situações patológicas, como no IAM, o aumento na concentração destas moléculas está relacionado com a perda de função cardíaca. Nestas situações, estas espécies estimulam vias de sinalização que levam ao desenvolvimento de tecido fibroso e morte do miócito (Opie et al. 2006; Valko et al. 2007).

O estado redox da célula também pode interferir na função cardíaca através da modulação da atividade de canais e bombas iônicas. O canal liberador de cálcio do retículo sarcoplasmático, o receptor de rianodina (RyR), tem sua função estimulada com o aumento da concentração de GSSG no citosol. Por outro lado, o aumento de GSH diminui a atividade do RyR (Balshaw et al. 2001). O H_2O_2 , bem como o ânion superóxido e o radical hidroxil, podem interferir na atividade do RyR, dependendo da sua concentração. Em concentrações elevadas, estas espécies oxidam os grupos sulfidril (-SH) deste canal aumentando a probabilidade de abertura e liberação de cálcio (Boraso; Williams 1994; Anzai et al. 1998).

Da mesma forma, a cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2a), tem sua atividade alterada pelo estado redox celular. As EROs, quando em altas concentrações, oxidam os grupos SH deste canal e inibem a sua atividade, dificultando a recaptação de cálcio para o retículo sarcoplasmático (Xu et al. 1997).

Outras proteínas envolvidas no transporte de cálcio no músculo cardíaco também podem ter suas atividades prejudicadas em situações nas quais a concentração de EROs está elevada (Zima; Blatter 2006). Juntas, estas informações corroboram a importância das EROs e dos sistemas antioxidantes na modulação da função contrátil do coração, pois o desequilíbrio do balanço redox está relacionado

com prejuízos no metabolismo do cálcio e consequente acúmulo deste íon na célula. O aumento excessivo da concentração de cálcio no miócito está relacionado com a queda da capacidade contrátil do miocárdio, necrose celular e desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva (Shaheen et al. 2011).

1.4 HORMÔNIOS DA TIREÓIDE E ESTRESSE OXIDATIVO

Existe uma relação estreita entre os hormônios produzidos na glândula tireoide, tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), e o estresse oxidativo (Videla 2010). Esses hormônios são responsáveis por estimular o consumo de oxigênio celular, o que gera um aumento na produção das EROs (Venditti; Di Meo 2006; Araujo et al. 2008; Videla 2010). A produção elevada destas moléculas está associada com um aumento do nível de lipoperoxidação no miocárdio, e consequente dano ao tecido cardíaco, sendo este evento tempo-dependente (Venditti; Di Meo 2006).

O aumento da produção de EROs está relacionado com um alto consumo das reservas antioxidantes celulares, bem com a inativação de enzimas antioxidantes (Videla 2010). Em um estudo conduzido por Araújo e colaboradores (2011) foi observado um aumento na lipoperoxidação e no nível de carbonilas em eritrócitos de ratos após 28 dias de indução ao hipertireoidismo. Entretanto, este mesmo trabalho apresentou um aumento da atividade das enzimas glutathione S-transferase e glutathione peroxidase. Em outro estudo publicado por Araújo e colaboradores, foi observado que a administração de T4 durante 28 dias induziu aumento na expressão das proteínas tioredoxina e peroxirredoxina, as quais fazem parte dos mecanismos de defesa antioxidante, no tecido cardíaco (Araujo, Fernandes et al. 2010).

1.5 HORMÔNIOS DA TIREÓIDE COMO MEDIDA TERAPÊUTICA APÓS O INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO (IAM)

Atualmente existem diversas medidas terapêuticas para o tratamento do IAM. A utilização de oxigênio, para diminuição da hipoxemia, o alívio da dor e da ansiedade, a utilização de antiplaquetários, betabloqueadores, bloqueadores dos canais de cálcio, inibidores da enzima conversora de angiotensina e inibidores dos receptores da angiotensina, bem como a utilização de terapias de reperfusão já

estão bem descritas na literatura (Sociedade Brasileira de Cardiologia. 2004). Entretanto, todas estas medidas possuem um efeito paliativo sobre os danos causados pelo IAM, contribuindo apenas para a estabilização do quadro clínico.

Na busca por medidas mais eficientes os hormônios produzidos na glândula tireoide (HT) estão sendo estudados como potenciais agentes terapêuticos na recuperação do IAM. A tetraiodotironina ou tiroxina (T4) e a triiodotironina (T3) são hormônios produzidos a partir do iodo na glândula tireoide e que exercem diversas funções metabólicas. São produzidos cerca de 90% de T4 e 10% de T3. O hormônio T3 é produzido em menor escala, entretanto é a forma ativa dos hormônios tireoidianos. Neste sentido tecidos periféricos, dentre eles o tecido cardíaco, são capazes de produzir enzimas desidases específicas, que convertem, periféricamente, o pró-hormônio T4 na forma ativa (T3). A glândula tireoide ainda produz uma pequena quantidade do hormônio T3 reverso (menos de 1%), uma forma inativa do hormônio T3 (Melmed et al. 2011).

Um perfil alterado dos HT tem sido observado em pesquisas clínicas e experimentais envolvendo IAM e insuficiência cardíaca. Pacientes e animais apresentam uma síndrome de baixo T3 após o IAM e a baixa concentração deste hormônio está relacionada com uma piora da função cardíaca e com um prognóstico ruim (Iervasi et al. 2003; Calise et al. 2009; Coceani et al. 2009).

Associado à diminuição da concentração de T3, são observadas alterações de proteínas relacionadas com a contração do músculo cardíaco, tais como: diminuição na expressão gênica da isoforma alfa de cadeia pesada de miosina e aumentos da isoforma beta; diminuição da cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2a); aumento da fosfolambam (PLB) (Ojamaa et al. 2000; Pantos et al. 2007; Pantos et al. 2008). Em consequência destas mudanças, são encontradas diminuições na fração de ejeção (FE), índice de contratilidade (+dP/dt) e índice de relaxamento (-dP/dt), além de aumentos nos diâmetros do ventrículo esquerdo no final da diástole e da sístole (Pantos et al. 2007; Camilli et al. 2008).

No tecido cardíaco os HT agem de maneira pleiotrópica, modulando a expressão de diversas proteínas relacionadas com a função e estrutura cardíaca (Kahaly; Dillmann 2005). Assim, quando administrados após o IAM estes hormônios podem prevenir a expressão de proteínas em um perfil semelhante ao tipo fetal que ocorre após o IAM, bem como normalizar a geometria cardíaca que foi alterada em consequência da isquemia (Pantos et al. 2010).

Observa-se melhora na função cardíaca após o tratamento com hormônios da tireoide com aumentos na FE, no índice de contratilidade e no índice de relaxamento, na pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo e na fração de encurtamento. Além destes benefícios, ocorre um aumento na expressão da SERCA2a, diminuição na expressão da PLB, diminuição na expressão da isoforma beta da cadeia pesada de miosina e aumento na expressão da isoforma alfa, e melhora da geometria cardíaca (Ojamaa et al. 2000; Kahaly; Dillmann 2005; Pantos et al. 2007; Pantos et al. 2008).

Ainda não foram realizadas pesquisas clínicas com administração de HT após o IAM. Entretanto, alguns estudos têm sido realizados utilizando um análogo dos HT, o ácido 3,5-diiodotiropropilônico (DITPA), o qual possui menos efeitos metabólicos, comparando-se com os efeitos de T3 e T4. Estas pesquisas apontaram um aumento do índice cardíaco, diminuição da resistência vascular sistêmica, da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e do peso corporal. Entretanto, estes dados não refletem nenhum benefício sintomático (Morkin et al. 2002; Goldman et al. 2009). Além disso, os pacientes tratados com DITPA apresentaram cansaço e desconforto intestinal (Goldman et al. 2009).

Em um modelo experimental de coração isolado, onde foi induzida uma isquemia seguida de reperfusão, foi observada melhora nos corações que receberam T3 durante a reperfusão. Nesta situação, houve um aumento da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo e diminuição da liberação de lactato desidrogenase, indicando uma melhora na capacidade contrátil do miocárdio. Por outro lado, este mesmo estudo testou a utilização de T4 durante a reperfusão e não observou os mesmos resultados. Assim, o T4 não foi capaz de melhorar a função contrátil após a isquemia (Pantos et al. 2011).

Em outro estudo envolvendo o modelo de isquemia-reperfusão, os animais foram tratados com DITPA por sete dias, em diferentes doses, previamente à indução de isquemia e reperfusão. O grupo que recebeu o tratamento apresentou alta prevalência de arritmia cardíaca fatal e nenhuma melhora na função contrátil do miocárdio e na expressão das proteínas SERCA2a e PLB (Talukder et al. 2011).

Ainda são escassas as pesquisas que relacionem o estresse oxidativo após o IAM em animais tratados com HT. Entretanto, pesquisadores descrevem que o aumento na produção de EROs está associado com o aumento da expressão da HSP70 (proteína de choque térmico), o que poderia induzir uma tolerância a

situações isquêmicas (Pantos et al. 2010). Outros fatores importantes são observados no estresse oxidativo moderado, onde há a ativação da proteína quinase C (PKC) sensível ao estado redox celular no pré-condicionamento isquêmico (Downey et al. 2007).

As informações anteriores tornam plausível a hipótese de que o tratamento com hormônios da tireóide podem induzir adaptações do sistema antioxidante, podendo, desta forma, atenuar os danos decorrentes do aumento de EROs produzido pelo IAM.

2 HIPÓTESE

Os hormônios da tireoide induzem um aumento no consumo de oxigênio celular, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, ao mesmo tempo, conduzindo a uma adaptação dos sistemas de defesa antioxidantes. Desta forma, a hipótese deste estudo foi que a administração de tiroxina iniciada após o IAM pode melhorar o remodelamento e a função cardíaca através da promoção de adaptações antioxidantes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal desse estudo foi analisar os efeitos do tratamento com tiroxina após o infarto agudo do miocárdio no remodelamento e na função cardíaca, bem como em parâmetros indicativos de estresse oxidativo cardíaco.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O objetivo deste trabalho foi inicialmente padronizar um protocolo de tratamento com tiroxina (T4) após o infarto agudo do miocárdio (IAM).

Os objetivos específicos foram avaliar o efeito do tratamento com tiroxina após o IAM:

- em parâmetros morfométricos.
- em parâmetros relacionados à função cardíaca.
- na expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo do cálcio.
- em parâmetros relacionados ao estresse oxidativo cardíaco.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

4.1.1 Animais

Foram utilizados 36 ratos machos Wistar pesando de 300 a 350 gramas advindos do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos em caixas plásticas com medidas de 270 x 260 x 310 mm, sendo quatro animais por caixa. Todos os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (21°C), ciclo “claro-escuro” de 12 horas e umidade relativa do ar de 70%. Água e ração comercial foram oferecidas “*ad libitum*”. O peso corporal foi aferido semanalmente.

4.1.2 Considerações éticas

O projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo aprovado com o número 18957. Os experimentos só tiveram início após sua aprovação.

Todos os procedimentos desse estudo estão de acordo com a Lei 6638, de 08 de maio de 1979, que estabelece normas para a Prática Didático-Científica da Vivisseção de animais; dos Princípios Éticos na Experimentação Animal, formulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal; assim como aquelas contidas nos Princípios Internacionais Orientadores para a pesquisa Biomédica envolvendo animais provenientes do *Council for International Organizations of Medical Science (CIOMS)* (Goldim; Raymundo 1997).

4.1.3 Manuseio de reagentes e animais

Após a morte, as carcaças dos animais foram congeladas em freezer -20°C e levados ao biotério da universidade onde foram coletados por empresa especializada. Os materiais tóxicos foram manuseados na capela e após sua utilização os resíduos foram encaminhados para o Centro de Gestão e Tratamento

de Resíduos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para sua correta eliminação.

Todos os procedimentos com animais e reagentes foram realizados com o uso de avental, luva cirúrgica e máscara, levando em consideração os cuidados necessários para proteção e segurança dos animais e dos pesquisadores envolvidos.

