

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO**  
**EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**TESE**

**PAPEL DO RECEPTOR  $\beta$ 1-ADRENÉRGICO NA MODULAÇÃO  
DA HIPERTROFIA CARDÍACA INDUZIDA PELO HORMÔNIO  
TIREOIDIANO**

**ANDERSON LUIZ BEZERRA DA SILVEIRA**

2014



Departamento de  
Ciências  
Fisiológicas



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM**  
**CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**PAPEL DO RECEPTOR  $\beta$ 1-ADRENÉRGICO NA MODULAÇÃO**  
**DA HIPERTROFIA CARDÍACA INDUZIDA PELO HORMÔNIO**  
**TIREOIDIANO**

**ANDERSON LUIZ BEZERRA DA SILVEIRA**

*Sob a orientação do professor*

**Emerson Lopes Olivares**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Fisiológicas**, no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de concentração em Fisiologia.

Seropédica

Setembro de 2014

616.1  
S587p  
T

Silveira, Anderson Luiz Bezerra da, 1979-  
Papel do receptor  $\beta$ 1-adrenérgico na  
modulação da hipertrofia cardíaca induzida  
pelo hormônio tireoidiano / Anderson Luiz  
Bezerra da Silveira. - 2014.

120 f.: il.

Orientador: Emerson Lopes Olivares.

Tese (doutorado) - Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-  
Graduação em Ciências Fisiológicas, 2014.

Bibliografia: f. 85-106

1. Coração - Hipertrofia - Teses. 2.  
Beta adrenérgicos - Teses. 3. Hormônios  
tireoidianos - Teses. 4. Rato como animal  
de laboratório - Teses. I. Olivares,  
Emerson Lopes, 1973- II. Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de  
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.  
III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**FISIOLÓGICAS**

**ANDERSON LUIZ BEZERRA DA SILVEIRA**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de concentração em Fisiologia

TESE APROVADA EM 25 / 09 / 2014.



---

Emerson Lopes Olivares. Dr. UFRRJ  
(Orientador)



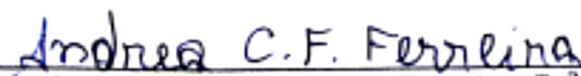
---

Patrícia Cristina dos Santos. Dr.<sup>a</sup>. UNIRIO



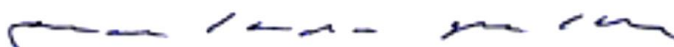
---

Norma Aparecida dos Santos Almeida. Dr.<sup>a</sup>. UFRRJ



---

Andrea Claudia Freitas Ferreira. Dr.<sup>a</sup>. UFRJ



---

Luciane Claudia Barcelos. Dr.<sup>a</sup>. UFRJ

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao professor Pancrácio de Almeida Esmeraldo que foi o primeiro a vislumbrar esse momento 15 anos atrás.

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente eu gostaria de agradecer a toda minha família (pai, mãe, irmãos e esposa) por ter me dado suporte pra que eu chegasse até aqui.

Queria agradecer de todo o meu coração aos amigos e professores Dr. José Henrique e Dr. Paulo Scherer, que mesmo sem me conhecerem me oportunizaram conhecer o departamento de ciências fisiológicas e, por conseguinte, o Programa Multicêntrico de pós-graduação em Ciências Fisiológicas.

Aos amigos de todas as horas do DCF por me ajudarem em todos os momentos acadêmicos, viagens, confraternizações, alegrias e também por terem dividido algumas frustrações comigo. Não posso deixar de citar alguns nomes como: Roberto Laureano, Fabricia Fonseca, Danilo Borges, Iracema Araújo, Claudio Almeida, Rafael Sonoda, Guiniver, George, André Mecawi.

A todos os amigos que fiz na UFRJ, em especial, a grande parceira Isalira que foi uma pessoa sensacional e incansável em ajudar com o ecocardiograma. Além de todos os amigos do laboratório de farmacologia e fisiologia cardiovascular. Também, não posso esquecer-me do professor José Antunes Rodrigues, Elisa, Claudia e todos os amigos da USP-FMRP.

Sou eternamente grato a todos os professores do DCF por me transformar, ensinar e ampliar meus horizontes. Especialmente, gostaria de citar alguns professores que foram muito importantes nessa minha caminhada: Dr. Wellington Cortes, Dr. Fabio Fagundes, Dra. Michelle Marassi, Dr. Frederico Argollo, Alba Cenélia, Luciano Fernandes.

Gostaria de destacar ainda, que não só a minha pessoa, mas todos os alunos do programa de pós-graduação do DCF são e serão eternamente gratos ao Prof. Dr. Luis Carlos Reis, pois se não fosse esse visionário científico, possivelmente, não teríamos o nosso programa em ciência fisiológica. Além disso, a minha caminhada não teria sido tão rica sem a amizade e sapiência do “mestre Luis”.

Sou muito grato também todos os meus alunos do Laboratório de Fisiologia e Desempenho Humano. Raoni, Cesar, Wallace, Welington, Iggor, Karolyne, Josias, Luis Fernando, Andressa, Raquel, Diego, Renata. Cada um

de vocês, mesmo sem saber, sempre foi um grande estímulo pra mim nessa caminhada.

De modo geral gostaria de agradecer a vida por me oportunizar conhecer tantas pessoas novas durante esse tempo de pós-graduação e me tornar um professor e cientista melhor.

Finalmente, não poderia deixar de agradecer ao meu orientador Emerson Lopes Olivares pelo apoio e confiança, que mesmo sem me conhecer encarou o desafio de orientar um desconhecido da educação física. Muito obrigado pela compreensão e pelas oportunidades que você me concedeu. E não posso esquecer a sua própria frase “você foi um pai pra mim”.

## RESUMO

Silveira, Anderson Luiz Bezerra. **Papel do receptor  $\beta$ 1-adrenérgico na modulação da hipertrofia cardíaca induzida pelo hormônio tireoidiano.** 2014. 107 p. Tese (doutorado em Ciências Fisiológicas). Instituto de Biologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

A função do receptor  $\beta$ -adrenérgico na mediação da hipertrofia cardíaca no hipertireoidismo não é bem descrito na literatura e uma abordagem mais ampla faz-se necessária. Os objetivos deste estudo foram divididos em duas etapas, onde a primeira teve como propósito caracterizar o modelo de hipertrofia por  $T_3$ . Já a segunda etapa procurou avaliar o papel do receptor  $\beta$ -1 adrenérgico na modulação da sinalização celular envolvida na hipertrofia cardíaca. A metodologia na primeira etapa caracterizou-se pela administração de  $T_3$  (*i.p.*) em camundongos machos durante 12 dias e ao final foram realizadas análises eletrocardiográficas e de variabilidade da frequência cardíaca. Na segunda etapa animais selvagens (WT) e com deleção para o receptor  $\beta$ 1-adrenérgico ( $\beta$ 1KO) foram submetidos ao protocolo de hipertireoidismo por  $T_3$  (*s.c.*) durante 10 dias. Posteriormente, os animais foram submetidos ao exame de ecocardiografia e estudo *post mortem*. Na primeira fase o protocolo utilizado elevou significativamente os níveis séricos de  $T_3$ , além de aumentar a Ang I, Ang II e reduziu o ANP no coração, confirmando a eficiência do modelo. A análise de variabilidade da frequência cardíaca demonstrou aumento da modulação simpática, nos animais tratados com  $T_3$  ( $p < 0,05$ ). Durante a segunda etapa, os animais WT tratados desenvolveram hipertrofia cardíaca fisiológica, enquanto os animais  $\beta$ 1KO desenvolveram hipertrofia patológica de acordo com a análise ecocardiográfica. O ANP plasmático e cardíaco demonstrou alteração em seu conteúdo de maneira dependente do receptor  $\beta$ 1-adrenérgico nos grupos tratados com  $T_3$  ( $p < 0,05$ ). Não foi encontrada nenhuma alteração no conteúdo de Ang I e Ang II plasmática ou cardíaca entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Ao observar as proteínas envolvidas na sinalização celular foi observado que os animais  $\beta$ 1KO apresentaram menor ativação de PKA quando comparada com os animais WT ( $p < 0,05$ ). Os animais  $\beta$ 1KO tratados com  $T_3$  apresentaram a maior ativação da ERK1/2 quando comparado a todos os grupos. Em relação à ativação da via Akt e fosforilação da proteína 4E-BP1 não foi identificada nenhuma diferença entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Por outro lado, a ativação da p38 foi significativamente maior nos animais WT tratados com a  $T_3$  quando comparados aos seus controles e também aos animais  $\beta$ 1KO tratados ( $p < 0,05$ ). Conclui-se que o protocolo de administração de  $T_3$  utilizado é eficiente em simular hipertireoidismo e que os receptores  $\beta$ 1-adrenérgicos exercem papel crucial na modulação da hipertrofia cardíaca fisiológica por mediar a inibição da sinalização da ERK1/2 no coração, através da ativação da p38.



## ABSTRACT

Silveira, Anderson Luiz Bezerra. **Role of  $\beta$ 1-adrenergic receptor modulation on thyroid-induced myocardial hypertrophy.** 2014. 107 p. Tese (doutorado em Ciências Fisiológicas). Instituto de Biologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

The role of  $\beta$ -adrenergic receptor mediating cardiac hypertrophy in hyperthyroidism is not described in the literature and a better comprehensive approach is needed. The purposes of this study were divided into two stages, which the first one aimed to characterize the pattern of hypertrophy induced by T3. The second stage aimed to assess the  $\beta$ 1-adrenergic receptor role in cellular signaling modulation involved in cardiac hypertrophy. The methodology of the first stage was characterized by the T3 administration (i.p.) in male mice for 12 days (n=40), after that the electrocardiographic and heart rate variability analyzes were performed. In the second step wild (WT; n=16) and  $\beta$ 1-adrenergic receptor knockout animals ( $\beta$ 1KO; n=13) were subjected to a hyperthyroidism protocol (s.c.) for 10 days. Subsequently, the animals underwent echocardiography analysis and post mortem study. The institutional research ethics committee approved this study (protocol # 207/2012). In the first step the protocol significantly increase serum T3 levels and increase Ang I, Ang II and decrease ANP in the heart, confirming the efficiency of the model. The analysis of heart rate variability showed increased sympathetic modulation in animals treated with T3 ( $p < 0.05$ ). During the second stage, the WT treated developed physiological cardiac hypertrophy, while  $\beta$ 1KO developed pathological hypertrophy according to echocardiographic analysis. Plasma and heart ANP levels were dependent to  $\beta$ 1-adrenergic receptor ( $p < 0.05$ ). No change was found for plasma and heart levels of Ang I and Ang II between groups ( $p > 0.05$ ). Targeting the proteins involved in cellular signaling, the  $\beta$ 1KO showed less PKA activation in comparison with WT ( $p < 0.05$ ). The  $\beta$ 1KO group treated with T3 showed greater activation of ERK1/2 when compared to other groups. There was not identified difference between groups for Akt activation and 4E-BP1 phosphorylated protein ( $p > 0.05$ ). Furthermore, activation of p38 was significantly higher in WT treated when compared to their controls or  $\beta$ 1KO treated with T3 ( $p < 0.05$ ). We conclude that T3 protocol is efficient to induce hyperthyroidism, and the  $\beta$ 1-adrenergic receptors play a crucial role in modulating physiological cardiac hypertrophy by inhibiting ERK1/2 signaling in the heart, through p38 activation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática da célula folicular mostrando os aspectos chave do transporte de iodeto e da síntese de hormônio tireoidiano .....	5
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática do sistema renina-angiotensina (SRA) ...	8
<b>Figura 3:</b> Representação do sistema renina-angiotensina cardíaco .....	9
<b>Figura 4:</b> Ciclo de ativação e desativação da proteína G <sub>s</sub> .....	11
<b>Figura 5:</b> Dessensibilização do receptor β-adrenérgico .....	11
<b>Figura 6:</b> Esquema da transdução de sinal ativado por receptor β-adrenérgico ..	12
<b>Figura 7:</b> Geometria cardíaca relacionada à hipertrofia fisiológica ou patológica .	17
<b>Figura 8:</b> Manutenção ideal da integração (crosstalk contra-regulatório) entre as vias de sinalização celular no cardiomiócito, durante uma condição normal .....	18
<b>Figura 9:</b> Desregulação da integração (crosstalk contra-regulatório) entre as vias de sinalização celular no cardiomiócito, durante estímulo patológico .....	22
<b>Figura 10:</b> Interação entre as diferentes vias de sinalização celular associada à hipertrofia cardíaca fisiológica .....	26
<b>Figura 11:</b> Ligação ao TRβ/α T <sub>3</sub> inibindo AP-1, resultando em <i>downregulation</i> de MMP1 .....	28
<b>Figura 12:</b> Ações genômicas e não genômicas relacionadas aos receptores de hormônio tireoidiano e hipertrofia cardíaca .....	29
<b>Figura 13:</b> Representação do protocolo experimental utilizado na primeira etapa de caracterização do modelo de hipertrofia induzida pelo T <sub>3</sub> .....	36
<b>Figura 14:</b> Representação do protocolo experimental utilizado na etapa de caracterização da participação do β1-AR modelo de hipertrofia induzida pelo T <sub>3</sub> .	37
<b>Figura 15:</b> Imagem representativa do equipamento de ecocardiograma para camundongos utilizado no presente estudo .....	40
<b>Figura 16:</b> Concentração sérica de T3 total (ng/dl) no grupo de camundongos tratados com T <sub>3</sub> (T3, n=20) ou veículo (CTR, n=20) .....	47
<b>Figura 17:</b> Peso corporal do grupo tratado com T <sub>3</sub> (T3, n=20) ou veículo (CTR, n=20) .....	48
<b>Figura 18:</b> Peso relativo do coração (normalizado pelo comprimento da tibia) no grupo de camundongos tratados com T <sub>3</sub> (T3, n=20) ou veículo (CTR, n=20) .....	48
<b>Figura 19:</b> Diâmetro dos cardiomiócitos (pixels) do grupo de animais tratados com o seu respectivo controle, durante 12 dias de tratamento com T <sub>3</sub> (T3, n=20) ou salina (CTR, n=20) .....	49
<b>Figura 20:</b> Fotos de cortes histológicos de músculo cardíaco obtido do ventrículo esquerdo do grupo controle (esquerda) e tratado com T <sub>3</sub> (direita) .....	49
<b>Figura 21:</b> Mensuração da frequência cardíaca no grupo tratados com T <sub>3</sub> (T3, n=20) ou veículo (CTR, n=20) .....	50