4.1.4 Grupos Experimentais

Foram estabelecidos os seguintes grupos experimentais:

1 – Grupo SHAM, n=10 (SHAM): os animais foram submetidos à simulação da cirurgia de indução ao infarto agudo do miocárdio.

2 – Grupo Infarto Agudo do Miocárdio, n=12 (IAM): os animais foram submetidos à cirurgia de ligadura da artéria coronária esquerda.

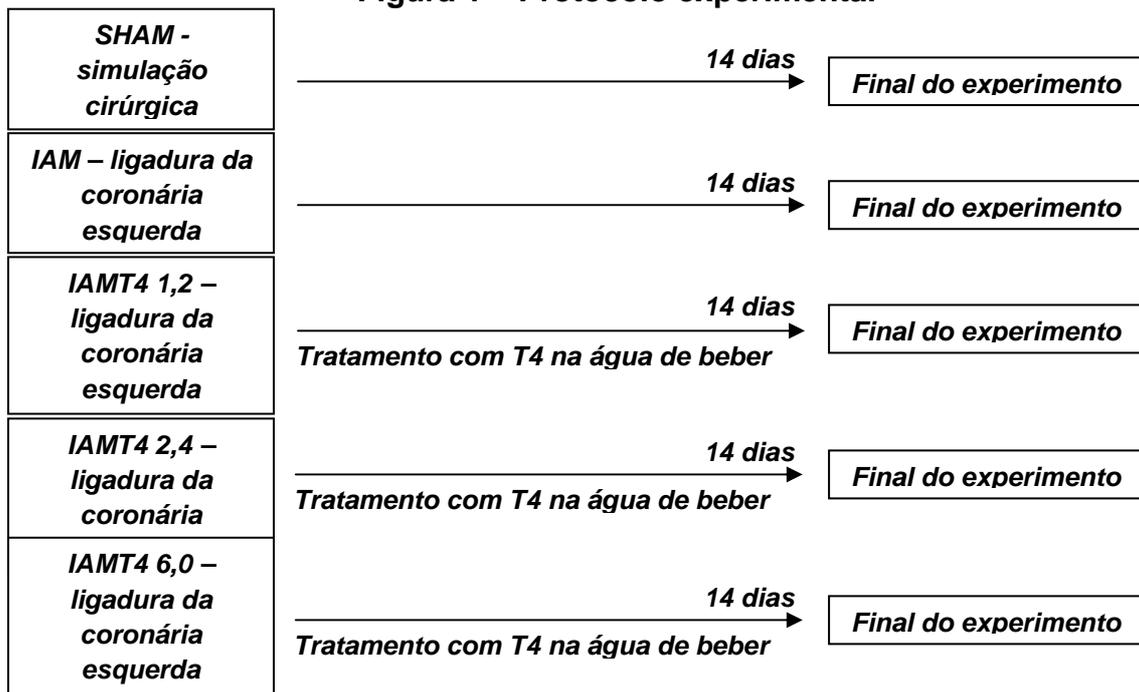
3 – Grupos Infarto Agudo do Miocárdio e tratados com tiroxina: os animais foram infartados e após 24 horas do procedimento os mesmos foram tratados com tiroxina na água de beber (Araujo et al. 2006). As doses utilizadas foram (Araujo et al. 2006; Pantos et al. 2008; Calise et al. 2009):

- 1,2 mg/L (IAMT 1,2; n=04).
- 2,4 mg/L (IAMT 2,4; n=04).
- 6,0 mg/L (IAMT 6,0; n=06).

4.1.5 Protocolo experimental

Após 3 meses de vida, com peso mínimo de 300 gramas, os animais foram submetidos à cirurgia de ligadura da artéria coronária esquerda para a indução do IAM. Finalizado o procedimento cirúrgico, os animais foram imediatamente colocados em caixas individuais até sua completa recuperação. Aos animais dos grupos que receberam o tratamento com tiroxina (T4) foi oferecida água contendo T4 nas suas respectivas doses. Na água de beber dos animais dos grupos SHAM e IAM não foi adicionada qualquer substância. Após 14 dias de protocolo, os animais foram mortos por overdose de anestésico (quetamina e xilazina). O protocolo experimental é ilustrado na figura 1.

Figura 1 – Protocolo experimental



4.1.6 Ligadura da artéria coronária

Os animais foram pesados e anestesiados com uma mistura de quetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) via intraperitoneal. Após, foram colocados em decúbito dorsal e entubados (Gelko-14G). Um pequeno corte foi realizado na pele e os músculos peitorais foram afastados. Os animais foram submetidos à ventilação mecânica (Bomba de ventilação Intermed, Inter 3, São Paulo, SP, Brasil) e realizou-se uma toracotomia esquerda no segundo espaço intercostal. O pericárdio foi rompido e a artéria coronária descendente anterior esquerda foi ligada (fio mononylon 6.0), provocando a isquemia miocárdica.

Após a ligadura da coronária, a incisão torácica foi suturada (fio mononylon 5.0) e o pneumotórax foi retirado. Logo após, o animal foi retirado da ventilação mecânica e a respiração voluntária foi estimulada. Os músculos afastados foram reposicionados e a pele suturada (fio mononylon 4.0) (Tavares et al. 2010). Posteriormente, os animais foram colocados em ambiente aquecido para recuperação.

4.1.7 Administração de tiroxina (T4)

O tratamento com tiroxina foi realizado mediante administração de L-tiroxina (0,15 µmol/L). Foram dissolvidos 1,2 mg, 2,4 mg e 6,0 mg de T4 em 50 mL de Tris para um volume final de um litro de água – *ad libitum* durante os 14 dias, na água de beber oferecida aos ratos (Pantos, Mourouzis et. al. 2007; 2008; 2009).

4.2 ANÁLISES

4.2.1 Hipertrofia cardíaca

O índice de hipertrofia cardíaca (IHC) fornece uma informação quanto ao aumento de massa muscular do coração. Esse dado é calculado pela massa em miligramas do tecido cardíaco dividido pela massa corporal em gramas multiplicado por cem (expresso em porcentagem) (Skuladottir et al. 1994).

$$\text{IHC} = (\text{Massa Cardíaca em miligramas} / \text{Massa Corporal em gramas})$$

4.2.2 Congestão hepática e pulmonar

Imediatamente após a morte dos animais o fígado e o pulmão foram retirados, pesados e acondicionados em estufa a uma temperatura de 65 graus Celsius. Esses órgãos foram pesados diariamente até atingirem um peso constante para a obtenção do peso seco. Posteriormente, o índice de congestão hepática e pulmonar foi calculado pela divisão do peso úmido do tecido pelo peso seco (Singal et al. 2000).

4.2.3 Ecocardiograma

As análises ecocardiográficas foram realizadas 14 dias após o procedimento cirúrgico ou simulação do mesmo. Os ratos foram previamente anestesiados com uma mistura de quetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via intraperitoneal.

Após a anestesia, os animais foram tricotomizados e posicionados em decúbito lateral esquerdo para obter as imagens cardíacas. Foi utilizado o sistema EnVisor Philips (Andover, MA, USA), com um transdutor de 12-4 MHz, a uma profundidade de 2 cm e imagem fundamental harmônica.

A avaliação da função ventricular esquerda, através da mudança de área fracional (FAC – *fractional area change*) foi calculada através da seguinte fórmula: $FAC = (\text{área diastólica} - \text{área sistólica}) / \text{área diastólica} \times 100$. A fração de ejeção do ventrículo esquerdo foi calculada através da fórmula: $FE = (\text{volume no final da diástole} - \text{volume sistólico}) / \text{volume no final da diástole} \times 100$. O volume no final da diástole e o volume sistólico foram calculados utilizando-se a equação de Simpson modificada (Mercier et al. 1982). A fração de encurtamento do ventrículo esquerdo (FEnc) foi obtida pela seguinte equação: $FEnc = (\text{diâmetro diastólico} - \text{diâmetro sistólico}) / \text{diâmetro diastólico} \times 100$. As dimensões sistólicas e diastólicas do ventrículo esquerdo, áreas transversas (cm²), perímetros e diâmetros foram obtidas em três níveis: basal (abaixo da borda da válvula mitral), medial (no nível dos músculos papilares) e apical (abaixo dos músculos papilares) (Nozawa et al. 2006). O índice de performance do miocárdio (MPI – *myocardial performance index*) foi calculado através da equação: $MPI = (\text{tempo de contração isovolumétrica} + \text{tempo de relaxamento isovolumétrico}) - \text{tempo de ejeção aórtica} / \text{tempo de ejeção aórtica}$ (Peron et al. 2006). O diâmetro ventricular na sístole (DS) e o diâmetro ventricular na diástole (DD) foram analisados utilizando-se o modo M. Para avaliação das áreas e perímetros foi utilizado o modo bidimensional. O valor final de cada medida foi tomado como média dos três planos e expresso em centímetros. As imagens bidimensionais foram gravadas em CD para futuras revisões e análises offline.

4.2.4 Tamanho da área infartada

A análise da área infartada foi realizada por ecocardiografia. Em cada plano ecocardiográfico transversal (basal, medial e apical) o perímetro correspondente ao segmento infartado (região acinética ou hipocinética – RAH) e o perímetro endocárdico total (PE) foram analisados na fase final da diástole. O tamanho da área infartada (AI) foi estimado como percentual utilizando a seguinte fórmula: $AI = (RAH/PE) \times 100$ (Peron et al. 2006).

4.2.5 Concentração de tiroxina (T4) no plasma

Com os animais estando anestesiados e após a realização das análises ecocardiográficas, o sangue foi coletado através da artéria renal (1,5 mL) e centrifugado por 10 minutos a 1000xg em centrífuga refrigerada (Sorvall RC5B – Rotor SM 24). O plasma dos animais foi separado e congelado em freezer a uma temperatura de menos 80 graus Celsius para posterior dosagem dos hormônios da tireóide por quimiluminescência. As análises foram realizadas pelo Laboratório veterinário TECSA (Tecnologia em Sanidade Animal). Os resultados foram expressos em ng/dL.

4.2.6 Estresse oxidativo

4.2.6.1 Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

O método está baseado na oxidação do vermelho de fenol pelo peróxido de hidrogênio mediado pela peroxidase de rabanete, resultando na produção de um composto que pode ser analisado espectrofotometricamente a 610 nm.

Em torno de 50 mg do tecido cardíaco foram retirados e homogeneizado durante 40 segundos em ultra-Turrax, na presença de KCl 1,15% (5 mL/g de coração) e de fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), na concentração de 100 mmol/L em isopropanol (10 µL por mL de KCl adicionado). Em seguida os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5 B – Rotor SM 24) e o sobrenadante foi retirado para posterior análise (Llesuy et al. 1985).

O sobrenadante coletado foi adicionado à solução tampão de vermelho de fenol 0,28 mmol/L, dextrose 5 mM e peroxidase de rabanete 8,5 U/mL. Após o intervalo de 25 minutos, foi adicionado NaOH 1 mol/L e efetuada a leitura a 610 nm. O resultados foram expressos em nmoles de H₂O₂ por mg de tecido (Pick; Keisari 1980).

4.2.6.2 Glutathiona total

Para determinar a glutathiona total, um fragmento do tecido cardíaco foi retirado do coração e desproteíno com ácido perclórico 2 mol/L e centrifugado por 10 minutos a 1000g em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi neutralizado com hidróxido de potássio 2 mol/L. O meio de reação continha tampão fosfato 100 mmol/L (pH 7,2), adenina nicotinamida dinucleotídeo fosfato (NADPH) 2 mmol/L, glutathiona redutase 0,2 U/mL, ácido ditionitrobenzóico (DTNB) 70 µmol/L. A leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro a 412 nm (Akerboom; Sies 1981).

4.2.7 Análise da expressão proteica por *Western Blot*

Após o fim dos experimentos, as amostras de coração foram imediatamente imersas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80° C até posterior extração proteica.