<b>Figura 22:</b> Análise da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo através da raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre R-R sucessivos (RMSSD) nos animais tratados com T <sub>3</sub> (T3, n=20) ou veículo (CTR, n=20) .....	51
<b>Figura 23:</b> Análise espectral da VFC no domínio da frequência, por meio do componente oscilatório LF nos animais tratados (T3, n=20) ou veículo (CTR, n=20) .....	52
<b>Figura 24:</b> Análise espectral da VFC na faixa de alta frequência em camundongos tratados com T <sub>3</sub> (T3, n=20) ou veículo (CTR, n=20) .....	52
<b>Figura 25:</b> Relação dos espectros de baixa e alta frequência no grupo de camundongos tratados com T <sub>3</sub> (T3, n=20) ou veículo (CTR, n=20) .....	53
<b>Figura 26:</b> Análise de angiotensina cardíaca no grupo tratado com T <sub>3</sub> (T3, n=20) comparado ao controle (CTR, n=20) .....	54
<b>Figura 27:</b> Conteúdo do ANP cardíaco no grupo tratado com T <sub>3</sub> (T3, n=20) comparado ao controle (CTR, n=20) .....	54
<b>Figura 28:</b> Nível de substrato fosforilado de PKA em animais <i>knockout</i> para $\beta$ 1-AR e os seus controles selvagens (WT) .....	55
<b>Figura 29:</b> Análise ecocardiográfica de diferentes parâmetros morfológicos em animais selvagens e $\beta$ 1- <i>knockout</i> .....	57
<b>Figura 30:</b> Imagens ecocardiográficas no Modo-M representativas dos grupos WT <sub>sal</sub> (A), WT <sub>T3</sub> (B), $\beta$ 1KO <sub>sal</sub> (C) e $\beta$ 1KO <sub>T3</sub> (D) .....	58
<b>Figura 31:</b> Função sistólica avaliada pela fração de ejeção do ventrículo esquerdo (VE) após o tratamento com hormônio tireoidiano ou veículo em animais com ausência do $\beta$ 1-AR ( $\beta$ 1KO) e em animais do grupo controle (WT) ..	59
<b>Figura 32:</b> Avaliação da hipertrofia cardíaca através do diâmetro dos cardiomiócitos relacionadas à participação do $\beta$ 1-AR e tratamento com T <sub>3</sub> .....	60
<b>Figura 33:</b> Experimento de radioimunoensaios para ANP. Níveis plasmáticos e cardíacos de ANP em resposta ao tratamento com T <sub>3</sub> e modulação do $\beta$ 1-AR ....	62
<b>Figura 34:</b> Experimento de radioimunoensaios para Ang I e II.....	63
<b>Figura 35:</b> Ativação da via ECA marcada pela sua fosforilação em animais selvagens (WT) e <i>knockout</i> ( $\beta$ 1KO) .....	65
<b>Figura 36:</b> Ativação da via marcada pela ERK fosforilada (p-ERK) em animais selvagens (WT) e <i>knockout</i> ( $\beta$ 1KO) .....	65
<b>Figura 37:</b> Nível de substrato de PKA fosforilado em resposta ao tratamento com T3 em animais selvagens (WT) e <i>knockout</i> para $\beta$ 1-AR ( $\beta$ 1KO) .....	66
<b>Figura 38:</b> Nível de AKT fosforilada (p-AKT) no resíduo serina em resposta ao tratamento com T3 em animais selvagens (WT) e <i>knockout</i> para $\beta$ 1-AR ( $\beta$ 1KO) .	66
<b>Figura 39:</b> Ativação da via marcada pelos substratos fosforilados de 4E-BP1 (p-4EBP1) em animais selvagens (WT) e <i>knockout</i> ( $\beta$ 1KO) .....	67

<b>Figura 40:</b> Ativação da via marcada pelos substratos fosforilados da p38 (p-P38) em animais selvagens (WT) e knockout ( $\beta$ 1KO) .....	68
<b>Figura 41:</b> Variação dos níveis fosforilados de p38 entre os grupos .....	68

## LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

4E-BP1 – proteína de ligação 4E  
AC – adenilato ciclase  
AMPA – aminopeptidase A  
AMPC – monofosfato cíclico de adenosina  
AMPM – aminopeptidase M  
Ang 1-7 – angiotensina 1-7  
Ang I – angiotensina I  
Ang II – angiotensina II  
ANOVA – análise de variância  
AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub>, AT<sub>4</sub> – receptores para angiotensina  
BNP – peptídeo natriurético tipo B  
CAMK – calmodulina quinase  
CTR – controle  
D<sub>1</sub> – desidase do tipo 1  
D<sub>2</sub> – desidase do tipo 2  
D<sub>3</sub> – desidase do tipo 3  
DDFVE<sub>d</sub> – diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo em diástole  
DEHAL<sub>1</sub> – iodotirosina desalgenase do tipo I  
DIT – diiodotirosina  
DUOX<sub>1</sub> – dual-oxidase do tipo 1  
DUOX<sub>2</sub> – dual-oxidase do tipo 2  
ECA – enzima conversora da angiotensina  
ECA<sub>2</sub> – enzima conversora da angiotensina isoforma 2  
ECG – eletrocardiograma  
Eco – ecocardiograma  
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético  
eIF4E – fator eucariótico de iniciação 4E  
eIF4G – fator de iniciação 4G  
EPM – erro padrão da média  
ERK1/2 – quinase regulada por sinal extracelular 1/2  
ERSIV<sub>d</sub> – espessura relativa do septo interventricular em diástole  
ET-1 – endotelina-1

FC – frequência cardíaca  
GDP – guanina difosfato  
GPCR – receptor acoplados à proteína G  
GRK – quinase de receptor acoplado a proteína G  
GSK3 – glicogênio sintase quinase  
GTP – guanina trifosfato  
GTPase – guanina trifosfatase  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio  
HF – componente oscilatório de alta frequência  
HT – hormônio tireoidiano  
IGF-1 – fator insulínico de crescimento do tipo 1  
IRAP – aminopeptidase regulada pela insulina  
JNK – quinase c-jun N-terminal  
KO – *knockout*  
LF – componente oscilatório de baixa frequência  
MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno  
Mas – receptor para angiotensina 1-7  
MEK – Proteína quinase ativadora de mitógeno  
miRNA – micro RNA  
MIT – moniodotirosina  
mTOR – Alvo da rapamicina em mamíferos  
Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase – bomba de sódio e potássio  
NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato  
NEP – endopeptidase neutra  
NFAT – fator nuclear ativador de células T  
NIS – cotransportador sódio-iodeto  
PC – peso corporal  
PDS – pendrina  
PKB/Akt – proteína quinase B  
PKC – proteína quinase C  
PMSF – fluoreto de fenilmetil sufonil  
PP2A – proteína fosfatase 2A  
RMSSD – raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre R-R sucessivos

rT<sub>3</sub> – triiodotironina reverso  
RyR<sub>2</sub> – receptor de rianodina tipo 2  
S6K – quinase S6  
SDS – dodecil sulfato de sódio  
SERCA<sub>2</sub> – bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático  
SRA – sistema renina-angiotensina  
SRAA – sistema renina-angiotensina aldosterona  
T<sub>2</sub> – diiodotironina  
T<sub>3</sub> – triiodotironina  
T<sub>4</sub> – tiroxina  
TBG – globulina ligadora a tiroxina  
TFA – ácido trifluoracético  
Tg – tireoglobulina  
TGF – fator de transformação do crescimento  
TKR – receptor de tirosina quinase  
TPO – tireoperoxidase  
TR – receptor para hormônio tireoidiano  
TRH – hormônio liberador de tireotrofina  
TSH – hormônio tireostimulante  
VE – ventrículo esquerdo  
VFC – variabilidade da frequência cardíaca  
WT – selvagem  
α-MHC – miosina de cadeia pesada α  
β1-AR – receptor β1-adrenérgico  
β1-KO – *knockout* para o receptor β1-adrenérgico  
β-ARK1/ GRK2 – quinase de receptor β-adrenérgico 1  
β-MHC – miosina de cadeia pesada β

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1 Fisiologia da glândula tireoide .....	3
2.2 Sistema renina-angiotensina .....	6
2.3 Receptor $\beta$ -adrenérgico ( $\beta$ -AR) .....	9
2.4 Hipertrofia cardíaca .....	13
2.4.1 <i>Vias de sinalização na hipertrofia patológica</i> .....	18
2.4.1.1 <i>ERK</i> .....	19
2.4.1.2 <i>p38</i> .....	20
2.4.2 <i>Vias de sinalização na hipertrofia fisiológica</i> .....	22
2.4.2.1 <i>Akt</i> .....	23
2.4.2.2 <i>GSK3</i> .....	24
2.4.2.3 <i>S6Ks</i> .....	24
2.4.2.4 <i>4E-BP1 e sua regulação pelo HT</i> .....	25
2.5 Hipertrofia cardíaca induzida pelo hormônio tireoídiano .....	26
2.6 Knockout para receptores adrenérgicos $\beta$ 1 .....	31
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	32
3.1 Objetivos Gerais .....	32
3.2 Objetivos Específicos .....	32
<b>4. JUSTIFICATIVA</b> .....	33
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	34
5.1 Animais .....	34
5.1.1 <i>Primeira Fase: Caracterização da hipertrofia induzida por T<sub>3</sub></i> .....	34
5.1.2 <i>Segunda Fase: Caracterização do <math>\beta</math>1-AR na hipertrofia cardíaca</i> ....	34
5.2 Protocolo Experimental .....	35
5.2.1 <i>Protocolo experimental da primeira etapa</i> .....	35
5.2.2 <i>Protocolo experimental segunda etapa</i> .....	36
5.3 ECG - Estudo do balanço simpato-vagal cardíaco por meio das análises da variabilidade da frequência cardíaca e espectral .....	37
5.4 Avaliação da função cardíaca por ecocardiograma .....	38
5.5 Análises Hormonais .....	39
5.5.1 <i>Preparação para as análises hormonais sanguíneas</i> .....	39
5.5.2 <i>Extração dos Hormônios ANG I, ANGII e ANP</i> .....	39
5.5.3 <i>Eficiência da Extração dos Hormônios</i> .....	40
5.5.4 <i>Radioimunoensaio</i> .....	40
5.6 Avaliação indireta da hipertrofia cardíaca .....	41
5.7 Análise Histopatológica .....	41
5.8 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na Presença de SDS (SDS-PAGE) .....	43
5.9 Western Blot .....	44
5.9.1 Controles de Carregamento em Western Blot .....	45
<b>6. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	46
<b>7. RESULTADOS</b> .....	47
7.1 Primeira etapa: Caracterização do modelo de hipertrofia cardíaca induzida por T <sub>3</sub> .....	47



7.2 Segunda etapa: Caracterização da participação do receptor $\beta$ 1-adrenérgico na hipertrofia cardíaca induzida por T <sub>3</sub> .....	54
7.2.1 Caracterização da via molecular PKA nos animais $\beta$ 1-AR knockout .....	55
7.2.2 Estudo ecocardiográfico .....	56
7.2.3 Estudo da morfometria dos cardiomiócitos .....	59
7.2.4 Estudo da massa corporal e dos órgãos .....	60
7.2.5 Estudo do peptídeo natriurético atrial (ANP) plasmático e cardíaco .....	61
7.2.6 Estudo do sistema renina angiotensina (SRA) plasmático e cardíaco.....	62
7.2.8 Resposta da ECA relativa aos grupos experimentais .....	63
7.2.9 Resposta das vias sinalização celular associadas a hipertrofia cardíaca .....	64
7.2.9.1 ERK .....	64
7.2.9.2 PKA .....	65
7.2.9.3 AKT e 4E-BP1 .....	66
7.2.9.4 p38 .....	67
<b>8. DISCUSSÃO</b> .....	70
<b>9. CONCLUSÕES</b> .....	84
<b>10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	85
<b>ANEXO</b> .....	107

## 1. INTRODUÇÃO

Os hormônios tireoidianos desempenham funções fisiológicas importantes em diversos tecidos, uma delas é a hipertrofia cardíaca, caracterizada pelo aumento da área de seção transversal dos cardiomiócitos. Entretanto, em situações em que o indivíduo apresente um quadro de excesso de hormônio tireoidiano (hipertireoidismo) essa hipertrofia poderia se caracterizar como uma condição patológica, já que algumas evidências demonstram ações genômica e não-genômica no coração. No entanto, o conhecimento a respeito desse efeito ainda é controverso na literatura científica e necessita de mais investigação.

Além disso, deve ser destacado que a hipertrofia cardíaca induzida pela tireotoxicose é cercada por uma série de respostas regulatórias desencadeadas por outros sistemas fisiológicos que desempenham papéis importantes, tais como o sistema renina-angiotensina, em especial o cardíaco, que atualmente, tem sido um dos principais mecanismos descritos para explicar a hipertrofia cardíaca no modelo de hipertiroxinemia. Alguns estudos direcionam suas explicações para a elevação dos níveis de Angiotensina II mediante os eventos estressores, causando a intensa estimulação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos.

No entanto, existe uma grande controversa sobre a participação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, com especial atenção para o  $\beta$ 1-AR, na mediação da hipertrofia cardíaca induzida pelo hormônio tireoidiano, e essas divergências são ainda maiores quando se refere as vias de sinalização celular envolvidas nesse modelo de hipertrofia. Portanto, para ajudar esclarecer essa controversa, utilizamos como modelo experimental em nosso trabalho, camundongos com deleção dos  $\beta$ 1-ARs, também conhecidos como *knockout*, com o intuito de aprofundar o estudo a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos na hipertrofia cardíaca, pois acreditamos que essas respostas seriam de extrema relevância para o maior conhecimento da fisiologia e do ponto de vista translacional, esses dados contribuem sobremaneira para a clínica médica, uma vez que o antagonismo dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos é a uma das bases farmacológicas mais importantes no tratamento atual da tiroxinemia.

Então, com base em dados não publicados do nosso laboratório (Olivares *et al.*, 2010) que mostraram que a hipertrofia cardíaca induzida pelo hormônio tireoidiano, neste caso tiroxina, na dose de 600µg/kg *i.p.* em ratos Wistar, foi dependente do receptor AT<sub>1</sub> (testado por meio da administração de 10mg/kg de losartan, bloqueador AT<sub>1</sub>) e independente da inervação simpática, (testado por meio da denervação farmacológica induzida por guanetidina na dose de 50 mg/kg *i.p.* montou-se um protocolo de hipertrofia cardíaca induzida pelo T<sub>3</sub> em camundongos descrito no presente estudo.

Dessa forma, buscamos estudar nesse trabalho a participação dos β1-ARs na ativação das vias moleculares de sinalização da hipertrofia cardíaca induzida pelo hormônio tireoidiano em camundongos *knockouts* para o β1-AR e em camundongos selvagens (controles).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Fisiologia da glândula tireoide

A síntese e secreção dos hormônios tireoidianos (HTs) são reguladas por um sistema de retroalimentação negativo que envolve hipotálamo, hipófise e glândula tireoide; também descrito como eixo HPT. O hormônio liberador de tireotrofina (TRH) é sintetizado no núcleo paraventricular do hipotálamo e transportado por axônios em direção a eminência mediana e, posteriormente, para a hipófise anterior através do plexo capilar portal. O TRH se liga aos receptores na hipófise, onde uma subpopulação de células da hipófise secreta hormônio tireoestimulante (TSH). A estimulação pelo TRH leva à liberação e síntese *de novo* do TSH nos tireotrofos. Um detalhe importante é que as secreções de TRH e TSH são reguladas negativamente pelo HT, e o principal mecanismo para essa regulação negativa de TSH parece ser a conversão intra-hipofisária de  $T_4$  em  $T_3$  pela desidase do tipo II ( $D_2$ ) (Shupnik, Ridgway e Chin, 1989; Mullur, Liu e Brent, 2014).

O TSH é uma glicoproteína composta de subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  e é classificado como o principal regulador da liberação e secreção de HT. Além disso, somatostatina e dopamina no hipotálamo, também podem regular negativamente a secreção de TSH. Ademais, esse hormônio desempenha uma função fundamental no crescimento e desenvolvimento da glândula tireoide. O TSH liga-se ao seu receptor TSHr que está acoplado a proteína  $G_s$  que leva ao aumento do AMPc intracelular e a estimulação das vias mediadas por proteína quinase A (PKA). O TSH é capaz de estimular o cotransportador para sódio e iodeto (NIS), a Tg (Soriano *et al.*) e a tireoperoxidase (TPO) para promover a síntese de HT (Parmentier *et al.*, 1989; Kohn *et al.*, 1995).

A partir de então, a biossíntese do HT pela glândula tireoide se inicia pela captação de iodeto ( $I^-$ ) da circulação por meio de transporte ativo, realizado pela NIS. Esse processo é dependente da presença de um gradiente de sódio através da membrana basal da célula tireoidiana, determinado pela  $Na^+/K^+$ -ATPase, uma vez que o transporte de dois íons  $Na^+$  para o interior da célula resulta na entrada de um  $I^-$  contra seu gradiente eletroquímico. A pendrina (PDS), glicoproteína presente na membrana apical, é a responsável pela entrada de  $I^-$  no coloide. O  $I^-$  também pode ser gerado por ação da enzima

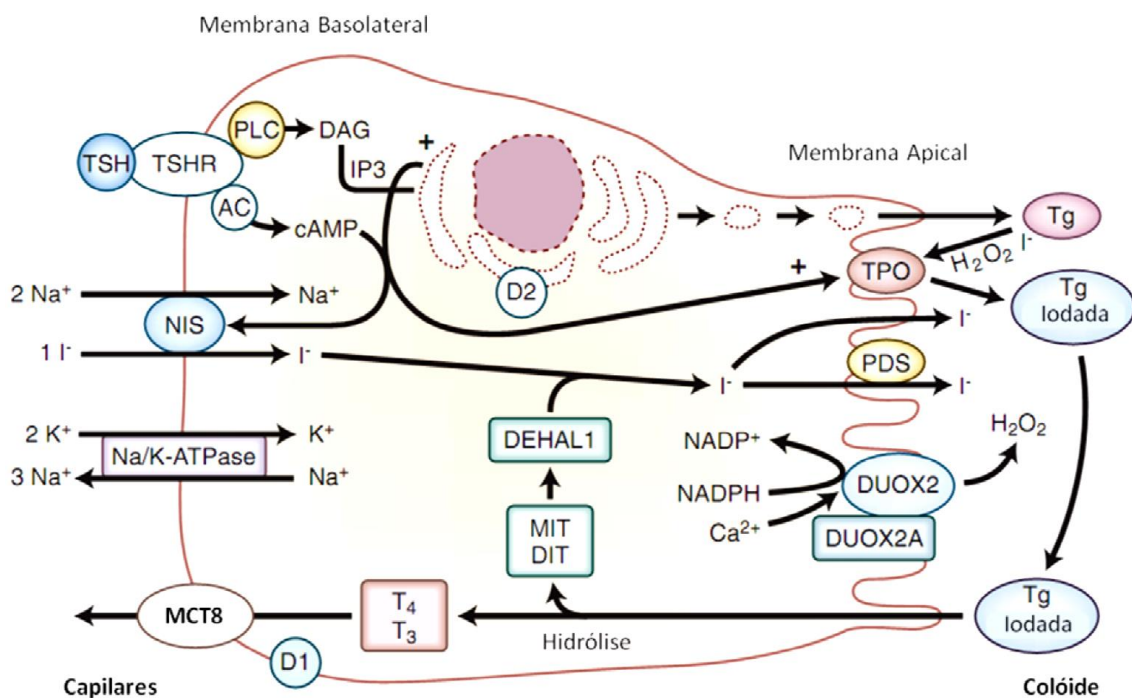
iodotirosina desalgenase do tipo I (DEHAL<sub>1</sub>), proteína de membrana, concentrada na superfície apical da célula, que catalisa a desiodação de monoiodotirosina (MIT) e diiodotirosina (Crackower *et al.*, 2002), dependente da redução de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (Larsen, Davies e Hay, 1998; Yen, 2001).

Após sua captação, ocorre a organificação do I<sup>-</sup> e oxidação pela TPO na presença de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), onde estes são gerados pelas enzimas dependentes de cálcio (Ca<sup>++</sup>) dual-oxidase dos tipos 1 e 2 (DUOX<sub>1</sub> e DUOX<sub>2</sub>); e incorporado aos resíduos de tirosina da Tg, formando as iodotirosinas inativas: MIT e DIT. A TPO catalisa o acoplamento de dois resíduos de DIT ou um de DIT e um de MIT, levando à formação de tiroxina (T<sub>4</sub>) e triiodotironina (T<sub>3</sub>), respectivamente, que são armazenadas no interior do coloide (Smanik *et al.*, 1996; Yen, 2001). A secreção de HT requer a endocitose da Tg iodada armazenada a partir da superfície apical das células foliculares da tireoide. Então, a Tg internalizada é incorporada pelos fagolisossomos sofre proteólise e libera MIT e DIT que são rapidamente desiodados possibilitando a reutilização do iodeto, e por fim, a liberação de T<sub>4</sub> e T<sub>3</sub> na circulação através da superfície basal (Figura 1).

A maioria dos HTs são liberados na forma de T<sub>4</sub>, onde sua concentração (90 nM) é cerca de 40 vezes maior do que T<sub>3</sub> (2 nM) (Yen, 2001). Apenas 0,03% do total do soro é de T<sub>4</sub> livre (não ligada), com o restante ligado a proteínas transportadoras tais como globulina ligada a tiroxina (TBG), albumina, e pré-albumina ligada a tireoide. Aproximadamente 0,3% do total de T<sub>3</sub> sérico encontra-se livre e o restante ligado a TBG e albumina. É o HT livre que penetra nas células alvo e gera a resposta biológica (Yen, 2001).

A principal via para produção do hormônio biologicamente ativo é a conversão do T<sub>4</sub> em T<sub>3</sub> via desiodação do anel fenólico da iodotironina, através da ação das selenoenzimas denominadas iodotironinas desiodases, fenômeno que pode ocorrer ainda dentro da própria glândula tireoide (Larsen, Davies e Hay, 1998). As enzimas desiodases são classificadas como tipos I (D<sub>1</sub>), II (D<sub>2</sub>) e III (D<sub>3</sub>), e apesar de apresentarem características estruturais semelhantes elas apresentam muitas distinções quanto ao seu local de expressão e função (Braverman, Ingbar e Sterling, 1970; Kohrle, 2000). A D<sub>1</sub> está localizada na membrana plasmática e é expressa principalmente no fígado e rins, onde

catalisa a conversão de  $T_4$  em  $T_3$  ou em  $T_3$  reverso ( $rT_3$ ). Apesar de alguns estudos sugerirem que a  $D_1$  contribui para cerca de 50% do  $T_3$  sérico em ratos, evidências apontam para uma propriedade cineticamente ineficiente da  $D_1$  comparada à  $D_2$ , devido à sua capacidade tanto de ativar quanto de desativar o  $T_4$  (Bianco e Kim, 2006). A  $D_2$  está localizada no retículo endoplasmático e converte  $T_4$  em  $T_3$  na adenohipófise, no sistema nervoso central, placenta, tireoide, músculo esquelético, coração e no tecido adiposo marrom (Matsuda *et al.*, 2008), sendo considerada importante tanto para a produção local quanto fonte de  $T_3$  plasmática em humanos e animais. Já a  $D_3$  é expressa na membrana plasmática assim como  $D_1$ , está presente na placenta, sistema nervoso central e no feto, onde inativa  $T_4$  e  $T_3$  por meio de sua conversão em  $rT_3$  e diiodotironina ( $T_2$ ), respectivamente (Meyer, Wagner e Maia, 2007).



**Figura 1:** Representação esquemática da célula folicular mostrando os aspectos chave do transporte de iodeto e da síntese de hormônio tireoidiano. AC: Adenilato ciclase; ATPase: adenosina trifosfatase; cAMP: adenosina monofosfato cíclica;  $D_1$ : desiodase tipo 1 tireoidiana;  $D_2$ : desiodase tipo 2 tireoidiana; DAG: diacilglicerol; DEHAL<sub>1</sub>: iodotirosina desalogenase 1; DIT: diiodotirosina; MIT: monoiodotirosina; DUOX: dual oxidase; IP3: inositol trifosfato; NADP+: forma oxidada da nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato; NADPH: nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato reduzida; NIS: co-transportador sódio-iodeto; PDS: pendrina (SLC26A4); PLC: fosfolipase C;  $T_3$ : triiodotironina;  $T_4$ : tiroxina; Tg: tiroglobulina; TPO: tireoperoxidase; TSHR: receptor de tirotropina; MCT8: transportador de monocarboxilato 8. Adaptado de Melmed *et al.* (2011).

De maneira geral, as desidases são responsáveis pela regulação da disponibilidade intracelular dos HTs, uma vez que elas podem ativar ( $D_1$  e  $D_2$ ) ou inativá-lo ( $D_1$  e  $D_3$ ), dependendo de sua expressão e atividade nos diferentes tecidos. Além disso, elas complementam a regulação das concentrações séricas dos HTs, dependendo do tecido e da espécie em questão, embora nos ratos, a tireoide seja o principal local de desidase para síntese do  $T_3$  circulante (Chanoine *et al.*, 1993), em seres humanos saudáveis 80% do  $T_3$  circulante é produzido a partir de desidases em tecidos periféricos (Bianco e Kim, 2006).

## 2.2 Sistema Renina-Angiotensina

A renina é uma aspartil-protease produzida pelas células justaglomerulares das arteríolas aferentes dos rins através da clivagem do seu precursor, a pró-renina. Os principais estímulos que possibilitam a secreção de renina são: redução da perfusão sanguínea renal, estimulação da inervação simpática renal e redução dos níveis de sódio que alcançam as células da mácula densa (Fitzsimons, 1998). De uma maneira geral, a renina cliva o angiotensinogênio, uma  $\alpha$ -glicoproteína produzida no fígado, no decapeptídeo angiotensina I (Ang I), que através da ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), converte a Ang I no octopeptídeo angiotensina II (Ang II), que é uma metaloproteinase predominantemente expressa na superfície dos capilares pulmonares (Hall, 2003). Outra forma de promover a conversão de Ang I em Ang II envolve a serina protease quimase (Urata, Nishimura e Ganten, 1996).