Para extração proteica as amostras de tecido foram homogeneizadas em tampão RIPA (NaCl 150 mmol / L; Tris-HCl 50 mmol/L; EDTA 5 mmol/L; Nonidet-P 40 1% vol/vol; deoxicolato 0,5 peso/vol; NaF 10 mmol/L; pirofosfato de sódio 10 mmol/L; fluoreto de fenilmetilsulfonil 100 mmol/L; aprotinina 2 µg/mL; leupeptina 2 µg/mL) com a utilização do homogeneizador Politron por 40 segundos, a 4°C (Sartorio et al. 2007). A mistura foi centrifugada em tubos eppendorf à 8000xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado e aliquoteado e o *pellet* desprezado. As concentrações de proteína foram determinadas pela técnica de Lowry (Lowry et al. 1951) e utilizadas para normalizar a quantidade de proteína carregada nos géis. As amostras foram preparadas em condições redutoras com um tampão de Laemmli (1:5) com o agente redutor mercaptoetanol (1:2) e aquecidas a 95°C durante 2 minutos.

Foram carregados 75 µg de proteína por poço para a eletroforese de gel monodimensional de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) em um sistema usando géis separadores com densidade de 8% e 20%. As proteínas foram transferidas para membrana PVDF (Immobilon -P, Millipore) usando tampão contendo Tris base 48 mmol / L, glicina 39 mmol / L, metanol 10%, pH=8,9. Em seguida, as membranas foram bloqueadas por uma hora em solução de leite

desnatado 1% em tampão TBS-tween (Tris 20mM, NaCl 140mM, 0,05% Tween 20). Os anticorpos primários utilizados foram policlonais de coelho para SERCA2a (H-300), fosfolambam (FL-52), Nrf2 (C-20) e hemeoxigenase (M-300) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, US).

Os anticorpos primários foram detectados usando o anticorpo secundário “goat anti-rabbit horseradish peroxidase” (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, US) e as bandas foram detectadas por quimiluminescência. As imagens foram obtidas através de um sistema digital de aquisição de imagens *Carestream* e posteriormente analisadas e quantificadas utilizando-se o programa *ImageJ*. Os pesos moleculares das bandas de proteínas foram determinados utilizando-se um marcador de peso molecular (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad, CA, USA). Os resultados de cada membrana foram normalizados pelo método de Ponceau e expressos em densidade óptica em pixels (Klein et al. 1995).

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com base nos resultados obtidos, foram calculadas as médias e os desvios padrão para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados.

Foi utilizado o teste de Bartlett, para avaliar o comportamento paramétrico ou não-paramétrico dos dados. A avaliação da normalidade (distribuição Gaussiana) foi realizada através do método de Shapiro-Wilk. Uma vez os dados passados pelos dois testes, a comparação entre dados paramétricos foi feita através da análise de variância simples (ANOVA), com o teste complementar de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentou $p < 0,05$. O software SPSS 17.0 for Windows foi utilizado como ferramenta computacional para análise estatística dos dados.

5 RESULTADOS

5.1 CONCENTRAÇÃO HORMONAL

O grupo IAMT 6,0 apresentou uma concentração sanguínea de tiroxina mais alta quando comparado com os demais grupos (SHAM = $2,31 \pm 0,65$; IAM = $2,50 \pm 0,80$; IAMT 1,2 = $2,62 \pm 0,39$; IAMT 2,4 = $3,08 \pm 0,41$; IAMT 6,0 = $7,76 \pm 1,28^*$ ng/dL).

5.2 MORFOMETRIA

A tabela 1 apresenta os dados referentes à massa corporal final, índice de hipertrofia cardíaca (IHC), índice de congestão hepática (ICH) e índice de congestão pulmonar (ICP) nos grupos envolvidos no estudo. Apenas o grupo que recebeu a dose mais alta de T4 (6,0 mg/L) apresentou concentrações sanguíneas deste hormônio mais altas quando comparado com os demais grupos.

Não houve diferença entre os grupos nos valores relacionados à massa corporal. Por outro lado, no que se refere à hipertrofia cardíaca, os grupos IAM, IAMT 2,4 e IAMT 6,0 apresentaram valores significativamente maiores quando comparados com o grupo SHAM. Não houve diferença entre os grupos quando analisados os parâmetros de congestão hepática e pulmonar.

Tabela 1. Dados morfométricos.

	SHAM	IAM	IAMT 1,2	IAMT 2,4	IAMT 6,0
MC (g)	327 ± 27	319 ± 29	320 ± 51	322 ± 19	314 ± 25
IHC (mg/g)	$2,484 \pm 0,135$	$2,799 \pm 0,172^*$	$2,675 \pm 0,103$	$2,948 \pm 0,234^*$	$2,838 \pm 0,198^*$
ICH (mg/g)	$3,519 \pm 0,159$	$3,510 \pm 0,136$	$3,602 \pm 0,025$	$3,500 \pm 0,100$	$3,401 \pm 0,049$
ICP (mg/g)	$4,839 \pm 0,211$	$5,178 \pm 0,704$	$5,353 \pm 0,485$	$5,108 \pm 0,307$	$4,989 \pm 0,163$

Massa corporal (MC), índice de hipertrofia cardíaca (IHC), índice de congestão hepática (ICH) e índice de congestão pulmonar (ICP). Os dados estão expressos em média \pm DP.
* $p < 0,05$ vs SHAM.

5.3 ECOCARDIOGRAMA

5.3.1 Função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo

Não houve diferença entre os quatro grupos onde houve injúria isquêmica em relação à área de infarto.

Os dados relacionados à função sistólica do ventrículo esquerdo (VE) são apresentados na tabela 2. Os animais do grupo IAM apresentaram diâmetros cardíacos na sístole e na diástole maiores quando comparados com o grupo SHAM (Figura 2 e 3). Os grupos IAMT 1,2, IAMT 2,4 e IAMT 6,0 apresentaram valores de diâmetro do VE maiores quando comparados com os animais do grupos SHAM, tanto na sístole quanto na diástole. Em relação à fração de ejeção, fração de encurtamento e mudança de área fracional o grupo IAM apresentou valores menores quando comparados ao grupo SHAM (Figura 4 e 5). Não houve diferença entre os grupos IAM, IAMT 1,2, IAMT 2,4 e IAMT 6,0 nestes mesmos parâmetros. Quando comparados os dados de volume sistólico, os grupos IAM, IAMT 1,2, IAMT 2,4 e IAMT 6,0 apresentaram valores maiores em relação ao grupo SHAM.

Não foi observada diferença quando comparado o débito cardíaco entre todos os grupos.

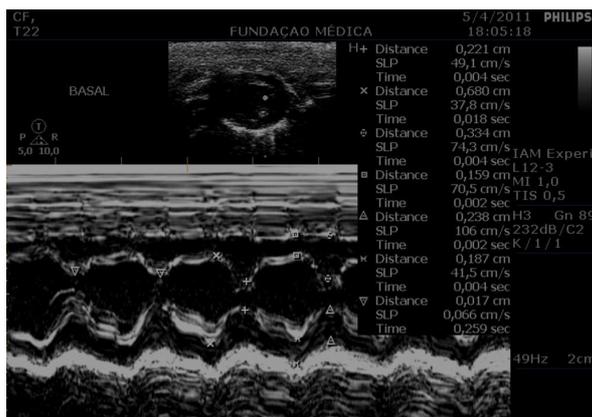


Figura 2. Imagem representativa da análise ecocardiográfica do grupo SHAM no módulo M.

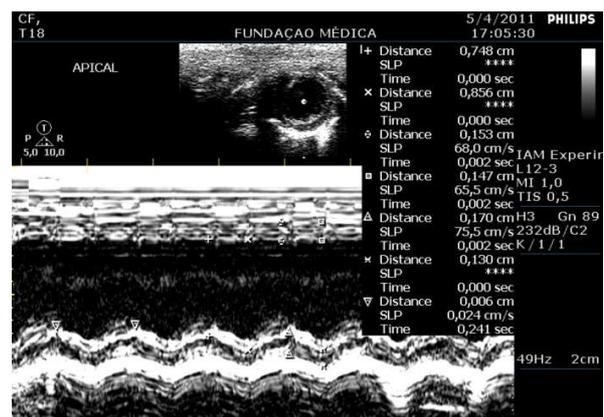


Figura 3. Imagem representativa da análise ecocardiográfica do grupo IAM no módulo M.

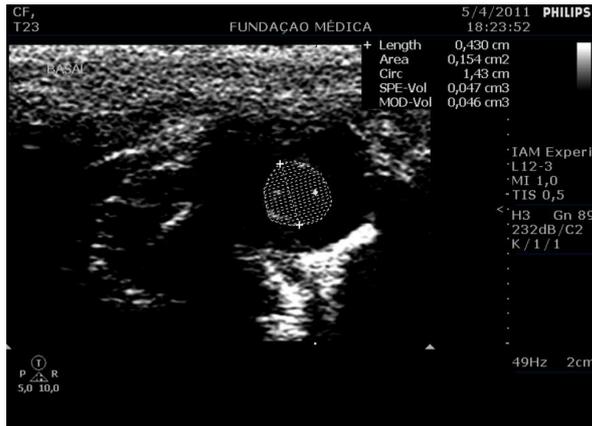


Figura 4. Imagem representativa da análise ecocardiográfica do grupo SHAM no módulo bidimensional.

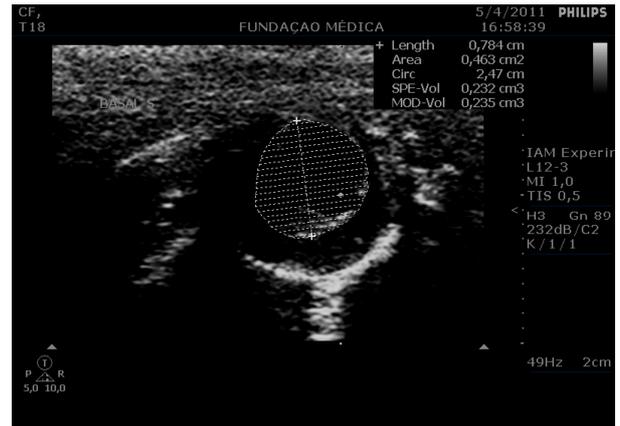


Figura 5. Imagem representativa da análise ecocardiográfica do grupo IAM no módulo bidimensional.

Tabela 2. Dados de função sistólica do ventrículo esquerdo.

	SHAM	IAM	IAMT 1,2	IAMT 2,4	IAMT 6,0
AI (%)	-	58,91 ± 21,07	54,04 ± 18,39	55,39 ± 7,91	51,86 ± 10,74
DS (cm)	0,339 ± 0,066	0,719 ± 0,062*	0,817 ± 0,209*	0,748 ± 0,124*	0,695 ± 0,088*
DD (cm)	0,700 ± 0,055	0,887 ± 0,066*	0,942 ± 0,195*	0,905 ± 0,099*	0,850 ± 0,082*
FEnc (%)	53,27 ± 4,89	18,88 ± 5,88*	13,91 ± 4,74*	17,50 ± 8,42*	18,32 ± 4,49*
FE (%)	71,12 ± 5,83	43,72 ± 6,03*	32,95 ± 9,60*	34,95 ± 14,78*	45,51 ± 9,60*
FAC (%)	0,650 ± 0,061	0,275 ± 0,055*	0,264 ± 0,045*	0,259 ± 0,100*	0,260 ± 0,090*
Vol. Sist. (mL)	0,100 ± 0,030	0,356 ± 0,105*	0,455 ± 0,146*	0,404 ± 0,138*	0,309 ± 0,083*
Vol. Diast. (mL)	0,313 ± 0,058	0,578 ± 0,084*	0,685 ± 0,247*	0,609 ± 0,086*	0,514 ± 0,132*
DC (ml/min)	50,10 ± 16,22	52,20 ± 15,45	48,64 ± 29,41	49,32 ± 15,79	51,50 ± 18,87

Área de infarto (AI), diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DS), diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DD), fração de encurtamento (FEnc), fração de ejeção (FE), mudança de área fracional (FAC), volume sistólico (Vol. Sist.) e volume diastólico (Vol. Diast.) e débito cardíaco (DC). Os dados estão expressos em média ± DP. * $p < 0,05$ vs SHAM.