A Ang II circulante é considerada o principal efetor do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) frente a desafios homeostáticos como hipotensão e depleção de volume (Paul, Poyan Mehr e Kreutz, 2006). Os efeitos fisiológicos promovidos pela Ang II são desencadeados principalmente por sua ligação a dois receptores acoplados a proteína G, denominados  $AT_1$  e  $AT_2$ . Embora, esses dois receptores apresentem diferenças quanto à estrutura e localização, a Ang II possui afinidade bem semelhante aos dois receptores (Goodfriend, Elliott e Catt, 1996). As principais ações da Ang II derivam de sua ligação ao receptor  $AT_1$ , dentre as quais se destacam: vasoconstrição arterial sistêmica, vasoconstrição arteriolar renal, reabsorção renal de água e sódio e

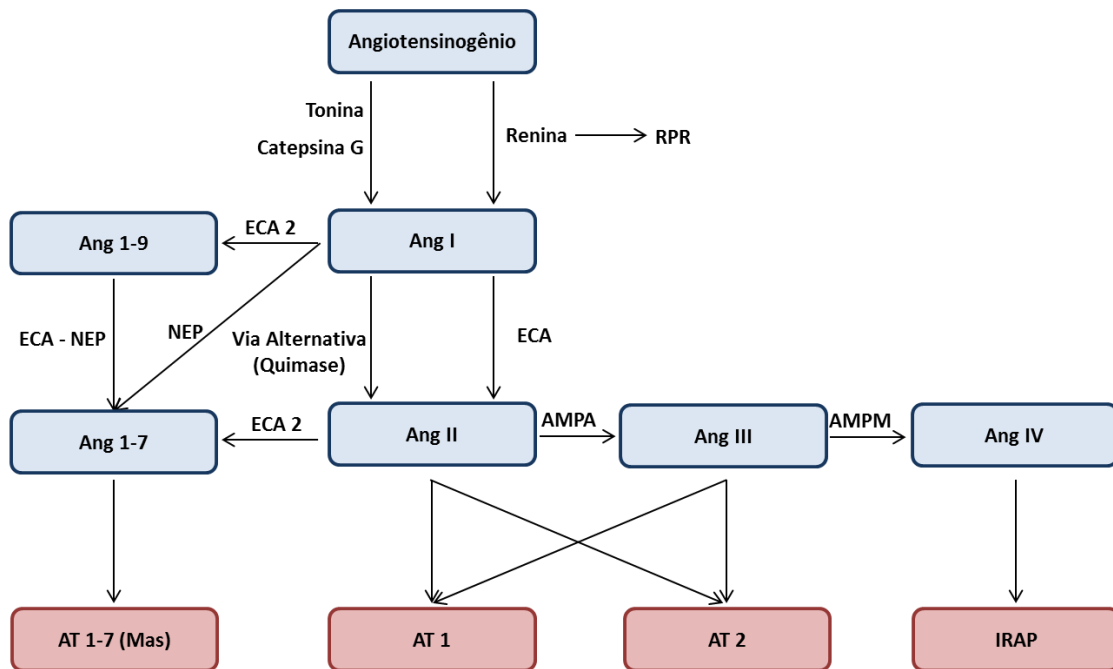
secreção de aldosterona pelas glândulas adrenais (Sayer e Bhat, 2014). As respostas fisiológicas desencadeadas pela ligação aos receptores AT<sub>2</sub> ainda são imprecisas (Unger, 1999). Todavia, sabe-se que esse receptor desempenha importante papel no desenvolvimento fetal e na neutralização dos efeitos biológicos mediados pela ligação da Ang II ao receptor AT<sub>1</sub> tanto *in vitro* (Stoll *et al.*, 1995) quanto *in vivo* (Morishita *et al.*, 1993). Ademais, um novo paradigma de interação desses receptores foi proposto por Abdalla *et al.* (2001). Segundo esse grupo, o receptor AT<sub>2</sub> pode se ligar diretamente ao receptor AT<sub>1</sub>. A formação desse heterodímero inibe a cascata de sinalização do receptor AT<sub>1</sub>, independentemente da ativação do receptor AT<sub>2</sub> (Abdalla *et al.*, 2001).

Existem relatos na literatura de outros receptores que se ligam a diferentes moléculas do SRAA. O receptor AT<sub>4</sub> foi descrito inicialmente como um receptor específico e de alta afinidade pelo hexapeptídeo Ang IV. Esse receptor é encontrado em diferentes tecidos (coração, próstata, cólon, rins, adrenais e diferentes regiões encefálicas) e desempenha funções motoras e sensoriais (Chai *et al.*, 2004). Outro receptor importante envolvido com o SRAA é conhecido como receptor Mas. Essa proteína, assim como o AT<sub>2</sub>, se liga ao receptor AT<sub>1</sub>, formando heterodímeros que inibem a cascata de sinalização da Ang II (Kostenis *et al.*, 2005). É importante ressaltar que a Ang (1-7) e outros derivados da Ang II podem se ligar ao receptor Mas. No entanto, é necessário determinar a relevância dos efeitos biológicos promovidos pela ativação desse receptor *in vivo* (Santos e Ferreira, 2007). Uma representação esquemática mais completa do SRAA para um melhor entendimento é descrita na figura 2.

Nesse contexto, a produção local de Ang II tem sido identificada em muitos órgãos, inclusive no coração (Van Kats *et al.*, 1998). Nos cardiomiócitos, a estimulação do receptor AT<sub>1</sub> pela Ang II promove hipertrofia celular que é independente dos efeitos secundários da vasoconstrição sistêmica mediadas por esse peptídeo vasoativo (Aceto e Baker, 1990). A Ang II também estimula a hipertrofia de fibroblastos e a deposição de colágeno (Figura 3), com posterior fibrose do miocárdio (Weber, 1997; Peng *et al.*, 2002). A fibrose e a expansão da matriz celular são indicadores de remodelamento cardíaco que, associadamente com a reduzida fração de ejeção, são os principais sinais de insuficiência cardíaca. Existe evidência na literatura demonstrando uma forte

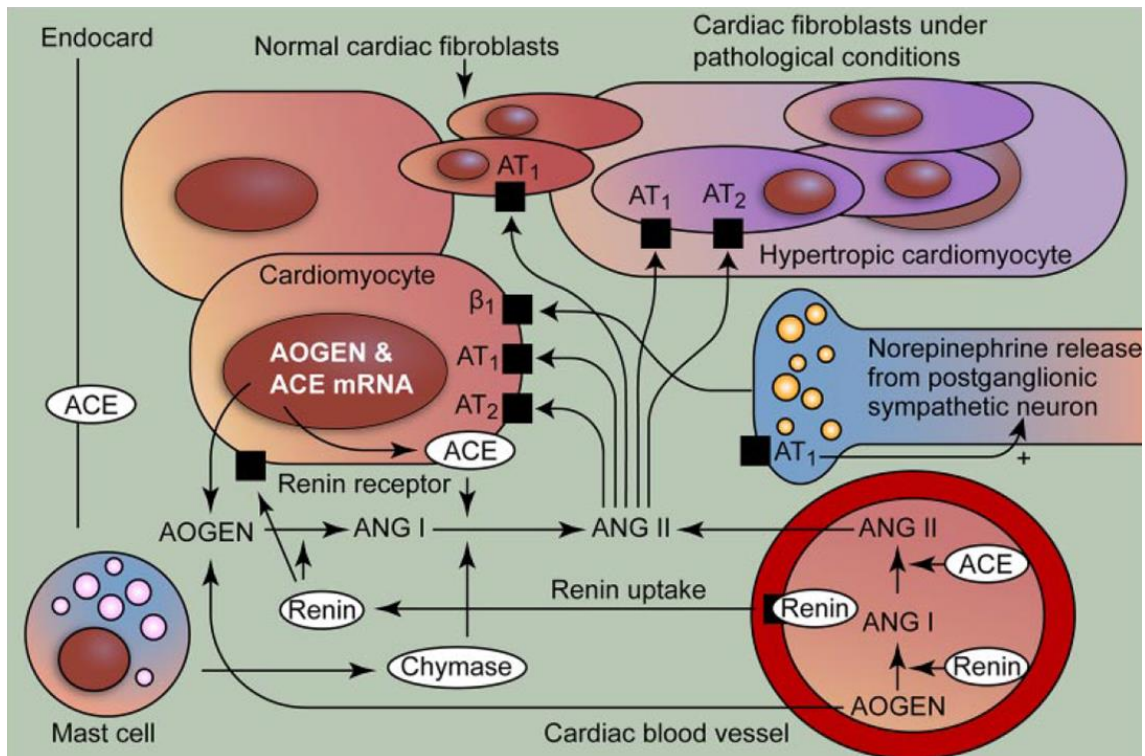


correlação entre os níveis de renina e o comprometimento da função cardíaca em quadros de insuficiência cardíaca, indicando a intensa participação SRA em algumas disfunções cardiovasculares (Francis *et al.*, 1990).



**Figura 2:** Representação esquemática do sistema renina-angiotensina (SRA). Ang: angiotensina; ECA: enzima conversora da angiotensina; AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>: Receptor de angiotensina tipo I e II; AT 1-7: receptor para angiotensina 1-7; RPR: receptor de renina/pró-renina; Mas: receptor para angiotensina 1-7; NEP: endopeptidase neutra; AMPA: aminopeptidase A; AMPM: aminopeptidase M; IRAP: aminopeptidase regulada pela insulina. Adaptado de Sanjuliani *et al.*, 2011.

A Ang II também pode estimular a produção de aldosterona não somente pelas adrenais, mas também pelo coração. Na insuficiência cardíaca, há um aumento da expressão de receptores para aldosterona, o que sugere um aumento da síntese desse hormônio e conseqüentemente maior ativação do SRAA (Yoshida *et al.*, 2005). Além disso, estudos com culturas de fibroblastos demonstraram que a aldosterona pode estimular a síntese de colágeno e aumentar os níveis de ECA no coração, o que poderia acarretar o aumento da produção local de Ang II (Brilla *et al.*, 1994; Harada *et al.*, 2001).



**Figura 3:** Representação do sistema renina-angiotensina cardíaco. A renina e o angiotensinogênio (AOGEN) podem ser produzidos no coração ou ser captados do plasma. A produção de quimase pelos mastócitos (*Mast Cells*) pode ser uma alternativa de produção de Ang II. A síntese desse hormônio ocorre na porção extracelular e pode agir em receptores específicos tanto de cardiomiócitos ou fibroblastos (Paul, Poyan Mehr e Kreutz, 2006).

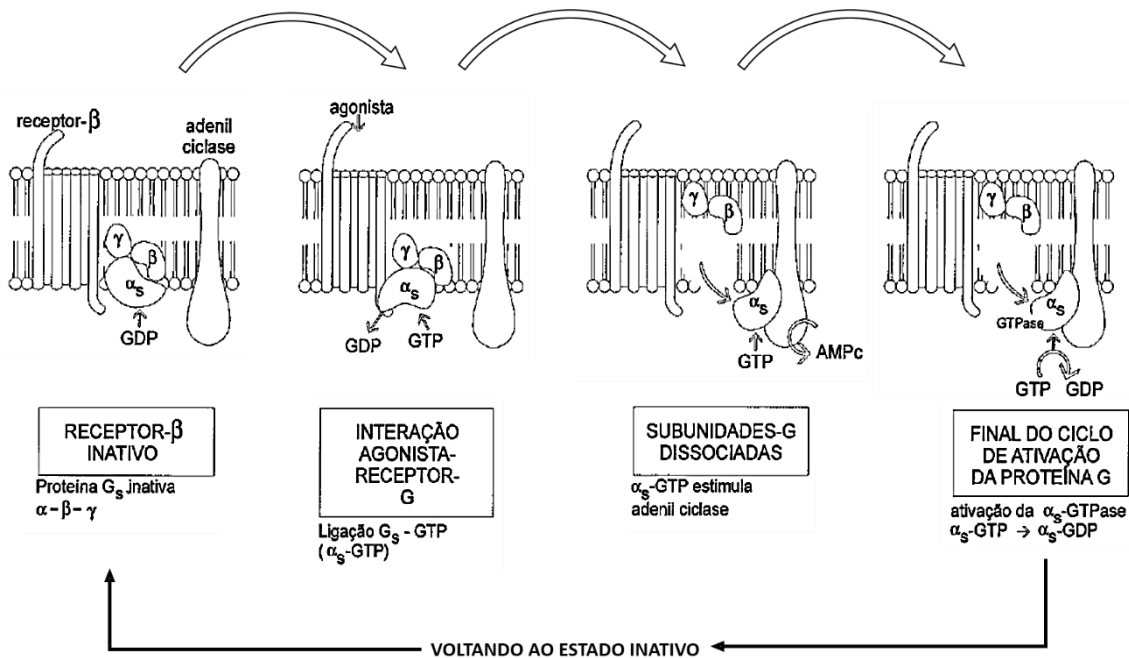
### 2.3 Receptor $\beta$ -adrenérgico ( $\beta$ -AR)

Os receptores adrenérgicos se dividem em  $\alpha$  e  $\beta$ -ARs, sendo os  $\alpha$  subdivididos em  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  e os  $\beta$  em  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ . Os  $\beta$ -ARs, pertencentes à superfamília dos receptores acoplados à proteína G, são caracterizados por sete domínios transmembrana em forma de bolso que é onde se posiciona os sítios de ligação tanto dos agonistas quanto dos antagonistas competitivos. Foi demonstrado em experimentos com mutação genética que o Asp113 localizado no terceiro, a Ser165 no quarto e a Ser204 e Ser207 no quinto domínio transmembrana são capazes de interagir com os agonistas adrenérgicos (Strader *et al.*, 1989; Liggett, 2002). Além disso, os receptores acoplados à proteína contêm três alças extra e intracelulares. A primeira e segunda alça extracelular são acoplados através de uma ponte dissulfeto e desempenham um papel importante no desenvolvimento da conformação do receptor (Dixon *et al.*, 1987; Wallukat *et al.*, 1995). A molécula receptora também inclui um domínio extracelular N-terminal e uma cauda C-terminal citosólica. O último

contém os locais de fosforilação de quinases de receptores acoplados a proteína G (GRKs). O local de fosforilação de PKA é localizado na terceira volta intracelular do receptor (Benovic *et al.*, 1985).

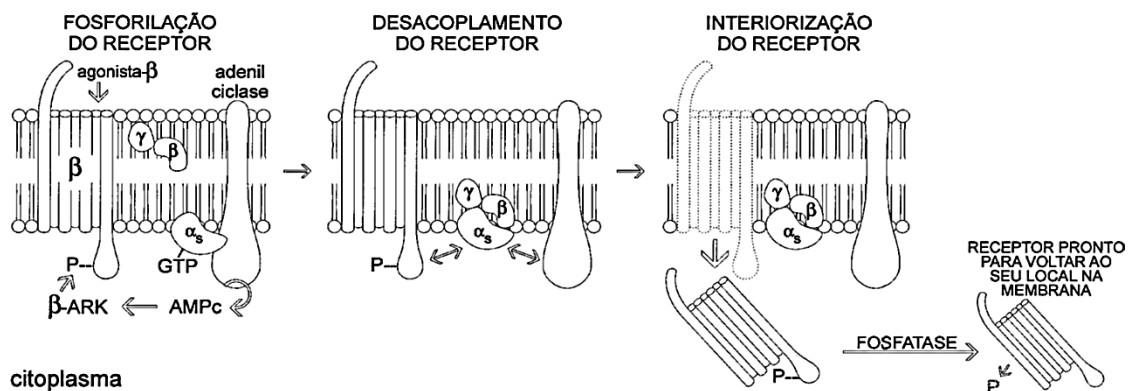
Devem ser destacados dois tipos de proteína G,  $G_s$  (estimulação) e  $G_i$  (inibição), e se constituem em elementos cruciais para o funcionamento do sinal desencadeado pelo  $\beta$ -AR. É sabido que a  $G_s$  e  $G_i$  modulam a atividade da AC podendo ativa-la ( $G_s$ ) ou inibi-la ( $G_i$ ) para formar AMPc. Além disso, outras subunidades de proteína como  $G_h$  e  $G_q$  se ligam aos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos do miocárdio à fosfolipase C que no miocárdio tem função na sinalização protetora em eventos isquêmicos (Neer e Clapham, 1988; Opie, 2004). A proteína  $G_s$  é formada pelas subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e durante o período de inativação da proteína G a subunidade  $\alpha$  encontra-se acoplada à guanina difosfato (GDP). Com ativação do  $\beta$ -AR a subunidade  $G_{\alpha_s}$  troca GDP por guanina trifosfato (GTP) e se separa dos dímeros  $\beta$ ,  $\gamma$  e interage com AC, produzindo AMPc. A inativação do sistema acontece pela ação da enzima guanina trifosfatase (GTPase), a qual possui atividade intrínseca na subunidade  $G_{\alpha_s}$ , que faz com que esta subunidade troque GTP por GDP, além da própria fosforilação do receptor induzida por PKA, impedindo o acoplamento da subunidade  $\alpha_s$  com AC (Figura 4) (Opie, 2004). Deve-se destacar também, que a própria estimulação  $\beta$ -adrenérgica é capaz de inativar indiretamente o AMPc, pois com a concentração elevada de  $Ca^{++}$  no citosol, ativa calmodulina quinase e, conseqüentemente a fosfodiesterase, acarretando degradação do AMPc (Opie e Swynghedauw, 1991; Opie, 2004).

No entanto, a continua estimulação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos parece desempenhar um papel importante no desacoplamento promovido por agonista, que conduz à dessensibilização rápida com posterior regulação negativa do receptor. Por conseguinte, a fosforilação do receptor é um mecanismo eficaz para modular a capacidade de resposta da cascata mediada por  $\beta$ -AR na transdução de sinal (Figura 5) (Sibley *et al.*, 1986).



**Figura 4:** Ciclo de ativação e desativação da proteína  $G_s$ . Ao sofrer ação do agonista, o  $\beta$ -AR promove a troca de GDP por GTP ligada à subunidade  $\alpha_s$ . A  $\alpha_s$ -GTP interage com a adenilato ciclase, induzindo a formação de AMPc. Por ação da  $GTP_{ase}$ , a fração  $\alpha_s$  volta a trocar GTP por GDP, retornando ao seu estado inativo. GDP: guanina difosfato; GTP: guanina trifosfato;  $GTP_{ase}$ : guanina trifosfatase. Adaptado de Barros, Okoshi e Cicogna (1999).

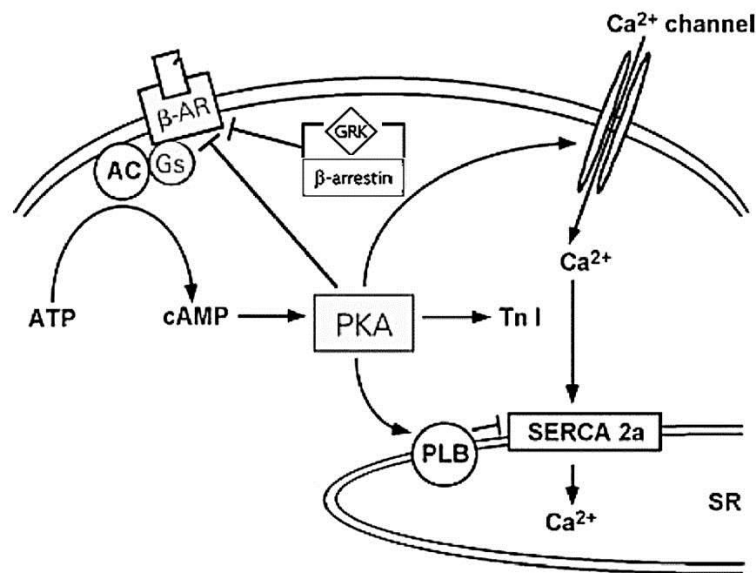
O  $\beta$ -AR é um regulador importante da função cardíaca tanto em condição normal quanto patológica, onde o aumento da liberação de catecolaminas leva a desregulação da sinalização  $\beta$ -AR (Tilley, 2011; Grisanti *et al.*, 2014). A estimulação crônica da sinalização  $\beta$ -AR contribui para modificações na estrutura cardíaca relacionadas ao aumento de apoptose, hipertrofia, fibrose, além da progressão da disfunção contrátil (Houser *et al.*, 2012).



**Figura 5:** Dessensibilização do receptor  $\beta$ -adrenérgico. A elevação de AMPc estimula a  $\beta$ -ARK que fosforila o receptor, tornando-o inativo. No interior do citosol, o receptor é

defosforilado por ação da fosfatase, tornando-se apto para retornar ao seu local na membrana.  $\beta$ : receptor  $\beta$ -adrenérgico; GTP: guanina trifosfato; AMPc: 3',5' monofosfato cíclico de adenosina;  $\beta$ -ARK:  $\beta$ -adreno-receptor quinase; P: fosforilação. Adaptado de Barros, Okoshi e Cicogna (1999).

Ao estimular o receptor  $\beta$ 1-adrenérgico ( $\beta$ 1-AR) esse sinal é retransmitido através PKA, que é responsável por regular uma série de processos importantes, incluindo contractilidade dos cardiomiócitos (Tilley, 2011). Além disso, o  $\beta$ 1-AR também promove ativação de sinalização celular independente de PKA, através da sinalização pela via GRK /  $\beta$ -arrestina (Figura 6).



**Figura 6:** Esquema da transdução de sinal ativado por receptor  $\beta$ -adrenérgico. A estimulação dos receptores  $\beta$ -adrenérgico por catecolaminas ativa a adenilato ciclase via a proteína  $G_s$ , resultando no aumento de concentração do segundo mensageiro AMP cíclico (AMPc), mecanismo descrito anteriormente. O AMPc ativa a proteína quinase A (PKA), que é capaz de fosforilar diferentes proteínas celulares. A fosforilação dos canais de  $Ca^{++}$  tipo L do sarcolema aumenta o influxo de  $Ca^{++}$  e causa a liberação de  $Ca^{++}$  do retículo sarcoplasmático, induzido pelo próprio por  $Ca^{++}$  extracelular. A atividade da  $SERCA_{2a}$  (bomba  $Ca^{++}$  do retículo sarcoplasmático) é inibida pela fosfolamban (PLB) desfosforilada. Após a fosforilação de PLB pela PKA a inibição é abolida e o transporte do  $Ca^{++}$  do citosol para o retículo sarcoplasmático mediado pela  $SERCA_{2a}$  é aumentado. A fosforilação do receptor  $\beta$ -adrenérgico através da PKA induz o desacoplamento e dessensibilização do receptor. Tal desacoplamento do receptor é também mediado através da fosforilação da quinase do receptor de proteína G (GRK ou  $\beta$ -ARK). Esta quinase só é ativada quando o receptor é ocupado por agonistas. Adaptado de Wallukat (2002).

O estímulo contínuo sobre os  $\beta$ -AR promovem alterações em seu funcionamento, onde tanto a quinase de receptor  $\beta$ -adrenérgico 1 ( $\beta$ -ARK1 também chamado de GRK2) quanto a proteína quinase A (PKA) dependente

de AMPc têm sido implicados no processo de fosforilação e, conseqüentemente, os responsáveis por essa alteração no receptor. A dessensibilização específica dos  $\beta$ -AR é mediada através do  $\beta$ -ARK1(GRK2) (Lefkowitz, 1998; Rapacciuolo e Rockman, 1999). O  $\beta$ -ARK1 se caracteriza por ser uma serina / treonina quinase, e também membro da família de quinases acopladas a proteína G (GRKs), expressa em coração de mamíferos (Koch *et al.*, 1995). Além disso,  $\beta$ -ARK1 fosforila o sítio dos agonistas na cauda C-terminal e permite a ligação da proteína citosólica  $\beta$ -arrestina ao receptor. A  $\beta$ -arrestina impede a ligação da proteína  $G_{sa}$  com a adenilato ciclase e bloqueia a transdução de sinal, exemplificado na Figura 6 (Rapacciuolo e Rockman, 1999). Além da GRKs, a PKA também é capaz de fosforilar o  $\beta$ -AR, assim como outras proteínas (Rapacciuolo e Rockman, 1999).

Tem sido destacado que os efeitos dos HTs sobre a ativação e sinalização  $\beta$ -adrenérgica e o desempenho do miocárdio resultam, em parte, do aumento da capacidade de resposta às catecolaminas (Hoit *et al.*, 1997; Ojamaa *et al.*, 2000; Pantos *et al.*, 2008). Algumas evidências sugerem que o número e a sensibilidade dos  $\beta$ AR são aumentados em corações isolados e cultura de células tratados com HT (Williams *et al.*, 1977; Tsai e Chen, 1978; Guarnieri *et al.*, 1980; Morkin, Flink e Goldman, 1983), mas por outro lado, essas respostas não são tão evidentes *in vivo* (Grossman *et al.*, 1971; Aoki, Wilson e Theilen, 1972; Merillon *et al.*, 1981; Hammond *et al.*, 1987; Liggett, Shah e Cryer, 1989; Crozatier *et al.*, 1991; Mintz, Pizzarello e Klein, 1991; Martin, Spina e Korte, 1992). Esses resultados conflitantes possivelmente estão associados às diferentes preparações e desenhos metodológicos, a dose e duração da administração do HT, e aos métodos de análise de dados utilizados. Além disso, as respostas desencadeadas pela estimulação adrenérgica podem ser específicas à idade, tecido ou subtipo de  $\beta$ AR (Bilezikian e Loeb, 1983).

#### 2.4 Hipertrofia cardíaca

O coração é composto pelos cardiomiócitos, fibroblastos, células endoteliais, células do músculo liso vascular e matriz extracelular circundante (Mcmullen e Jennings, 2007). Os cardiomiócitos são células musculares especializadas compostas por feixes de miofibrilas, e estes possuem diversas

unidades micro anatômicas denominadas sarcômero (unidade contrátil básica do músculo cardíaco) (Gregorio e Antin, 2000). Acredita-se que em mamíferos, a maioria dos cardiomiócitos perde a capacidade de proliferar ao nascer ou logo após (hiperplasia), e o crescimento ocorre principalmente como resultado do aumento do tamanho dos cardiomiócitos (hipertrofia) (Soonpaa *et al.*, 1996). Um fato curioso é que apesar dos cardiomiócitos do ventrículo representar apenas um terço do número total de células, são responsáveis por 70-80% da massa cardíaca, deixando evidente a importância dessas células para o desenvolvimento desse órgão. Em adultos, o crescimento do coração está geralmente relacionado à sua carga funcional e, em circunstâncias normais, é principalmente de natureza constitutiva. Isso acontece naturalmente, por que o coração em resposta as constantes variações da carga funcional, desencadeia respostas hipertrófica para contra regular o aumento do estresse na parede das câmaras cardíacas, especialmente no ventrículo esquerdo (Mcmullen e Jennings, 2007).

Desse modo, a hipertrofia cardíaca é definida classicamente como o aumento da massa miocárdica, onde dois tipos bem definidos de hipertrofia são descritos de acordo com seu estímulo, e genericamente classificadas como fisiológica ou patológica (Ojamaa, 2010). Os diferentes tipos de hipertrofia cardíaca são causados por estímulos funcionalmente distinguíveis e estão associados a fenótipos estruturais e moleculares distintos.

A hipertrofia patológica ocorre em resposta a estímulos como hipertensão, doença valvar, infarto do miocárdio e mutações genéticas (Kannel, 1974; Levy *et al.*, 1988; Levy *et al.*, 1990; Seidman e Seidman, 2001; Vakili, Okin e Devereux, 2001; Wakatsuki, Schlessinger e Elson, 2004; Dorn, 2007; Dillmann, 2010). Por outro lado, a hipertrofia fisiológica ocorre nos estágios embrionário e fetal de desenvolvimento relacionados a fase de rápido crescimento e desenvolvimento intrauterino e pós-natal, assim como, em resposta à atividade física regular ou exercício físico crônico (Fagard, 1997; Eghbali *et al.*, 2005; Dillmann, 2010; Ojamaa, 2010).

Tanto a hipertrofia patológica quanto a fisiológica podem ser classificadas como concêntrica ou excêntrica, com base em mudanças na forma da câmara cardíaca e espessura da parede que são dependentes basicamente do estímulo inicial (Figura 7) (Grossman, Jones e McLaurin, 1975;

Pluim *et al.*, 2000; Maillet, Van Berlo e Molkentin, 2013). Assim, um estímulo patológico causando sobrecarga de pressão (hipertensão arterial ou estenose aórtica por exemplo) produz aumento no estresse sistólico de parede que resulta em hipertrofia concêntrica, caracterizada por um coração com paredes grossas e cavidades relativamente pequenas) (Grossman, Jones e McLaurin, 1975). Por outro lado, um estímulo patológico causado por sobrecarga de volume (insuficiência aórtica, fístulas arteriovenosas) produz aumento do estresse diastólico de parede, o que resulta em hipertrofia excêntrica, caracterizado por um coração com cavidades bem dilatadas e paredes relativamente finas (Grossman, Jones e McLaurin, 1975; Pluim *et al.*, 2000).

Entretanto, exercícios contínuos como corrida, caminhada, ciclismo e natação envolvem a ativação de grandes grupos musculares e isso promove a vasodilatação profunda nos diferentes grupos de músculo esquelético envolvidos na atividade, e isso promove a chamada hipertrofia excêntrica devido ao aumento do retorno venoso ao coração e, conseqüentemente, a sobrecarga de volume (Pluim *et al.*, 2000). Esse tipo de hipertrofia é caracterizado pelo alargamento da câmara, porém com uma variação proporcional na espessura da parede, e acontece de uma forma menos pronunciada quando associado ao exercício ou gestação (Dorn, 2007). Por outro lado, os exercícios resistidos, sejam eles com contrações dinâmicas ou isométricas, envolvem a aplicação de grandes tensões musculares contra resistência, porém com pouco deslocamento dos seguimentos corporais, os quais são capazes de promover uma sobrecarga de pressão maior que a de volume sobre o coração, resultando em hipertrofia concêntrica, porém mais branda que a observada em condições patológicas (Pluim *et al.*, 2000).