A tabela 3 apresenta os dados relacionados com a função diastólica do ventrículo esquerdo. Não houve diferença entre os grupos nos parâmetros de função diastólica avaliados neste período de tempo.

Tabela 3. Dados de função diastólica do ventrículo esquerdo.

	SHAM	IAM	IAMT 1,2	IAMT 2,4	IAMT 6,0
Pico E	1,214 ± 0,138	1,290 ± 0,129	1,233 ± 0,394	1,393 ± 0,464	1,372 ± 0,197
Pico A	0,638 ± 0,127	0,625 ± 0,228	0,474 ± 0,214	0,439 ± 0,155	0,570 ± 0,210
Razão E/A	1,944 ± 0,317	1,969 ± 0,666	2,386 ± 1,430	2,576 ± 1,198	2,121 ± 0,388
TFM (s)	0,144 ± 0,023	0,124 ± 0,018	0,146 ± 0,020	0,127 ± 0,021	0,107 ± 0,015
TDM (s)	0,046 ± 0,011	0,044 ± 0,007	0,046 ± 0,017	0,041 ± 0,004	0,044 ± 0,016

Pico E, Pico A, Razão E/A, tempo de fluxo através da valva mitral (TFM) e tempo de desaceleração através da valva mitral (TDM). Os dados estão expressos em média ± DP. Não houve diferença entre os grupos para um $p < 0,05$.

A figura 2 mostra os valores referentes ao índice de *performance* do miocárdio. Os grupos IAM, IAMT 1,2 e IAMT 6,0 apresentaram valores maiores quando comparados ao grupos SHAM. Não houve diferença do grupo IAMT 2,4 em comparação aos demais grupos.

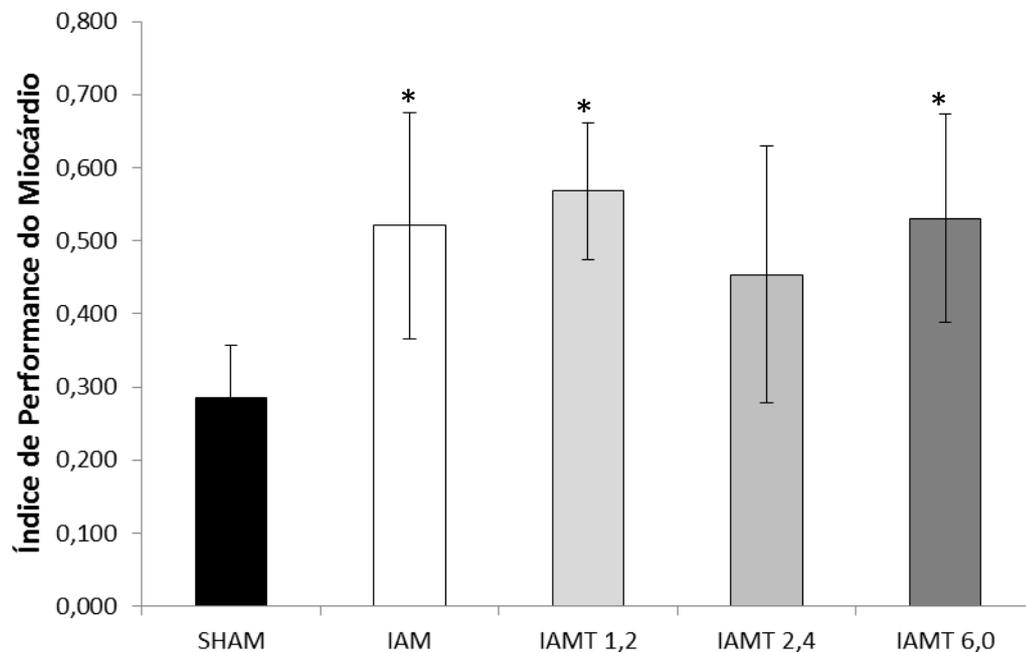


Figura 6. Análise do Índice de performance do miocárdio (MPI). Os dados estão expressos em média ± DP. * $p < 0,05$ vs SHAM.

5.4 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS AO METABOLISMO DO CÁLCIO

5.4.1 Expressão da cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2a)

A figura 3 apresenta os dados relacionados à expressão da proteína SERCA2a. Os grupos IAMT2,4 e IAMT 6,0 apresentaram valores maiores quando comparados com o grupo SHAM. Entretanto, não houve diferença entre os grupos tratados e o grupo IAM. Da mesma maneira, não houve diferença entre o grupo IAM e o grupo SHAM.

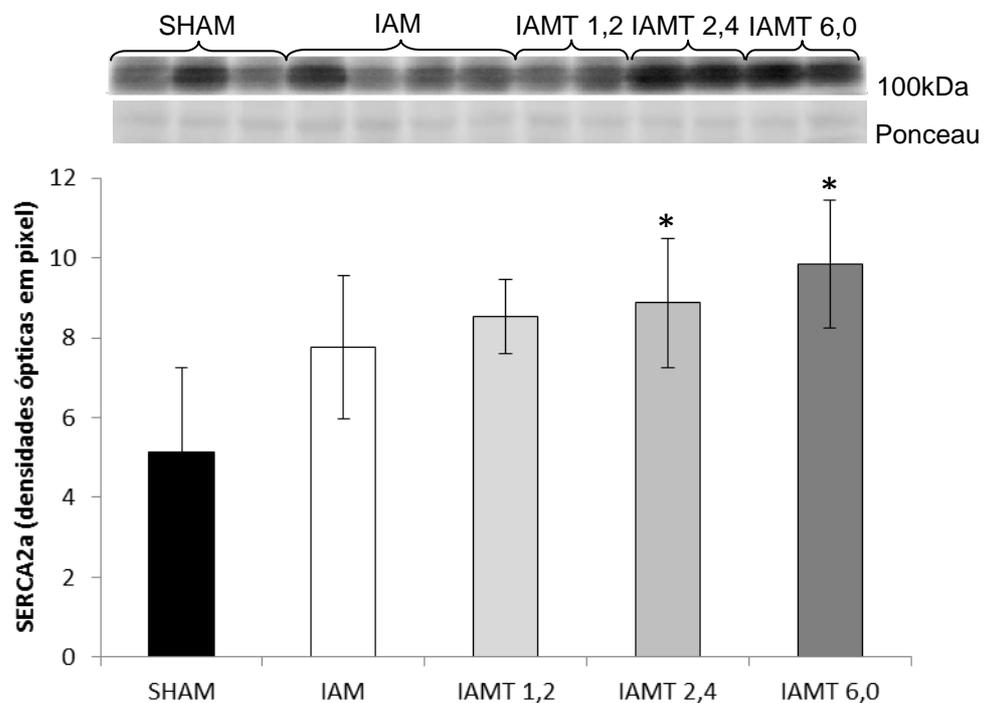


Figura 7. Análise da expressão da SERCA2a (expressa em densidade óptica em pixels normalizada pelo Ponceau). Imagem de um gel representativo do experimento de Western Blot no tecido cardíaco. Os dados estão expressos em média \pm DP (n=4-6). * $p < 0,05$ vs SHAM.

5.4.2 Expressão da fosfolambam (PLB)

A figura 4 apresenta os dados relacionados à expressão da proteína fosfolambam. Os grupos IAM, IAMT 1,2 e IAMT 6,0 apresentaram valores significativamente menores quando comparados com o grupo SHAM. Entretanto, não houve diferença entre os quatro grupos infartados.

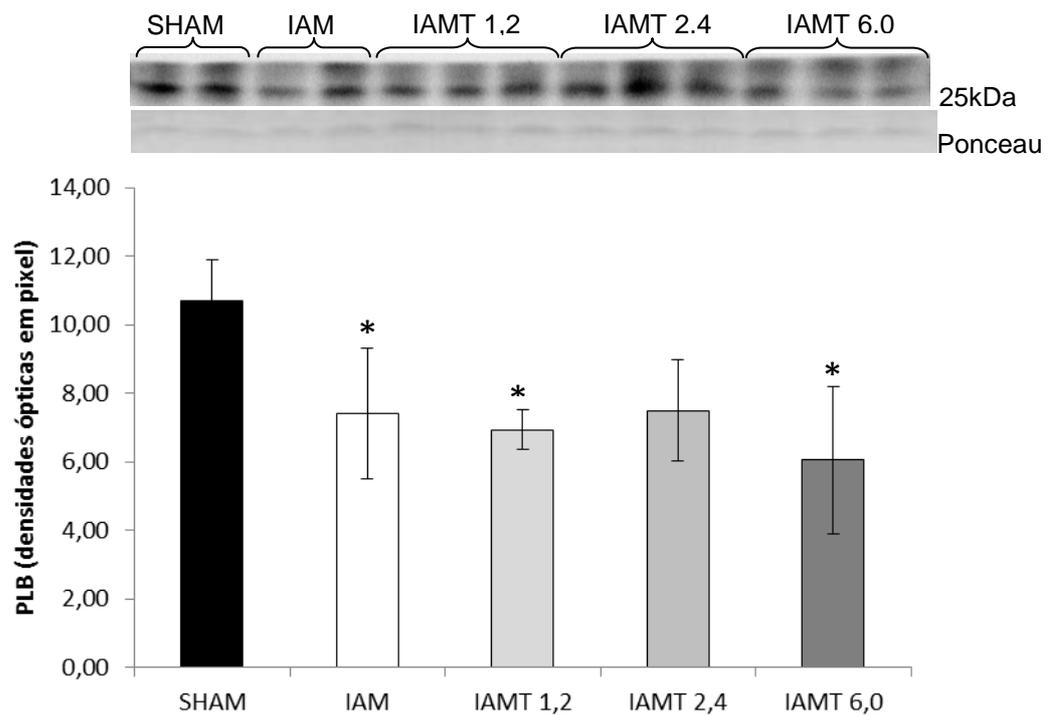


Figura 8. Análise da expressão da PLB (expressa em densidade óptica em pixels normalizada pelo Ponceau). Imagem de um gel representativo do experimento de Western Blot no tecido cardíaco. Os dados estão expressos em média \pm DP (n=4-6). * $p < 0,05$ vs SHAM.

5.5 PARÂMETROS ESTRESSE OXIDATIVO CARDÍACO

5.5.1 Expressão do fator nuclear eritroide do tipo 2 (Nrf2)

A expressão do Nrf2 no tecido cardíaco apresentou-se diminuída nos grupos IAM e IAMT 1,2 quando comparados com o grupo SHAM. Por outro lado, nas doses de tratamento de 2,4 e 6,0 mg/L os valores desta proteína foram semelhantes ao grupo SHAM. Não houve diferença entre os quatro grupos infartados.

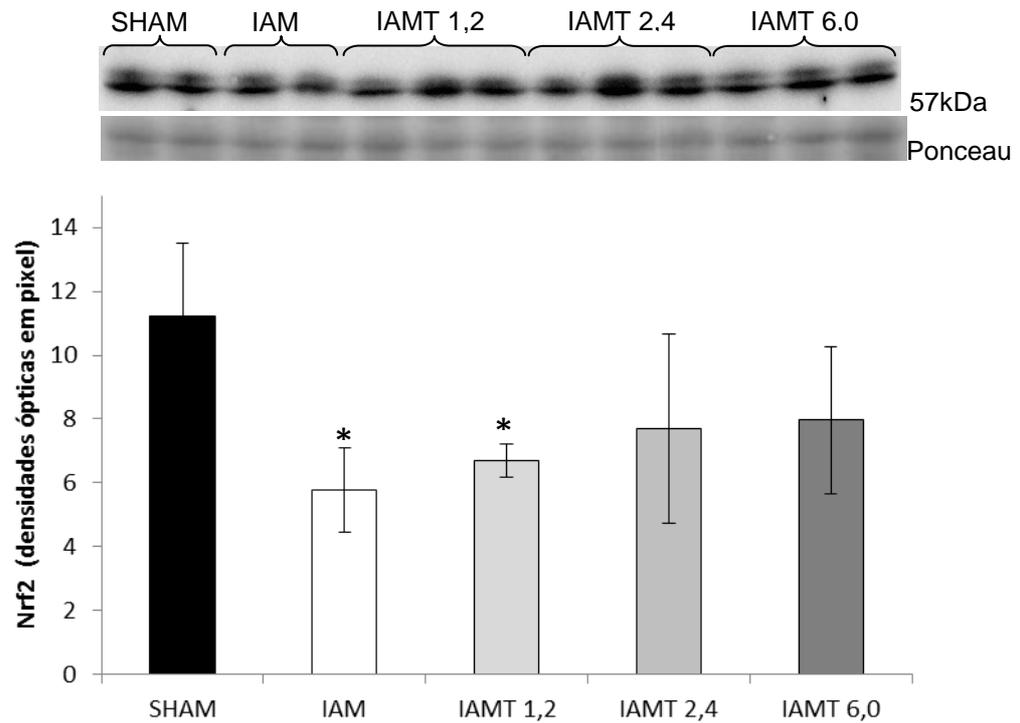


Figura 9. Análise da expressão do Nrf2 (expressa em densidade óptica em pixels normalizada pelo Ponceau). Imagem de um gel representativo do experimento de Western Blot) no tecido cardíaco. Os dados estão expressos em média \pm DP (n=4-6). * $p < 0,05$ vs SHAM.