Durante a hipertrofia patológica o alargamento dos cardiomiócitos e a formação de novos sarcômero servem inicialmente para normalizar a tensão de parede e permitir que a função cardiovascular fique estável durante o repouso (hipertrofia compensada), entretanto, a função desse coração hipertrofiado pode eventualmente descompensar, levando à dilatação do ventrículo esquerdo e, posteriormente, à insuficiência cardíaca (Pluim *et al.*, 2000). Já a hipertrofia fisiológica não descompensa para cardiomiopatia dilatada ou insuficiência cardíaca (Fagard, 1997; Pluim *et al.*, 2000). Contudo, as alterações hipertróficas na anatomia cardíaca induzida pelo exercício também

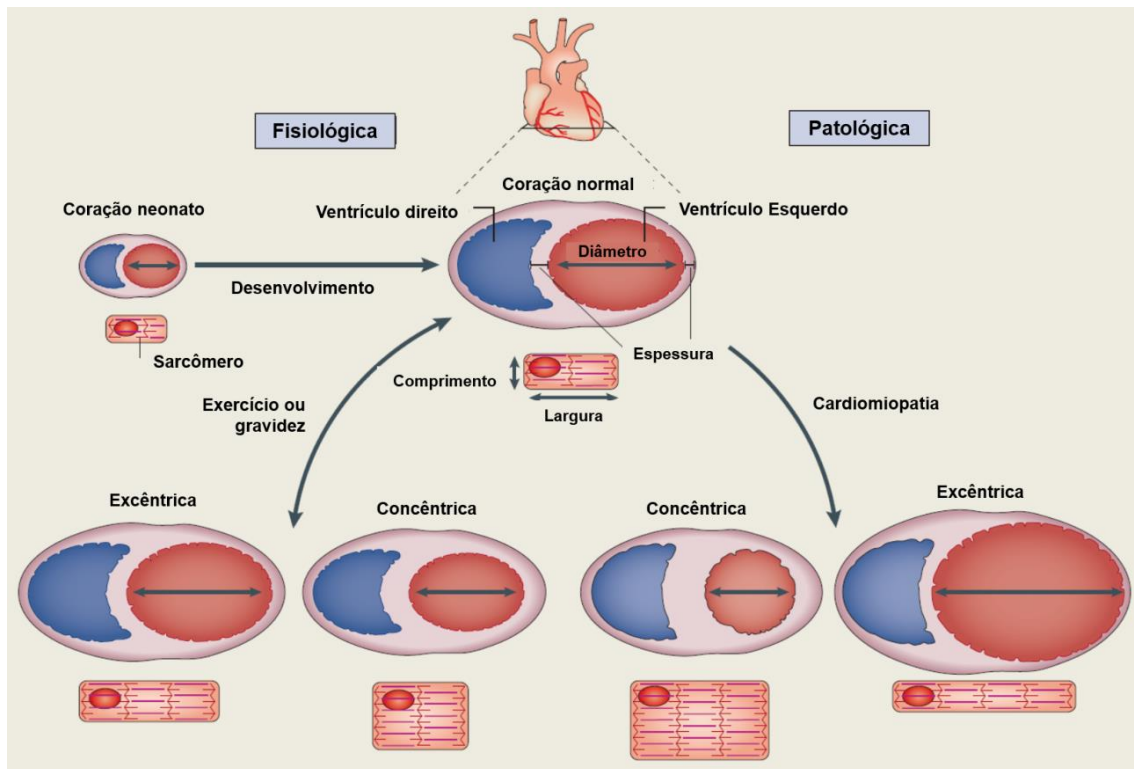


promovem alterações significativas da condução elétrica no tecido cardíaco que podem evoluir, especialmente em idades mais avançadas, para arritmias cardíacas graves (Zehender *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 2006).

Alguns estudos que utilizaram modelos experimentais demonstraram que a hipertrofia fisiológica e patológica tem bases estruturais, histológicas e moleculares distintas, onde o modelo de sobrecarga de pressão induzida pela coarctação da aorta (hipertrofia patológica) é capaz de provocar hipertensão ventricular esquerda (Mcmullen e Jennings, 2007). Entretanto, o modelo de treinamento crônico de natação (hipertrofia fisiológica) resulta em aumento similar da massa do coração, sem nenhum tipo de disfunção compensatória (Mcmullen *et al.*, 2003).

Apesar de ambas as respostas hipertróficas (fisiológica ou patológica) estarem associadas ao aumento da fina rede de fibras colágena que envolvem os cardiomiócitos em condições normais, somente no modelo de hipertrofia patológica a rigidez mecânica é evidente, devido ao acúmulo desproporcional da matriz extracelular e fibroblastos cardíacos (Kaplan *et al.*, 1994; McMullen *et al.*, 2003), o que promove aumento da fibrose intersticial, e contribui para a disfunção diastólica com possível evolução para disfunção sistólica (Brower *et al.*, 2006). Os modelos de hipertrofia cardíaca patológica são frequentemente associados com sobre-regulação (do inglês: *upregulation*) de genes como peptídeo natriurético atrial (ANP), peptídeo natriurético tipo B (BNP) (Yasuno *et al.*, 2009) e genes para isoformas fetais de proteínas contráteis, como um  $\alpha$ -actina e cadeia pesada de miosina  $\beta$  ( $\beta$ -MHC) (Mcmullen e Jennings, 2007). Isto pode ser acompanhada pela redução da expressão de genes que normalmente estão elevados na fase adulta, tais como  $\alpha$ -MHC e SERCA<sub>2</sub>. Entretanto, isso não acontece em modelos de hipertrofia fisiológica induzida por atividade e/ou exercício físico (Mcmullen *et al.*, 2003).

Ambos os tipos de hipertrofia destacados anteriormente apesar de apresentarem características diferentes, ainda não possuem um corpo denso de evidências científicas sobre a distinção das vias moleculares relacionados a cada um deles. O desenvolvimento tecnológico de animais transgênicos em combinação com modelos cirúrgicos e de exercício têm se mostrado muito poderosos para delinear cascatas de sinalização que desempenham papel marcante na regulação do crescimento fisiológico ou patológico.

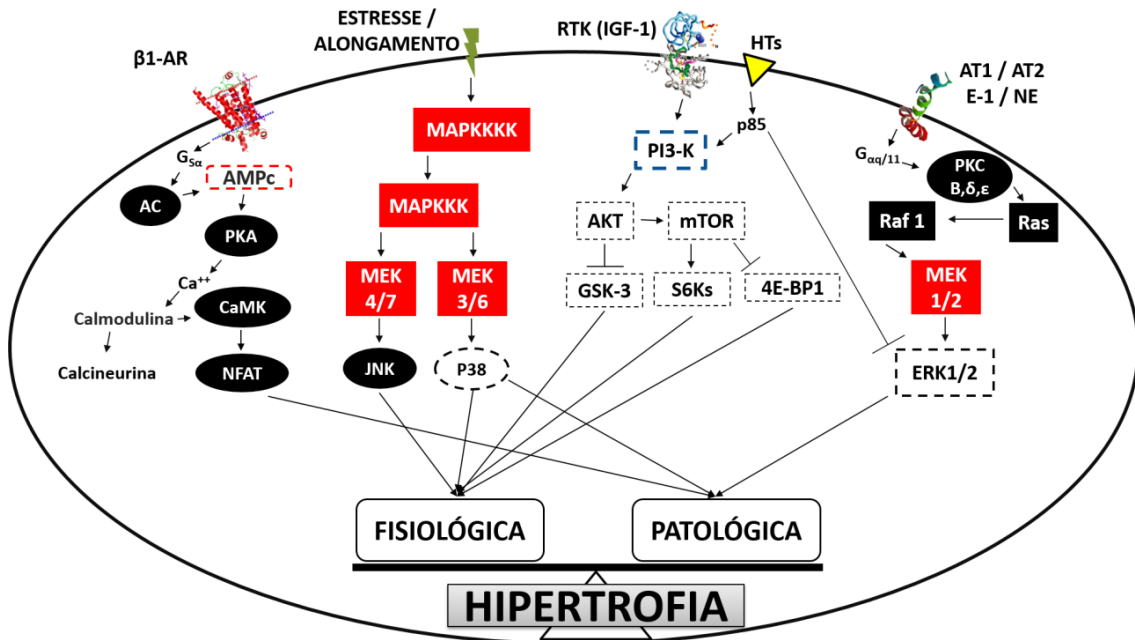


**Figura 7:** Geometria cardíaca relacionada à hipertrofia fisiológica ou patológica. A própria hipertrofia promove redução do estresse de parede ventricular aumentando a espessura da mesma, de acordo com a lei de Laplace [tensão = (pressão x raio)/(espessura x 2)]. A hipertrofia excêntrica fisiológica é caracterizada por aumento no diâmetro e volume ventricular com um crescimento coordenado na espessura da parede e septo, devido ao aumento proporcional do comprimento e largura dos cardiomiócitos, contudo ela acontece de forma menos intensa. Em condições patológicas ocorre a dilatação da parede devido um estiramento preferencial dos cardiomiócitos. Hipertrofia concêntrica é caracterizada por redução do diâmetro da cavidade ventricular esquerda e um aumento na espessura da parede livre e do septo, com uma tendência dos cardiomiócitos aumentarem mais em espessura que em comprimento, resultando em diminuição do quociente comprimento/espessura. Adaptado de Maillet, Van Berlo e Molkenin (2013).

Ao direcionar a atenção para as vias de sinalização celular pode se afirmar que o exemplo mais bem caracterizado da via hipertrófica patológica é a via  $G_{\alpha_q}$ , que representa uma das três subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) de proteínas heterotriméricas G da família  $G_q$ , e se liga aos receptores acoplados à proteína G (GPCR) (Gutkind, 1998). Por outro lado, na hipertrofia fisiológica a via classicamente descrita é  $TKR / PI3-K (p110\alpha)$ , onde o sinal é transmitido devido a  $p110\alpha$ , uma isoforma da  $PI3-K$ , estar acoplada ao receptor de tirosina quinase (TKR), como exemplo, os receptores de IGF-1 (Schlessinger, 2000).

A partir de então pode ser formada uma ideia inicial sobre as vias de sinalização intracelulares envolvidas nos diferentes tipos de hipertrofia

cardíaca, que serão detalhadas de maneira específica, tanto na hipertrofia patológica quanto fisiológica, nos tópicos seguintes. Inicialmente, a Figura 8 representa as vias de sinalização celular clássicas na manutenção dos cardiomiócitos, em situação normal.



**Figura 8:** Manutenção ideal da integração (*crosstalk* contra-regulatório) entre as vias de sinalização celular no cardiomiócito, durante uma condição normal. AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>: receptores para angiotensina; CaMK: calmodulina quinase; MEK: Proteína quinase quinase ativadora de mitógeno; mTOR: proteína alvo da rapamicina em mamíferos; NFAT: fator nuclear ativador de células T; Endo-1: endotelina-1; ERK, quinase regulada por sinal extracelular; CaMK: calmodulina quinase; JNK: quinase c-jun N-terminal; MAPKKK: Proteína quinase quinase quinase ativadora de mitógeno; MAPKKKK: Proteína quinase quinase quinase quinase ativadora de mitógeno; GSK3β: glicogênio sintase quinase-3β; IGF-1: fator insulínico de crescimento tipo 1; PKA: proteína quinase A; PKC: proteína quinase C; RTK: receptor de tirosina quinase; S6K: quinase S6; PKB(Akt): proteína quinase B; β1-AR: receptor β1-adrenérgico; 4E-BP1: proteína de ligação 4E; AC: adenilato ciclase; AMPc: adenosina monofosfato cíclico; HTs: transportadores de hormônio tireoidiano; p85: subunidade reguladora α de interação com PI3-K. Desenhado por Anderson Silveira (não publicado).

#### 2.4.1 Vias de sinalização na hipertrofia patológica

A geração de fatores cardíacos parácrinos, autócrinos ou ambos, tais como angiotensina (Ang) II, endotelina-1 (ET-1) e noradrenalina, em resposta a um estímulo patológico desempenha um papel importante no desenvolvimento de hipertrofia cardíaca patológica. Esses ligantes ativam a GPCR, o que leva à dissociação de G<sub>αq</sub> e ativação de moléculas em pontos descendentes da via de

sinalização (do inglês: *downstream*) como MAPK-ERK1/2, descrita com maior detalhe no próximo subtópico, que é um mediador crítico da resposta hipertrófica patológica (Harris *et al.*, 2004; Muslin, 2008; Bernardo *et al.*, 2010). Em camundongos transgênicos para a sobreexpressão do receptor Ang II/AT<sub>1</sub> e G<sub>αq</sub> no coração induziu hipertrofia cardíaca, que foi relacionada com a expressão alterada de alguns genes que poderiam estar associados à disfunção cardíaca, e morte prematura (D'angelo *et al.*, 1997; Hein *et al.*, 1997; Mende *et al.*, 1998). Por outro lado, os animais que não possuíam proteína G (G<sub>αq</sub> e G<sub>α11</sub>) no cardiomiócitos não desenvolveram hipertrofia cardíaca em resposta a sobrecarga de pressão, sugerindo que a via G<sub>α11</sub> é importante para a indução de hipertrofia patológica (Akhter *et al.*, 1998; Wettschureck *et al.*, 2001). Ademais, a hipertrofia patológica é claramente abolida quando realizado o bloqueio da ação de Ang II, o que não ocorre na hipertrofia induzida pelo exercício ou pelo hormônio tireoidiano (HT) (Geenen, Malhotra e Buttrick, 1996; Devereux, 2000; Kinugawa *et al.*, 2005; Kenessey e Ojamaa, 2006; Balakumar e Jagadeesh, 2010; Ojamaa, 2010).

#### 2.4.1.1 ERK

A via de sinalização MAPK é constituída por uma sequência de quinases funcionais, que em última análise, resulta na dupla fosforilação e ativação de p38, c-Jun N-terminal quinase (JNK) e ERKs. A cascata de sinalização MAPK é iniciada em miócitos cardíacos por vários ativadores como GPCR, TKR/IGF-1, TGF-β, cardiotrofina-1 e também, por estímulos estressores como o estiramento. Desse modo, quando p38, c-Jun N-terminal quinase (JNK) e ERKs são ativados eles fosforilam diversos alvos intracelulares, incluindo vários fatores de transcrição que induzem a reprogramação da expressão gênica no coração. As MAPK quinases (MAPKK), em especial, MEK1 e MEK2 fosforilam o sitio duplo de ativação das ERKs e por isso são conhecidas como seus ativadores localizados em pontos ascendentes da via de sinalização (do inglês: *upstream*) (Sugden e Clerk, 1998; Garrington e Johnson, 1999).

A ativação da ERK1/2, vem sendo relacionada à hipertrofia patológica e insuficiência cardíaca (Boulton *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2001; Harris *et al.*, 2004; Muslin, 2008). Alguns estudos demonstram que a ativação da ERK1/2

ocorre somente em modelos que induzem a hipertrofia cardíaca patológica (Ang II, endotelina-1 e noradrenalina) (Clerk *et al.*, 2006). Entretanto, existem estudos demonstrando que animais transgênicos que expressam mais MEK1 no coração desenvolvem hipertrofia concêntrica com melhora de função sistólica sem fibrose intersticial (Bueno *et al.*, 2000), ou não desencadeiam nenhuma alteração mesmo em modelos de exercício (Purcell *et al.*, 2007). Sendo assim, a ativação ERK1/2 apesar de ser bastante evidente, ainda não está claro o seu papel crítico nas respostas hipertróficas.

O mecanismo proposto na literatura que descreve a hipertrofia envolvendo ERK1/2 tem início com a ativação da cascata tradicional de sinalização da MAPK (Ras / Raf1 / MEK / ERK), que após a ligação das proteínas  $G_{\alpha q}$  aos GPCRs resulta em fosforilação e ativação de ERK1/2 e consequentemente, de outros substratos (S6Ks) contribuindo para a síntese de proteínas (Lorenz *et al.*, 2009). Em segundo lugar, a interação do complexo de Ras / Raf1 / MEK / ERK com proteínas  $G_{\beta \gamma}$  permite a ERK1/2 fosforilar alvos nucleares como NFAT, aumentando a sua atividade transcricional (Sanna *et al.*, 2005). Assim, a ativação da sinalização MEK-ERK1/2 parece induzir a hipertrofia compensada com superexpressão (do inglês *overexpression*) de seus reguladores *upstream*, como Ras, promovendo a indução do fenótipo hipertrófico patológico (Hunter *et al.*, 1995).

#### 2.4.1.2 p38

A p38-MAPK é um componente crítico de vias de resposta ao estresse e um mediador importante de várias funções biológicas, que vão desde crescimento até morte celular (Wilson *et al.*, 1996; Bassi *et al.*, 2008). No coração, a p38-MAPK está envolvida na regulação da expressão de genes, apoptose, metabolismo, remodelamento, contratilidade e hipertrofia (Liao *et al.*, 2001; Petrich e Wang, 2004; Baines e Molkentin, 2005; Wang, 2007). Além disso, ela parece ser ativada nas respostas isquêmicas miocárdicas (Cook, Sugden e Clerk, 1999).

A família p38-MAPK consiste de quatro isoformas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  e  $\gamma$ ), embora apenas  $\alpha$  e  $\beta$  sejam expressas no coração (Jiang *et al.*, 1997; Clark, Sarafraz e Marber, 2007). A isoforma p38 $_{\alpha}$  é predominante no miocárdio em humanos e roedores (Lemke *et al.*, 2001; Braz *et al.*, 2003). O papel da p38 $_{\alpha}$  e p38 $_{\beta}$  no

coração ainda é bastante controverso, porém estudos que utilizaram animais transgênicos para MEK3 ou MEK6, proteínas reguladores *upstream* de p38, observaram que a redução da ativação p38 induziu queda da função cardíaca, fibrose, hipertrofia concêntrica e expressão gênica fetal e elevação de ANP e BNP em animais jovens (Liao *et al.*, 2001; Braz *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Nishida *et al.*, 2004). Além disso, a p38 parece ser capaz de fosforilar diretamente NFAT e regular negativamente o crescimento cardíaco por reduzir os efeitos da sinalização da calcineurina no coração (Molkentin, 2004). De maneira geral, a p38 parece desempenhar um papel crítico na proteção do coração (Nishida *et al.*, 2004).

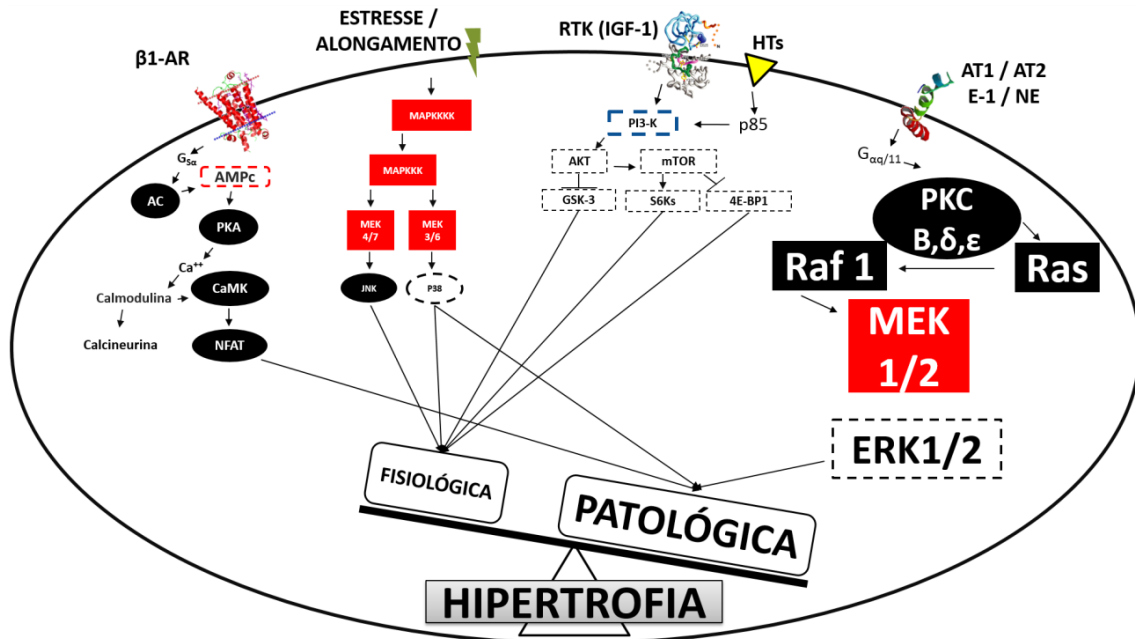
Por outro lado, evidências apontam que a ativação direta da p38 parece estar envolvida com o desenvolvimento de cardiomiopatia dilatada, significativa fibrose intersticial e insuficiência cardíaca, porém sem evidências de hipertrofia (Liao *et al.*, 2001).

As possíveis explicações para essas divergências, provavelmente, estão relacionadas a diferenças nos modelos experimentais utilizados, como: animais de diferentes linhagens e perfis genéticos (Braz *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003), gênero (Liu *et al.*, 2006), a possível regulação específica pela MKK3 ou MKK6 para cada isoforma da p38 (p38 $_{\alpha}$  e p38 $_{\beta}$ ) (Wang *et al.*, 1998), ativação da via independente das suas quinases reguladoras (Wang *et al.*, 1998) e até mesmo curva dose-resposta bifásica (Muslin, 2008).

A sinalização dessa via começa pela ativação das proteínas quinases MEK3 / MEK6 que ativam a p38, e esta exerce uma ação de inativação da NFAT e ativação dos fatores de transcrição no núcleo celular (Liao *et al.*, 2001). Outra via com menos destaque na literatura é a ativação de p38 mediada diretamente pelo receptor  $\beta$ 1-AR nos cardiomiócitos de camundongo, independente da concentração de AMPc ou ativação de PKA (Sabri *et al.*, 2000).

Sendo assim, a p38 parece exercer uma ação dual, com provável atuação atporatória nos cardiomiócitos, o que contribui para o desenvolvimento harmônico do coração (Liao *et al.*, 2001; Molkentin, 2004; Petrich e Wang, 2004; Baines e Molkentin, 2005; Wang, 2007).

Um exemplo global da quebra contra-regulatória entre as vias de sinalização na resposta hipertrófica patológica pode ser exemplificado na Figura 9.



**Figura 9:** Desregulação da integração (*crosstalk* contra-regulatório) entre as vias de sinalização celular no cardiomiócito, durante estímulo patológico. AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>: receptores de angiotensina; CaMK: calmodulina quinase; MEK: Proteína quinase quinase ativadora de mitógeno; mTOR: proteína alvo da rapamicina em mamíferos; NFAT: fator nuclear ativador de células T; Endo-1: endotelina-1; ERK, quinase regulada por sinal extracelular; CaMK: calmodulina quinase; JNK: quinase c-jun N-terminal; MAPKKK: Proteína quinase quinase quinase ativadora de mitógeno; MAPKKKK: Proteína quinase quinase quinase quinase ativadora de mitógeno; GSK3β: glicogênio sintase quinase-3β; IGF-1: fator insulínico de crescimento tipo 1; PKA: proteína quinase A; PKC: proteína quinase C; RTK: receptor de tirosina quinase; S6K: quinase S6; PKB(Akt): proteína quinase B; β1-AR: receptor β1-adrenérgico; 4E-BP1: proteína de ligação 4E; AC: adenilato ciclase; AMPc: adenosina monofosfato cíclico; HTs: transportadores de hormônio tireoidiano; p85: subunidade reguladora α de interação com PI3-K. Desenhado por Anderson Silveira (não publicado).

#### 2.4.2 Via de sinalização na hipertrofia fisiológica

A hipertrofia fisiológica é amplamente relacionada à sinalização induzida por IGF-1 no coração, e parece estar associada ao desenvolvimento pós-natal e a atividade física (Yeh *et al.*, 1994; Conlon e Raff, 1999; Koziris *et al.*, 1999; Neri Serneri *et al.*, 2001). O IGF-1 age através do seu receptor IGF-1R, que é um receptor de tirosina-quinase (TRK), responsável por ativar a PI3-K (p110α). A PI3-K libera inositol lipídios a partir da membrana plasmática mediando a sinalização intracelular, além de serem capazes de regular

diversas funções fisiológicas, incluindo o crescimento (Toker e Cantley, 1997). Corroborando essa afirmação, animais transgênicos com aumento da sinalização cardíaca de IGF-1 / PI3-K desenvolvem hipertrofia cardíaca, com mortalidade e função cardíaca em níveis normais (Reiss *et al.*, 1996; Shioi *et al.*, 2000; McMullen, Shioi, Huang, *et al.*, 2004). Por outro lado, camundongos transgênicos com a sinalização cardíaca reduzida de IGF-1/PI3-K e submetidos a treinamento de natação durante quatro semanas apresentaram corações significativamente menores em relação aos seus controles treinados (Shioi *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 2005), sugerindo que esta via exerça um papel importante na hipertrofia fisiológica induzida pelo exercício (Shioi *et al.*, 2000; McMullen *et al.*, 2003; Bernardo *et al.*, 2010).

#### 2.4.2.1 Akt

A serina-treonina quinase Akt, também chamada de PKB é outra proteína *downstream* muito importante da via IGF-1/PI3-K, que apresenta três isoformas (Akt1, Akt2 e Akt3) importantes, que estão envolvidas em diversos processos celulares, com destaque especial para síntese de proteínas e, conseqüentemente, a hipertrofia cardíaca (Matsui *et al.*, 2002). Akt pode ser ativada tanto por receptores tirosina-quinase (IGF-1R) quanto por receptores acoplados à proteína G (GPCR) e parece ser regulada de forma diferente, dependendo do estímulo inicial (Bernardo *et al.*, 2010).

A Akt, especialmente a Akt1, parece ser importante para a regulação da hipertrofia e compensação funcional do coração durante estímulos patológicos (sobrecarga de pressão); e os efeitos benéficos da sinalização de Akt/PKB parecem ocorrer no núcleo (Shiraishi *et al.*, 2004; Rota *et al.*, 2005; Debosch *et al.*, 2006). Entretanto, os dados na literatura relacionados a participação hipertrófica da Akt são muito conflitantes (Condorelli *et al.*, 2002; Matsui *et al.*, 2002; Shioi *et al.*, 2002; Shiraishi *et al.*, 2004). Uma possível explicação para isso seria o nível de expressão das diferentes isoformas e localização subcelular. No entanto, mais recentemente, evidências bem controladas indicam que Akt1 está associada à hipertrofia fisiológica e Akt3 à hipertrofia patológica (Taniyama *et al.*, 2005; Debosch *et al.*, 2006; Sussman *et al.*, 2011).



#### 2.4.2.2 GSK3

Outro substrato celular importante da Akt é a proteína glicogênio sintase quinase 3 (GSK3) que se caracteriza como uma importante quinase reguladora com diversos alvos celulares, incluindo as proteínas do citoesqueleto e fatores nucleares de transcrição. Ambas as isoformas da GSK3 (GSK3 $\alpha$  e GSK3 $\beta$ ) são expressas no coração (Ferkey e Kimelman, 2000; Harwood, 2001; Hardt e Sadoshima, 2002). Alguns dados demonstram que GSK3 $\beta$  regula negativamente o crescimento do coração e que a sua inibição é um importante elemento para que ocorra hipertrofia dos cardiomiócitos (Haq *et al.*, 2000; Morisco *et al.*, 2000; Morisco *et al.*, 2001; Antos *et al.*, 2002; Badorff *et al.*, 2002). Estudos recentes têm mostrado que GSK3 $\alpha$  é capaz de inibir o crescimento cardíaco pós-natal e reduzir fibrose, apoptose e hipertrofia induzida por estímulos patológicos (Zhai *et al.*, 2007). Curiosamente, as isoformas GSK3 $\alpha$  e GSK3 $\beta$  parecem ter papéis distintos em um cenário de sobrecarga de pressão. A fosforilação de GSK3 $\beta$  foi essencial para o desenvolvimento de hipertrofia patológica enquanto a fosforilação de GSK3 $\alpha$  desempenhou um papel compensatório (Matsuda *et al.*, 2008).

#### 2.4.2.3 S6Ks

Akt (PKB) também pode aumentar a síntese de proteínas através da ativação mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos), e esta é considerada um ativador proximal de quinases S6 ribossomais (S6Ks), onde em experimentos com o bloqueio da mTOR ocorre redução dos níveis hipertróficos pela inibição de S6K (Cantley, 2002; Shioi *et al.*, 2003; McMullen, Sherwood, *et al.*, 2004; Proud, 2004). As S6Ks (S6K1 e S6K2) são componentes *downstream* da via PI3-K e Akt e também desempenham um papel importante na regulação de síntese de proteínas. Alguns experimentos demonstraram, em modelos de hipertrofia fisiológica, a ativação da via IGF-1/PI3-K e atividade de S6K1 (McMullen, Shioi, Huang, *et al.*, 2004). Entretanto, assim como em outras vias as quinases ribossomais também apresentam respostas bem controversas (Shioi *et al.*, 2000; McMullen, Shioi, Zhang, *et al.*, 2004).