5.5.2 Expressão da hemeoxigenase 1 (HO-1)

Quando comparados os valores da expressão da proteína HO-1, o grupo IAMT 6,0 apresentou uma média significativamente menor em relação aos grupos SHAM, IAM, IAMT 1,2 e IAMT 2,4. Entretanto, não houve diferença entre os quatro últimos grupos citados.

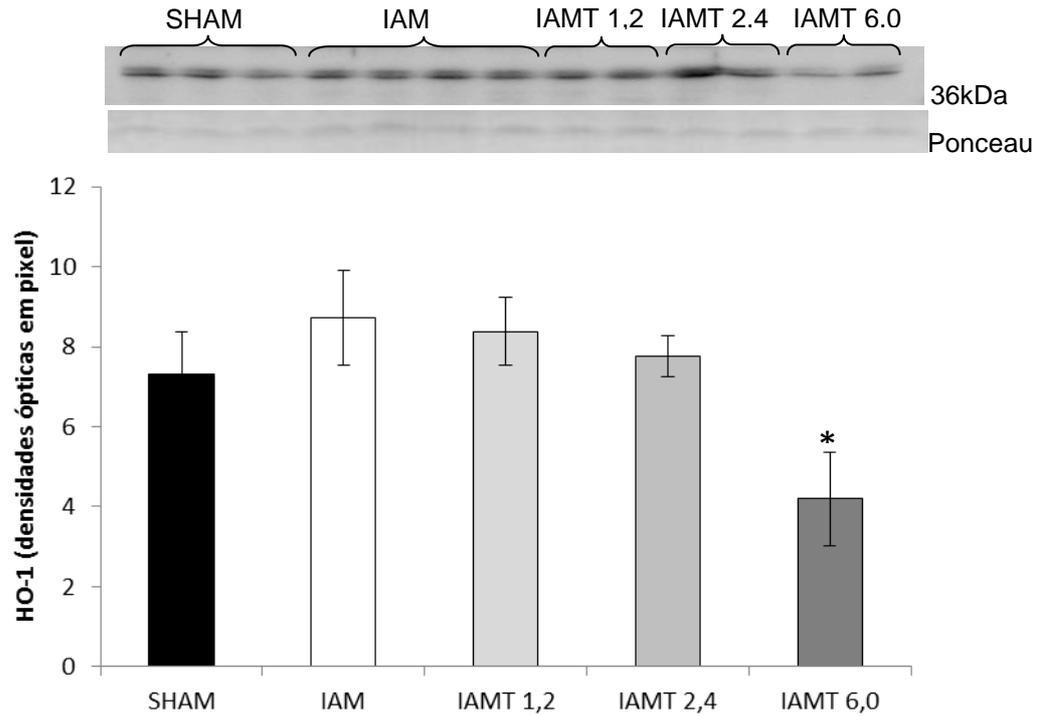


Figura 10. Análise da expressão da hemeoxigenase 1 (expressa em densidade óptica em pixels normalizada pelo Ponceau). Imagem de um gel representativo do experimento de Western Blot no tecido cardíaco. Os dados estão expressos em média \pm DP (n=4-6). * $p=0,002$ vs SHAM, IAM, IAMT1,2 e IAMT2,4.

5.5.3 Glutaciona total

A figura 7 mostra os valores referentes à análise da concentração de glutaciona total no tecido cardíaco. Não houve diferença entre os grupos.

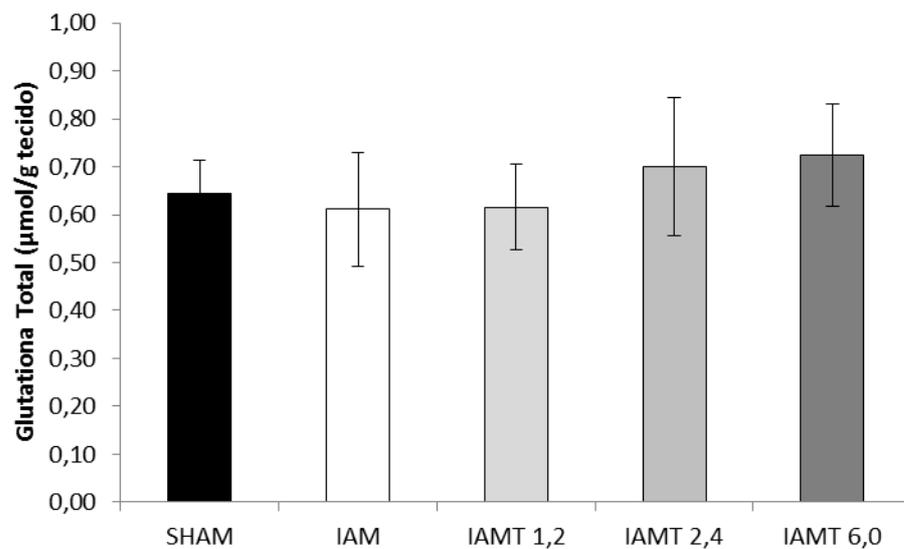


Figura 11. Análise de glutaciona total. Os valores foram expressos em $\mu\text{mol/g}$ de tecido cardíaco. Os dados estão expressos em média \pm DP. Não houve diferença entre os grupos para um $p < 0,05$.

5.5.4 Concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

A figura 8 mostra os dados relacionados à concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) no tecido cardíaco. Não houve diferença entre os grupos envolvidos no estudo.

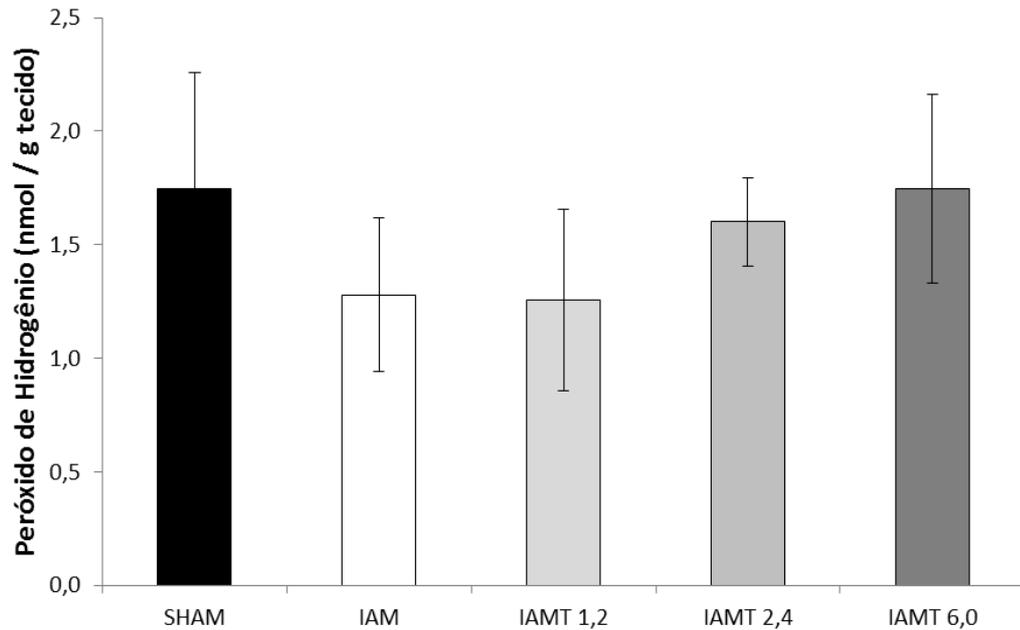


Figura 12. Análise da concentração de peróxido de hidrogênio. Os valores estão apresentados em nmol/g de tecido cardíaco. Os dados estão expressos em média \pm DP. Não houve diferença entre os grupos para um $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho observou-se que o tratamento com tiroxina (T4) aplicado durante o remodelamento pós-infarto agudo do miocárdio (IAM) manteve em níveis semelhantes aos controles os valores da expressão do fator nuclear eritroide do tipo 2 (Nrf2), que havia sido reduzida após o IAM. Esta alteração não foi suficiente, no entanto, para induzir adaptações antioxidantes capazes de modificar os danos funcionais encontrados nos animais que sofreram o processo isquêmico.

Têm sido amplamente discutido na literatura os efeitos dos hormônios da tireoide (HT) no metabolismo e na estrutura do tecido cardíaco em situações fisiológicas, tais como aumento na velocidade de contração e de relaxamento do miocárdio, aumento da frequência cardíaca, aumento do débito cardíaco, redução da resistência periférica total, dentre outros (Kahaly; Dillmann 2005). Em situações patológicas, como no IAM, estes hormônios podem exercer efeitos terapêuticos no miocárdio através da modulação da expressão de proteínas contráteis, de proteínas responsáveis pelo manejo do cálcio na célula, dentre outras (Kahaly; Dillmann 2005; Pantos et al. 2010). Neste sentido, pesquisadores têm estudado o tratamento com HT após o IAM explorando possíveis mecanismos celulares envolvidos nos efeitos terapêuticos (Pantos et al. 2007; Pantos et al. 2009). A curto prazo (14 dias), foi observada uma melhora na resposta inflamatória, na função cardíaca e no remodelamento cardíaco (Pantos et al. 2007; Abohashem-Aly et al. 2011; Pantos et al. 2011). Os efeitos benéficos também foram observados a longo prazo (13 semanas), quando o tratamento com HT ofereceu uma melhora na função e no remodelamento cardíaco (Pantos et al. 2009). Tratamentos utilizando análogos dos HT também vêm sendo estudados com o objetivo de obter apenas os efeitos desejados dos hormônios no tecido cardíaco, uma vez que os mesmos podem causar efeitos metabólicos indesejados (Morkin, Pennock et. al. 2002). Apesar de haver alguns estudos clínicos utilizando hormônios da tireoide, mais estudos experimentais são necessários para a análise dos mecanismos envolvidos na sua cardioproteção.

Neste trabalho, utilizou-se o modelo experimental de IAM, o qual possui grande relevância para elucidar as alterações características do remodelamento cardíaco decorrentes deste evento isquêmico (Pfeffer et al. 1979; Zornoff et al. 2009). Os valores de área de infarto demonstram que o procedimento cirúrgico foi

realizado com sucesso e os animais infartados apresentaram quedas na função cardíaca esperadas para esta janela temporal neste modelo.

Analisando dados morfométricos após 14 dias do IAM, observou-se que a massa corporal dos ratos não foi alterada em razão do IAM e do tratamento com T4, permanecendo semelhante ao grupo SHAM neste período. Estes dados vão ao encontro de outros estudos que analisaram esta variável 14 dias após o IAM (Pantos et al. 2007; Schenkel et al. 2010). O índice de hipertrofia cardíaca (IHC) aumentou nos animais que foram induzidos ao IAM e nos animais que receberam as doses de 2,4 e 6,0 mg/L de T4. O grupo que recebeu a dose de 1,2 mg/L não apresentou valores significativamente maiores de IHC quando comparados ao grupo SHAM, entretanto, o baixo número amostral pode ter contribuído para este resultado. Assim, é possível sugerir que houve uma hipertrofia cardíaca decorrente do IAM, uma vez que a massa corporal dos animais foi homogênea entre todos os grupos, não superestimando os valores de IHC. Esta alteração morfométrica, que ocorre como uma resposta adaptativa após o IAM, já está bem descrita na literatura (Francis et al. 2001; Opie et al. 2006). Após a isquemia do miocárdio, ocorre uma dilatação da câmara cardíaca com consequente aumento do estresse de parede. Como uma tentativa de compensar esta alteração, ocorre um aumento da massa cardíaca. Esta resposta surge para tentar equilibrar a diminuição da fração de ejeção que ocorre após a isquemia cardíaca (Peron et al. 2006).

No presente estudo, os valores dos índices de congestão hepática (ICH) e congestão pulmonar (ICP) não diferiram entre os grupos. Desta maneira, uma vez que o IHC se elevou após o IAM sem evidente edema hepático e pulmonar, estes dados sugerem o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca compensatória, sem o desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva (ICC) neste período após a isquemia do miocárdio. Hill e Singal demonstraram que a ICC só foi estabelecida após oito semanas do IAM, quando analisada através destes índices (Hill; Singal 1996).

Os parâmetros ecocardiográficos utilizados neste estudo possibilitaram a análise de dados pertinentes à geometria e à função sistólica e diastólica do coração. Os grupos IAM, IAMT 1,2, IAMT 2,4 e IAMT 6,0 apresentaram aumento nos diâmetros endocárdicos do ventrículo esquerdo tanto na sístole quanto na diástole. O aumento do diâmetro diastólico (DD) sugere a ocorrência de dilatação cardíaca, uma alteração desenvolvida após o IAM. O aumento do diâmetro sistólico

(DS) juntamente com a diminuição da fração de encurtamento (FEnc) estão relacionados com a queda da função contrátil do coração observada nos animais infartados em nosso trabalho. A fração de ejeção (FE) é calculada levando-se em consideração as variações da área da câmara cardíaca na sístole e na diástole, e reflete a capacidade do coração de exercer sua função de bomba. A FEnc e a FE caíram em torno de 65% e 40%, respectivamente, no grupo IAM e nos grupos que receberam o tratamento. A mudança de área fracional (FAC – *fractional area change*) também caiu em torno de 50%, corroborando os dados de FEnc e, desta forma, representando uma menor capacidade de geração de força contrátil do miocárdio, complementando os dados discutidos acima. Estudos anteriores apresentaram efeitos deletérios semelhantes após o IAM em 14 dias (Pfeffer; Braunwald 1990). Um estudo prévio de nosso laboratório, utilizando medidas ecocardiográficas após o IAM, demonstrou queda na função cardíaca em 48 horas, que foi acentuada em sete dias, sendo que esta não foi adicionalmente prejudicada no período entre 7 e 28 dias (Schenkel et al. 2012).

No presente trabalho, os animais dos grupos IAM, IAMT 1,2 e IAMT 6,0 apresentaram valores de índice de *performance* do miocárdio (MPI – *myocardial performance index*) maiores quando comparados ao grupo SHAM. Este índice está relacionado com o esforço que o miocárdio exerce para manter sua função de bomba. Como descrito na literatura, após o IAM os valores de MPI aumentam, indicando um esforço maior do músculo cardíaco para manter a função de bomba (Poulsen et al. 2000). Deste modo, aumentos dos valores de MPI podem explicar a ausência de diferença no débito cardíaco (DC) observado entre os grupos. Estes dados sugerem que apesar do dano à função contrátil, o coração ainda se encontra em um estado compensado.

As medidas de fluxo sanguíneo através da valva mitral não mostraram alterações decorrentes do IAM. Desta maneira, o enchimento rápido (pico E) e o enchimento lento (pico A) do VE, bem como a razão E/A, não foram alterados. Da mesma forma, o tempo de fluxo e o tempo de desaceleração através da valva mitral não foram comprometidos. Junto com os dados morfométricos, os quais apontam que não houve formação de edema hepático e pulmonar, é sugerido que o retorno venoso não foi alterado, preservando o enchimento cardíaco.

Como descrito anteriormente, o IAM oferece diversos danos à função cardíaca. Os prejuízos na contratilidade e conseqüentemente na função de bomba

do coração são bem pronunciados neste evento cardíaco. Desta forma, diversas medidas terapêuticas vêm sendo estudadas na tentativa de minimizar os efeitos deletérios do IAM. A administração dos HT após o IAM está sendo sugerida como um tratamento nesta situação.

Estudos mostram que quando adicionados à ração, com uma concentração de 0,05%, os hormônios tiroxina (T4) e T3 atingem uma concentração plasmática terapêutica. (Pantos et al. 2007; Pantos et al. 2008; Calise et al. 2009). Pantos e colaboradores (2007) mostraram que as concentrações plasmáticas de T4 e T3 de 129,3 nM/L e 2,2 nM/L, respectivamente, foram eficientes em induzir efeitos positivos com o tratamento com HT. Neste estudo os animais controles apresentaram concentrações plasmáticas de T4 e T3 de 80,6 nM/L e 1,48 nM/L, respectivamente. Nosso laboratório padronizou uma técnica de administração de T4, através da sua diluição na água de beber oferecida aos ratos (Araujo et al. 2006). Entretanto, o objetivo do estudo de Araújo e colaboradores (2008) com este modelo não foi promover a cardioproteção, mas utilizar doses tireotóxicas para induzir o hipertireoidismo nos animais. Por ser o primeiro estudo a testar doses de T4 com objetivo terapêutico em nosso laboratório, o tratamento após o IAM partiu de uma dose dez vezes menor (1,2 mg/L) em relação ao preparado tireotóxico. Como não foi observada melhora em parâmetros de função cardíaca com a dose de 1,2 mg/L, foram então realizados mais dois experimentos com doses de 2,4 mg e 6,0 mg/L. A necessidade de realizar estes três experimentos foi a principal justificativa para o reduzido número amostral nos grupos que receberam o tratamento. O grupo que recebeu a dose mais alta de T4 na água de beber apresentou valor de concentração sanguínea desse hormônio de 7,76 ng/dL, sendo o único grupo a apresentar concentração sanguínea de T4 significativamente maior quando comparado com o grupo SHAM. No entanto, estes valores estão bem abaixo dos valores tireotóxicos já demonstrados por estudos de nosso laboratório (Araujo et al. 2006).

A administração dos HT após o IAM é descrita de diversas formas na literatura, sendo ela via injeção intraperitoneal ou subcutânea, adição dos hormônios na ração oferecida aos ratos, dentre outras. Pantos e colaboradores (2007) observaram efeitos positivos utilizando T4 e T3 como tratamento, durante 14 dias, após o IAM através da adição dos hormônios na ração, em uma concentração de 0,42 µg/mg T3 e 1,7 µg/mg T4. Estes mesmos autores descreveram que a ação

terapêutica aguda é dependente do receptor alfa 1 dos hormônios da tireoide (TR α 1), que é sensível apenas ao T3 (Pantos et al. 2011). Desta maneira, um aspecto importante para explicar os diferentes achados é que o T4 pode exercer efeitos benéficos após um período de tratamento superior a 14 dias e que a administração do T4 juntamente com o T3 pode potencializar os efeitos do tratamento e oferecer alterações a curto prazo.

Os mecanismos pelos quais os HT poderiam exercer um efeito terapêutico após o IAM envolvem suas ações clássicas no tecido cardíaco, que estão relacionadas com efeitos inotrópicos e cronotrópicos positivos. Estes hormônios agem de maneira pleiotrópica no miocárdio, modulando o metabolismo cardíaco e a expressão de proteínas relacionadas com a capacidade contrátil (Dillmann 2010). Aumento na expressão da proteína SERCA2a e diminuição da proteína PLB, que modulam a recaptação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático foram encontrados após a administração dos HT (Kahaly; Dillmann 2005).

Em nosso estudo, foi observado um aumento na expressão da SERCA2a nas doses de 2,4 e 6,0 mg/L de T4 em relação ao grupo SHAM, o que sugere um potencial efeito lusitrópico positivo utilizando-se apenas T4, entretanto este efeito não se refletiu na função diastólica neste período de tratamento. Outro resultado importante foi observado nos grupos IAMT 1,2 e IAMT 6,0, nos quais a expressão da PLB diminuiu em relação ao grupo SHAM. Uma menor expressão desta proteína pode reduzir a possibilidade da SERCA2a ser inibida, contribuindo para uma recaptação mais eficiente de cálcio pelo retículo sarcoplasmático. O grupo IAM também apresentou uma diminuição na expressão desta proteína, diferente do proposto por outros autores (Pantos et al. 2007). Entretanto, estes mesmos autores publicaram dados referentes à relação SERCA2a/PLB, o que não representa os valores absolutos da PLB. Ojamaa e colaboradores (2000) analisaram a expressão da PLB após três e quatro semanas do IAM, entretanto os valores desta proteína foram apresentados pelos autores apenas no período de quatro semanas após o IAM. Além disso, a expressão desta proteína não reflete a atividade da mesma, a qual pode estar aumentada ou diminuída, independente da quantidade da proteína disponível. Sendo assim, estudos ainda estão sendo desenvolvidos na tentativa de elucidar o papel desta proteína em diferentes fases do remodelamento cardíaco após o IAM.

Até o presente momento, poucos estudos foram realizados envolvendo o tratamento com HT após o IAM relacionando parâmetros de EO. As EROs e o sistema de defesa antioxidante podem modular a atividade e a expressão de algumas proteínas, tais como aquelas relacionadas ao metabolismo do cálcio, bem como ativar vias de sinalização que podem induzir processos patológicos ou de sobrevivência, dependendo de suas concentrações (Zima; Blatter 2006; Elahi et al. 2009). Canais e transportadores de cálcio, tais como a SERCA2a e o receptor de rianodina, possuem grupos sulfidríla (-SH) que são passíveis de oxidação pelas EROs. Desta maneira, o estado de oxidação dos -SH determina a atividade do transportador (Zima; Blatter 2006). Variações nas concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma ERO, também poderiam estar relacionadas com alterações na expressão de proteínas relacionadas com o remodelamento cardíaco (Kobayashi; Yamamoto 2005). Uma destas proteínas é a hemeoxigenase 1 (HO-1), que além de exercer uma função antioxidante, também desempenha um papel importante na inibição da apoptose de cardiomiócitos e atenua o remodelamento cardíaco patológico (Wang et al. 2010).

Neste sentido, nosso estudo analisou a concentração de H_2O_2 , a concentração de glutatona total e a expressão das proteínas Nrf2 e HO-1 no tecido cardíaco.

Em nosso trabalho, não observamos diferenças nas concentrações de H_2O_2 e de glutatona total após 14 dias do IAM nos ratos apenas infartados e nos grupos que receberam o tratamento com T4. Estes dados sugerem que, neste modelo de tratamento e neste período de tempo após o IAM, aparentemente não há alteração nesta ERO e no principal antioxidante não enzimático celular. Schenkel e colaboradores observaram que não houve mudança na concentração de H_2O_2 entre animais infartados e animais controles em sete dias após a isquemia do miocárdio. Este mesmo autor descreveu que a relação da glutatona reduzida (GSH) pela glutatona oxidada (GSSG) mostrou o mesmo perfil neste período de tempo, o que sugere a ausência de desequilíbrio do estado redox celular (Schenkel et al. 2012).

A expressão do Nrf2 foi diminuída em razão do IAM e o tratamento com T4 na dose de 1,2 mg/L não foi capaz de melhorar esta situação. Por outro lado, nas doses de 2,4 e 6,0 mg/L os valores desta proteína foram semelhantes ao grupo SHAM. A ativação do Nrf2 pode ser induzida por EROs, prostaglandinas, grupos heme, dentre outros (Kobayashi; Yamamoto 2005). Desta forma, as doses mais altas de T4,

principalmente a dose de 6,0 mg/L, podem estar estimulando a produção de fatores que induzem a ativação do Nrf2, o que pode representar um dos mecanismos pelos quais os HT promovem seus efeitos positivos. O Nrf2 quando ativado está relacionado com o aumento dos mecanismos de defesa antioxidante (Kobayashi; Yamamoto 2005).

Em nosso trabalho não foi observada diferença na expressão da HO-1 entre os grupos SHAM, IAM, IAMT 1,2 e IAMT 2,4. Além disto, o grupo IAMT 6,0 apresentou uma diminuição na expressão desta proteína. A HO-1 é uma proteína intimamente relacionada com processos isquêmicos e tem sua expressão estimulada através da redução da concentração de oxigênio tecidual (Maines 1997; Lublinghoff et al. 2009). Neste sentido, seria esperado um aumento significativo de sua expressão já em 25 horas após a isquemia, retornando a valores controles após dois dias (Llesuy; Tomaro 1994). Entretanto, como a HO-1 foi analisada 14 dias após a isquemia do miocárdio, é possível que sua expressão já tenha retornado a valores controles. Além disso, é plausível sugerir que o tratamento com T4 na dose mais alta, por estimular o metabolismo e o aporte sanguíneo tecidual, possa contribuir para uma menor estimulação da expressão da HO-1 observada neste grupo.

Como descrito anteriormente, o grupo IAMT 6,0 apresentou valores maiores de Nrf2, uma proteína que quando ativada pode estimular a transcrição de diversas proteínas antioxidantes. Araújo e colaboradores (2010), utilizando um modelo de hipertireoidismo induzido por T4, observaram que o Nrf2 estava aumentado no grupo que recebeu o hormônio, e este mesmo grupo apresentou valores significativamente maiores de tiorredoxina (Trx) e peroxirredoxina (Prx). Desta maneira, podemos sugerir que a manutenção do Nrf2 em níveis controles no grupo IAMT 6,0, pode estar estimulando a expressão de outras proteínas, tais como a Trx e a Prx.

Por fim, acreditamos que a análise de outras proteínas relacionadas com o estado redox celular e com o remodelamento cardíaco após o IAM são de extrema importância para preencher as lacunas deixadas por este trabalho.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os dados apresentados em nosso estudo, podemos concluir que a dose de tratamento de 6,0 mg/L de tiroxina (T4) após o IAM foi eficiente em aumentar a concentração sanguínea deste hormônio, o que seria necessário para promover os efeitos positivos do tratamento. Entretanto, independente da dose utilizada, o tratamento não foi eficaz em reverter a hipertrofia cardíaca induzida pelo IAM. A função sistólica foi prejudicada após o IAM e o tratamento com T4 não foi eficiente em melhorar esta situação. Por outro lado, a função diastólica não foi alterada após o IAM e pelo tratamento com T4.

Como esperado, os animais tratados com T4 na dose de 6,0 mg/L apresentaram maior expressão da proteína cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2a) e uma menor expressão da proteína fosfolambam (PLB) quando comparados com o grupo SHAM.

Não houve diferença na concentração de peróxido de hidrogênio e glutatona total entre os grupos. Por outro lado, o fator de transcrição eritroide do tipo 2 (Nrf2), um importante fator de transcrição relacionado com a expressão de proteínas antioxidantes, teve sua expressão preservada no grupo que recebeu o tratamento na dose de 6,0 mg/L.

Desta forma é possível concluir que, uma vez que o IAM induziu redução da expressão do Nrf2, isto poderia prejudicar a manutenção de sistemas de defesa antioxidante. Entretanto, a dose de 6,0 mg/L manteve a expressão do Nrf2 (um fator de transcrição envolvido na resposta adaptativa dos sistemas antioxidantes) ao nível do grupo SHAM. Esta resposta pode estar relacionada com a cardioproteção demonstrada na literatura utilizando HT em diferentes protocolos. Entretanto, novos estudos, explorando outros parâmetros relacionados ao estresse oxidativo, serão importantes para determinar a relevância deste fenômeno na resposta cardioprotetora dos HT.

8 PERSPECTIVAS

1) Determinar a expressão de outras proteínas relacionadas com o estresse oxidativo, como a tioredoxina e a peroxirredoxina.

2) Analisar o mesmo modelo de tratamento após o IAM com uma duração mais longa, por exemplo, 28 dias, quando são notadas alterações mais pronunciadas na função sistólica e na função diastólica.

3) Utilizar a mesma via de tratamento proposta por este trabalho, durante o mesmo tempo de administração (14 dias), mas com a adição de triiodotironina (T3).

9 REFERÊNCIAS

- Abohashem-Aly, A. A.; X. Meng; J. Li; M. R. Sadaria; L. Ao; J. Wennergren; D. A. Fullerton; C. D. Raeburn (2011). "DITPA, a thyroid hormone analog, reduces infarct size and attenuates the inflammatory response following myocardial ischemia." J Surg Res **171**(2): 379-385.
- Akerboom, T. P.; H. Sies (1981). "Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples." Methods Enzymol **77**: 373-382.
- Anzai, K.; K. Ogawa; A. Kuniyasu; T. Ozawa; H. Yamamoto; H. Nakayama (1998). "Effects of hydroxyl radical and sulfhydryl reagents on the open probability of the purified cardiac ryanodine receptor channel incorporated into planar lipid bilayers." Biochem Biophys Res Commun **249**(3): 938-942.
- Araujo, A. S.; T. Fernandes; M. F. Ribeiro; N. Khaper; A. Bello-Klein (2010). "Redox regulation of myocardial ERK 1/2 phosphorylation in experimental hyperthyroidism: role of thioredoxin-peroxiredoxin system." J Cardiovasc Pharmacol **56**(5): 513-517.
- Araujo, A. S.; M. F. Ribeiro; A. Enzweiler; P. Schenkel; T. R. Fernandes; W. A. Partata; M. C. Irigoyen; S. Llesuy; A. Bello-Klein (2006). "Myocardial antioxidant enzyme activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism." Mol Cell Endocrinol **249**(1-2): 133-139.
- Araujo, A. S.; P. Schenkel; A. T. Enzweiler; T. R. Fernandes; W. A. Partata; S. Llesuy; M. F. Ribeiro; N. Khaper; P. K. Singal; A. Bello-Klein (2008). "The role of redox signaling in cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism." J Mol Endocrinol **41**(6): 423-430.
- Araujo, A. S.; F. E. Seibel; U. O. Oliveira; T. Fernandes; S. Llesuy; L. Kucharski; A. Bello-Klein (2011). "Thyroid hormone-induced haemoglobin changes and antioxidant enzymes response in erythrocytes." Cell Biochem Funct **29**(5): 408-413.
- Azambuja, M. I.; M. Foppa; M. F. Maranhao; A. C. Achutti (2008). "Economic burden of severe cardiovascular diseases in Brazil: an estimate based on secondary data." Arq Bras Cardiol **91**(3): 148-155, 163-171.

- Balshaw, D. M.; L. Xu; N. Yamaguchi; D. A. Pasek; G. Meissner (2001). "Calmodulin binding and inhibition of cardiac muscle calcium release channel (ryanodine receptor)." J Biol Chem **276**(23): 20144-20153.
- Bernardo, B. C.; K. L. Weeks; L. Pretorius; J. R. McMullen (2010). "Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies." Pharmacol Ther **128**(1): 191-227.
- Boersma, E.; N. Mercado; D. Poldermans; M. Gardien; J. Vos; M. L. Simoons (2003). "Acute myocardial infarction." Lancet **361**(9360): 847-858.
- Boraso, A.; A. J. Williams (1994). "Modification of the gating of the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-release channel by H₂O₂ and dithiothreitol." Am J Physiol **267**(3 Pt 2): H1010-1016.
- Calise, F.; L. Capussotti; S. Caterino; A. Delitala; P. Terrazzi; M. Francucci; A. Gaspari; M. Langer; A. M. Marata; C. Martelli; M. L. Moro; A. Pantosti; D. Passali; N. Petrosillo; R. Polastri; G. M. Rossolini; W. Santaniello; F. Scaglione; V. Ziparo (2009). "Perioperative antibiotic prophylaxis in adults. Outline of the principal recommendations. National reference guidelines." Minerva Anestesiol **75**(9): 543-547, 548-552.
- Camilli, R.; M. Del Grosso; F. Iannelli; A. Pantosti (2008). "New genetic element carrying the erythromycin resistance determinant erm(TR) in *Streptococcus pneumoniae*." Antimicrob Agents Chemother **52**(2): 619-625.
- Coceani, M.; G. Iervasi; A. Pingitore; C. Carpeggiani; A. L'Abbate (2009). "Thyroid hormone and coronary artery disease: from clinical correlations to prognostic implications." Clin Cardiol **32**(7): 380-385.
- Dalal, H.; P. H. Evans; J. L. Campbell (2004). "Recent developments in secondary prevention and cardiac rehabilitation after acute myocardial infarction." BMJ **328**(7441): 693-697.
- Dillmann, W. (2010). "Cardiac hypertrophy and thyroid hormone signaling." Heart Fail Rev **15**(2): 125-132.
- Downey, J. M.; A. M. Davis; M. V. Cohen (2007). "Signaling pathways in ischemic preconditioning." Heart Fail Rev **12**(3-4): 181-188.
- Elahi, M. M.; Y. X. Kong; B. M. Matata (2009). "Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease." Oxid Med Cell Longev **2**(5): 259-269.

- Francis, J.; R. M. Weiss; S. G. Wei; A. K. Johnson; R. B. Felder (2001). "Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **281**(5): R1734-1745.
- Fujii, J.; J. I. Ito; X. Zhang; T. Kurahashi (2011). "Unveiling the roles of the glutathione redox system in vivo by analyzing genetically modified mice." J Clin Biochem Nutr **49**(2): 70-78.
- Goldim, J. R.; M. M. Raymundo (1997). Pesquisa em saúde e direito dos animais. Porto Alegre, HCPA.
- Goldman, S.; M. McCarren; E. Morkin; P. W. Ladenson; R. Edson; S. Warren; J. Ohm; H. Thai; L. Churby; J. Barnhill; T. O'Brien; I. Anand; A. Warner; B. Hattler; M. Dunlap; J. Erikson; M. C. Shih; P. Lavori (2009). "DITPA (3,5-Diiodothyropropionic Acid), a thyroid hormone analog to treat heart failure: phase II trial veterans affairs cooperative study." Circulation **119**(24): 3093-3100.
- Grieve, D. J.; J. A. Byrne; A. C. Cave; A. M. Shah (2004). "Role of oxidative stress in cardiac remodelling after myocardial infarction." Heart Lung Circ **13**(2): 132-138.
- Hill, M. F.; P. K. Singal (1996). "Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats." Am J Pathol **148**(1): 291-300.
- Iervasi, G.; A. Pingitore; P. Landi; M. Raciti; A. Ripoli; M. Scarlattini; A. L'Abbate; L. Donato (2003). "Low-T3 syndrome: a strong prognostic predictor of death in patients with heart disease." Circulation **107**(5): 708-713.
- Jones, D. P. (2006). "Redefining oxidative stress." Antioxid Redox Signal **8**(9-10): 1865-1879.
- Jugdutt, B. I. (2003). "Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough?" Circulation **108**(11): 1395-1403.
- Jugdutt, B. I. (2012). "Ischemia/Infarction." Heart Fail Clin **8**(1): 43-51.
- Kahaly, G. J.; W. H. Dillmann (2005). "Thyroid hormone action in the heart." Endocr Rev **26**(5): 704-728.
- Kinugawa, S.; H. Tsutsui; S. Hayashidani; T. Ide; N. Suematsu; S. Satoh; H. Utsumi; A. Takeshita (2000). "Treatment with dimethylthiourea prevents left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction in mice: role of oxidative stress." Circ Res **87**(5): 392-398.

- Klein, D.; R. M. Kern; R. Z. Sokol (1995). "A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes." Biochem Mol Biol Int **36**(1): 59-66.
- Kobayashi, M.; M. Yamamoto (2005). "Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation." Antioxid Redox Signal **7**(3-4): 385-394.
- Kwon, S. H.; D. R. Pimentel; A. Remondino; D. B. Sawyer; W. S. Colucci (2003). "H₂O₂ regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways." J Mol Cell Cardiol **35**(6): 615-621.
- Lee, J. M.; J. A. Johnson (2004). "An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism." J Biochem Mol Biol **37**(2): 139-143.
- Llesuy, S. F.; J. Milei; H. Molina; A. Boveris; S. Milei (1985). "Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice." Tumori **71**(3): 241-249.
- Llesuy, S. F.; M. L. Tomaro (1994). "Heme oxygenase and oxidative stress. Evidence of involvement of bilirubin as physiological protector against oxidative damage." Biochim Biophys Acta **1223**(1): 9-14.
- Lowry, O. H.; N. J. Rosebrough; A. L. Farr; R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.
- Lublinghoff, N.; K. Winkler; B. R. Winkelmann; U. Seelhorst; B. Wellnitz; B. O. Boehm; W. Marz; M. M. Hoffmann (2009). "Genetic variants of the promoter of the heme oxygenase-1 gene and their influence on cardiovascular disease (the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study)." BMC Med Genet **10**: 36.
- Lymvaivos, I.; I. Mourouzis; D. V. Cokkinos; M. A. Dimopoulos; S. T. Toumanidis; C. Pantos (2011). "Thyroid hormone and recovery of cardiac function in patients with acute myocardial infarction: a strong association?" Eur J Endocrinol **165**(1): 107-114.
- Maines, M. D. (1997). "The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases." Annu Rev Pharmacol Toxicol **37**: 517-554.
- Melmed, S.; K. S. Polonsky; P. R. Larsen; H. M. Kronenberg (2011). William's Textbook of Endocrinology. Philadelphia, Saunders/Elsevier.
- Mercier, J. C.; T. G. DiSessa; J. M. Jarmakani; T. Nakanishi; S. Hiraishi; J. Isabel-Jones; W. F. Friedman (1982). "Two-dimensional echocardiographic

- assessment of left ventricular volumes and ejection fraction in children." Circulation **65**(5): 962-969.
- Ministério da Saúde. (2009). "[ELSA Brasil: the greatest epidemiological study in Latin America]." Rev Saude Publica **43**(1).
- Morkin, E. (1993). "Regulation of myosin heavy chain genes in the heart." Circulation **87**(5): 1451-1460.
- Morkin, E.; G. D. Pennock; P. H. Spooner; J. J. Bahl; S. Goldman (2002). "Clinical and experimental studies on the use of 3,5-diiodothyropropionic acid, a thyroid hormone analogue, in heart failure." Thyroid **12**(6): 527-533.
- Nozawa, E.; R. M. Kanashiro; N. Murad; A. C. Carvalho; S. L. Cravo; O. Campos; P. J. Tucci; V. A. Moises (2006). "Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats." Braz J Med Biol Res **39**(5): 687-695.
- Ojamaa, K.; A. Kenessey; R. Shenoy; I. Klein (2000). "Thyroid hormone metabolism and cardiac gene expression after acute myocardial infarction in the rat." Am J Physiol Endocrinol Metab **279**(6): E1319-1324.
- Opie, L. H.; P. J. Commerford; B. J. Gersh; M. A. Pfeffer (2006). "Controversies in ventricular remodelling." Lancet **367**(9507): 356-367.
- Pantos, C.; I. Mourouzis; D. V. Cokkinos (2010). "Rebuilding the post-infarcted myocardium by activating 'physiologic' hypertrophic signaling pathways: the thyroid hormone paradigm." Heart Fail Rev **15**(2): 143-154.
- Pantos, C.; I. Mourouzis; D. V. Cokkinos (2010). "Thyroid hormone as a therapeutic option for treating ischaemic heart disease: from early reperfusion to late remodelling." Vascul Pharmacol **52**(3-4): 157-165.
- Pantos, C.; I. Mourouzis; K. Markakis; A. Dimopoulos; C. Xinaris; A. D. Kokkinos; M. Panagiotou; D. V. Cokkinos (2007). "Thyroid hormone attenuates cardiac remodeling and improves hemodynamics early after acute myocardial infarction in rats." Eur J Cardiothorac Surg **32**(2): 333-339.
- Pantos, C.; I. Mourouzis; K. Markakis; N. Tsagoulis; M. Panagiotou; D. V. Cokkinos (2008). "Long-term thyroid hormone administration reshapes left ventricular chamber and improves cardiac function after myocardial infarction in rats." Basic Res Cardiol **103**(4): 308-318.
- Pantos, C.; I. Mourouzis; T. Saranteas; V. Brozou; G. Galanopoulos; G. Kostopanagiotou; D. V. Cokkinos (2011). "Acute T3 treatment protects the

- heart against ischemia-reperfusion injury via TRalpha1 receptor." Mol Cell Biochem **353**(1-2): 235-241.
- Pantos, C.; I. Mourouzis; N. Tsagoulis; K. Markakis; G. Galanopoulos; N. Roukounakis; P. Perimenis; A. Liappas; D. V. Cokkinos (2009). "Thyroid hormone at supra-physiological dose optimizes cardiac geometry and improves cardiac function in rats with old myocardial infarction." J Physiol Pharmacol **60**(3): 49-56.
- Peron, A. P.; R. M. Saraiva; E. L. Antonio; P. J. Tucci (2006). "[Mechanical function is normal in remanent myocardium during the healing period of myocardial infarction--despite congestive heart failure]." Arq Bras Cardiol **86**(2): 105-112.
- Pfeffer, M. A.; E. Braunwald (1990). "Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications." Circulation **81**(4): 1161-1172.
- Pfeffer, M. A.; J. M. Pfeffer; M. C. Fishbein; P. J. Fletcher; J. Spadaro; R. A. Kloner; E. Braunwald (1979). "Myocardial infarct size and ventricular function in rats." Circ Res **44**(4): 503-512.
- Pick, E.; Y. Keisari (1980). "A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture." J Immunol Methods **38**(1-2): 161-170.
- Poulsen, S. H.; J. C. Nielsen; H. R. Andersen (2000). "The influence of heart rate on the Doppler-derived myocardial performance index." J Am Soc Echocardiogr **13**(5): 379-384.
- Sartorio, C. L.; D. Fraccarollo; P. Galuppo; M. Leutke; G. Ertl; I. Stefanon; J. Bauersachs (2007). "Mineralocorticoid receptor blockade improves vasomotor dysfunction and vascular oxidative stress early after myocardial infarction." Hypertension **50**(5): 919-925.
- Schenkel, P. C.; A. M. Tavares; R. O. Fernandes; G. P. Diniz; M. Bertagnolli; A. S. da Rosa Araujo; M. L. Barreto-Chaves; M. F. Ribeiro; N. Clausell; A. Bello-Klein (2010). "Redox-sensitive prosurvival and proapoptotic protein expression in the myocardial remodeling post-infarction in rats." Mol Cell Biochem **341**(1-2): 1-8.
- Schenkel, P. C.; A. V. Tavares; R. O. Fernandes; G. P. Diniz; A. R. Ludke; M. F. Ribeiro; A. S. Araujo; M. L. Barreto-Chaves; A. Bello-Klein (2012). "Time

- course of hydrogen peroxide/thioredoxin balance and its influence on the intracellular signaling in myocardial infarction." Exp Physiol.
- Shaheen, M.; Y. Cheema; A. U. Shahbaz; S. K. Bhattacharya; K. T. Weber (2011). "Intracellular calcium overloading and oxidative stress in cardiomyocyte necrosis via a mitochondriocentric signal-transducer-effector pathway." Exp Clin Cardiol **16**(4): 109-115.
- Sies, H.; E. Cadenas (1985). "Oxidative stress: damage to intact cells and organs." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **311**(1152): 617-631.
- Singal, P. K.; N. Khaper; F. Farahmand; A. Bello-Klein (2000). "Oxidative stress in congestive heart failure." Curr Cardiol Rep **2**(3): 206-211.
- Singh, R. B.; M. A. Niaz; S. S. Rastogi; S. Rastogi (1996). "Usefulness of antioxidant vitamins in suspected acute myocardial infarction (the Indian experiment of infarct survival-3)." Am J Cardiol **77**(4): 232-236.
- Skuladottir, G. V.; D. Shi-Hua; A. E. Brodie; D. J. Reed; R. C. Wander (1994). "Effects of dietary oils and methyl ethyl ketone peroxide on in vivo lipid peroxidation and antioxidants in rat heart and liver." Lipids **29**(5): 351-357.
- Smith, C. S.; M. G. Harbrecht; S. M. Coronel; M. J. Krantz (2008). "State consensus guideline for the prevention of cardiovascular disease in primary care settings." Crit Pathw Cardiol **7**(2): 122-125.
- Sociedade Brasileira de Cardiologia. (2004). "[III Guidelines on the treatment of myocardial acute infarction]." Arq Bras Cardiol **83 Suppl 4**: 3-86.
- Sutton, M. G.; N. Sharpe (2000). "Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy." Circulation **101**(25): 2981-2988.
- Suzuki, Y. J.; G. D. Ford (1999). "Redox regulation of signal transduction in cardiac and smooth muscle." J Mol Cell Cardiol **31**(2): 345-353.
- Takimoto, E.; D. A. Kass (2007). "Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling." Hypertension **49**(2): 241-248.
- Talukder, M. A.; F. Yang; Y. Nishijima; C. A. Chen; L. Xie; S. D. Mahamud; A. Kalyanasundaram; J. D. Bonagura; M. Periasamy; J. L. Zweier (2011). "Detrimental effects of thyroid hormone analog DITPA in the mouse heart: increased mortality with in vivo acute myocardial ischemia-reperfusion." Am J Physiol Heart Circ Physiol **300**(2): H702-711.
- Tavares, A. M.; A. S. da Rosa Araujo; G. Baldo; U. Matte; N. Khaper; A. Bello-Klein; L. E. Rohde; N. Clausell (2010). "Bone marrow derived cells decrease

- inflammation but not oxidative stress in an experimental model of acute myocardial infarction." Life Sci **87**(23-26): 699-706.
- Valko, M.; D. Leibfritz; J. Moncol; M. T. Cronin; M. Mazur; J. Telser (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." Int J Biochem Cell Biol **39**(1): 44-84.
- Venditti, P.; S. Di Meo (2006). "Thyroid hormone-induced oxidative stress." Cell Mol Life Sci **63**(4): 414-434.
- Videla, L. A. (2010). "Hormetic responses of thyroid hormone calorigenesis in the liver: Association with oxidative stress." IUBMB Life **62**(6): 460-466.
- Wagener, F. A.; H. D. Volk; D. Willis; N. G. Abraham; M. P. Soares; G. J. Adema; C. G. Figdor (2003). "Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation." Pharmacol Rev **55**(3): 551-571.
- Wang, G.; T. Hamid; R. J. Keith; G. Zhou; C. R. Partridge; X. Xiang; J. R. Kingery; R. K. Lewis; Q. Li; D. G. Rokosh; R. Ford; F. G. Spinale; D. W. Riggs; S. Srivastava; A. Bhatnagar; R. Bolli; S. D. Prabhu (2010). "Cardioprotective and antiapoptotic effects of heme oxygenase-1 in the failing heart." Circulation **121**(17): 1912-1925.
- World Health Organization. (2008). The global burden of disease : 2004 update. Geneva, World Health Organization.
- Xu, K. Y.; J. L. Zweier; L. C. Becker (1997). "Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase function by direct attack on the ATP binding site." Circ Res **80**(1): 76-81.
- Zhu, H.; K. Itoh; M. Yamamoto; J. L. Zweier; Y. Li (2005). "Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury." FEBS Lett **579**(14): 3029-3036.
- Zima, A. V.; L. A. Blatter (2006). "Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters." Cardiovasc Res **71**(2): 310-321.
- Zornoff, L. A.; S. A. Paiva; M. F. Minicucci; J. Spadaro (2009). "Experimental myocardium infarction in rats: analysis of the model." Arq Bras Cardiol **93**(4): 434-440, 426-432.