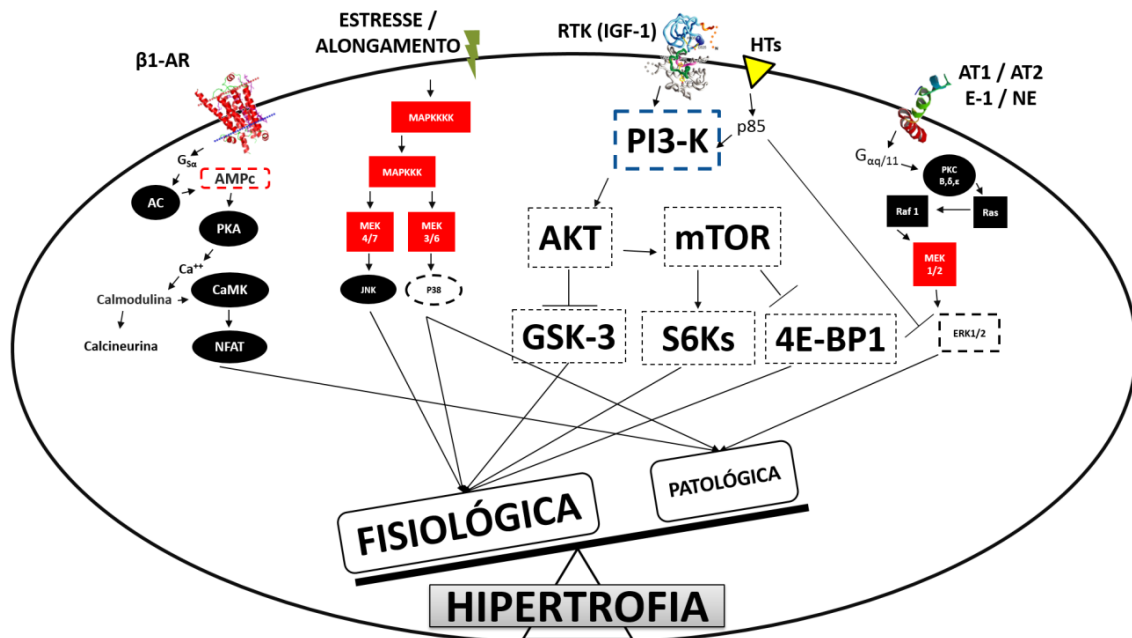
#### 2.4.2.4 4E-BP1 e sua regulação pelo HT

A mTOR por meio de seus alvos *downstream* é considerada a principal moduladora da eficiência de síntese de proteínas intracelulares, e a proteína de

ligação 4E (4E-BP1) é descrita como um dos seus alvos principais. Esta proteína é muito importante na mediação da tradução e síntese de diversas outras proteínas, por que ela interage com uma região na superfície do fator eucariótico de iniciação 4E (eIF4E) que coincidentemente é a mesma região de interação com o fator de iniciação 4G (eIF4G), convém lembrar que essas duas últimas proteínas interagem entre si recrutando diversos outros fatores que conduzem a síntese de proteína. Então, a interação de 4E-BP1 com eIF4E impede a associação de eIF4G com eIF4E e bloqueia a formação do complexo eIF4F. A afinidade de 4E-BP1 por eIF4E é regulada pela fosforilação de 4E-BP1 (Gingras, Raught e Sonenberg, 2001; Browne e Proud, 2002; Martin e Blenis, 2002). Sendo assim, a ativação de mTOR fosforila 4E-BP1 que reduz o seu efeito inibitório sobre eIF4E, permitindo assim o aumento da taxa de conversão de proteína e biossíntese de ribossomos (Tee e Blenis, 2005).

Kenessey e Ojamaa (2006) demonstraram que o tratamento *in vitro* de cardiomiócitos com T<sub>3</sub> aumentou a fosforilação de 4E-BP1 e que esses efeitos foram bloqueados por inibidores de PI3-K e mTOR, suportando a ideia que a via PI3K/Akt-mTOR desempenha um papel importante na hipertrofia de cardiomiócitos induzido por T<sub>3</sub>. Já os estudos de Kuzman, O'connell e Gerdes (2007) e Kemi *et al.* (2008) relataram que a hipertrofia dos cardiomiócitos *in vivo* parece acontecer especificamente pela via AKT/mTOR/S6 kinase sem nenhuma diferença da ativação da 4E-BP1 entre a hipertrofia fisiológica e patológica (Kemi *et al.*, 2008). Sendo assim, a literatura ainda não fornece dados consistentes que evidencie que a hipertrofia cardíaca induzida pelos HTs promova fosforilação da 4E-BP1. Um exemplo mais ilustrativo do complexo truncamento entre diferentes vias de sinalização celular associada à hipertrofia cardíaca fisiológica pode ser observado na Figura 10.

De uma maneira geral, todas as vias de sinalização descritas anteriormente se entrelaçam e exercem funções distintas em virtude de uma série de eventos transmembrana. Desse modo, a afirmação categórica da via que modula tal fenômeno no coração deve ser evitada ou no mínimo colocada com cuidado.



**Figura 10:** Interação entre as diferentes vias de sinalização celular associada à hipertrofia cardíaca fisiológica. AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>: receptores de angiotensina; CaMK: calmodulina quinase; MEK: Proteína quinase quinase ativadora de mitógeno; mTOR: proteína alvo da rapamicina em mamíferos; NFAT: fator nuclear ativador de células T; Endo-1: endotelina-1; ERK, quinase regulada por sinal extracelular; CaMK: calmodulina quinase; JNK: quinase c-jun N-terminal; MAPKKK: Proteína quinase quinase ativadora de mitógeno; MAPKKKK: Proteína quinase quinase quinase ativadora de mitógeno; GSK3β: glicogênio sintase quinase-3β; IGF-1: fator insulínico de crescimento tipo 1; PKA: proteína quinase A; PKC: proteína quinase C; RTK: receptor de tirosina quinase; S6K: quinase S6; PKB(Akt): proteína quinase B; β1-AR: receptor β1-adrenérgico; 4E-BP1: proteína de ligação 4E; AC: adenilato ciclase; AMPc: adenosina monofosfato cíclico; HTs: transportadores de hormônio tireoidiano; p85: subunidade reguladora α de interação com PI3-K. Desenhado por Anderson Silveira (não publicado).

## 2.5 Hipertrofia cardíaca induzida pelo hormônio tireoidiano

As primeiras evidências de correlação entre as doenças tireóideas e as cardiopatias foram descritas pelo trabalho de Caleb Parry em 1825, que mostrou uma associação interessante entre o aumento do volume da tireoide e a insuficiência cardíaca (Parry, 1825). Somente dez anos mais tarde, o pesquisador Robert Graves fez uma descrição detalhada da doença em mulheres (Graves, 1835), que mais tarde, ficou conhecida pelo seu nome: “doença de Graves”.

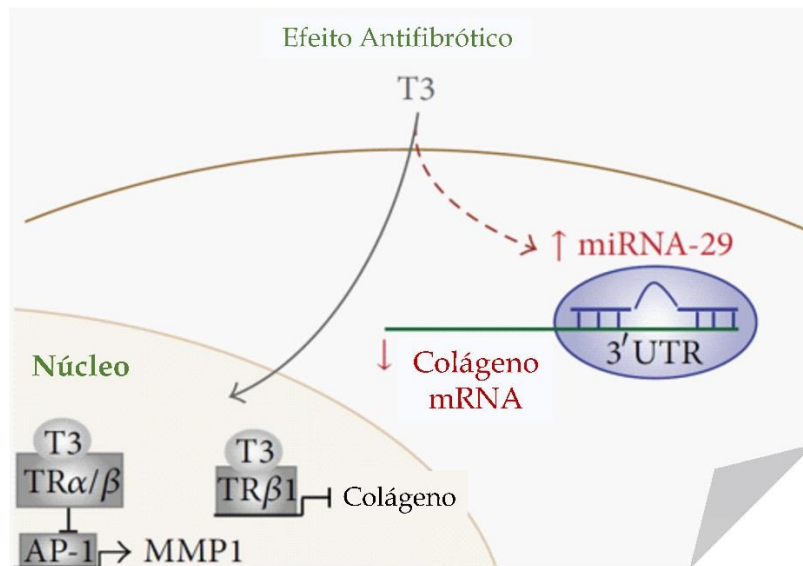
O HT exerce amplas ações fisiológicas sobre sistema cardiovascular que vão desde estruturais até eletrofisiológicas (Fazio *et al.*, 2004; Kahaly e Dillmann, 2005; Dillmann, 2010; Grais e Sowers, 2014). Um dos efeitos de maior destaque do HT é a sua capacidade de promover aumento das respostas

cronotrópicas, inotrópicas, dromotrópicas e lusitrópicas tanto em animais quanto em humanos (Fazio *et al.*, 2004; Dillmann, 2010; Grais e Sowers, 2014). Além disso, é bem evidente que alterações no metabolismo dos hormônios tireoidianos interferem sobremaneira no desenvolvimento dos órgãos, assim como, elevam a possibilidade de disfunções cardiovasculares especialmente em modelos com longo tempo de administração de doses elevadas de HT (Kinugawa *et al.*, 2005; Nicolini *et al.*, 2013). A importância das manifestações cardíacas na tireotoxicose tem sido amplamente estudada por vários grupos, particularmente, aquelas relacionadas à hipertrofia (Klein e Ojamaa, 1998; Silveira *et al.*, 2014).

Nesta direção, observa-se que o HT é um modulador importante do desenvolvimento miocárdico, pois durante o período neonatal, os níveis plasmáticos de HT se elevam promovendo a mudança das isoformas de proteínas-chave miocárdicas da fase fetal para as encontradas em adultos, tais como elevação da expressão de SERCA<sub>2</sub> e isoformas  $\alpha$  da cadeia pesada de miosina ( $\alpha$ -MHC) e redução da expressão da cadeia pesada de miosina  $\beta$  ( $\beta$ -MHC). Desse modo, baixo nível de T<sub>3</sub> pode favorecer, em longo prazo, a danos de órgãos-alvo, como o coração (Pantos, Mourouzis e Cokkinos, 2012; Nicolini *et al.*, 2013). De maneira geral, os efeitos hipertróficos induzidos pelos hormônios tireoidianos promovem o crescimento proporcional de outros tipos de células no interior do coração, além do aumento dos cardiomiócitos com uma organização miofibrilar normal. Além disso, a hipertrofia cardíaca em resposta ao HT apresenta uma melhora da maquinaria transducional devido ao aumento da capacidade de síntese de proteínas e consequentemente o aumento do teor celular de ribossomos e RNAm (Morgan *et al.*, 1987).

Um assunto muito controverso na literatura é a fibrose cardíaca, que seria uma evidência de hipertrofia patológica, na ação hipertrófica induzida pelo HT (Mill e Vassallo, 2001; Wakatsuki, Schlessinger e Elson, 2004). Entretanto, alguns autores relatam que a hipertrofia induzida pelo HT além de não ser acompanhada por fibrose cardíaca nem acúmulo de colágeno no interstício miocárdico (Hu, Liberti e Barreto-Chaves, 2005), o HT tem um papel importante em reduzir a regulação (do inglês: *downregulation*) de colágeno tipo I, o maior colágeno fibrilar no coração (Figura 11) (Yao e Eghbali, 1992; Nicolini *et al.*, 2013). Porém, outros demonstraram que em animais *knockout* para D<sub>3</sub>, que

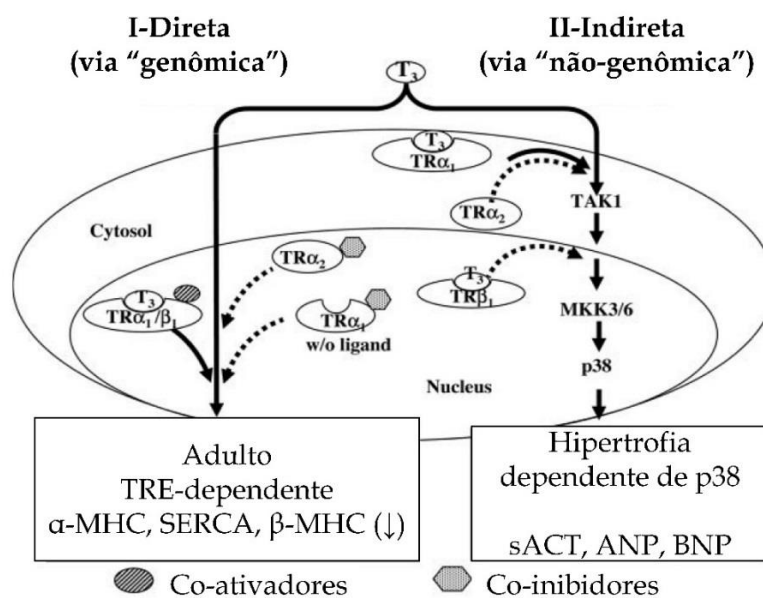
apresentam hipertireoidismo tissular cardíaco, independente do eutireoidismo sistêmico, ocorre intensa fibrose miocárdica (Ueta *et al.*, 2012). Entretanto, não foi avaliado nesse estudo os níveis de expressão do micro RNA 29 (miRNA-29) nos animais *knockout* para D<sub>3</sub>, o qual tem importante papel na regulação da fibrose cardíaca (Van Rooij *et al.*, 2008; Nicolini *et al.*, 2013).



**Figura 11:** Ligação ao TRβ/α T<sub>3</sub> inibindo AP-1, resultando em *downregulation* de MMP1. Além disso, T<sub>3</sub> inibe a síntese de colágeno através da via genômica clássica mediada pelo TRβ1. A regulação positiva do micro RNA antifibrótico miRNA-29 por T<sub>3</sub> como uma importante janela de investigação. Adaptado de Nicolini *et al.* (2013).

Em nível molecular, os conceitos estabelecidos sobre os efeitos do HT sobre a hipertrofia cardíaca apresentam certas controvérsias e precisam de maiores esclarecimentos. De uma maneira geral o HT parece ativar os receptores para hormônios tireoidianos (TR) nos cardiomiócitos derivados de dois genes que são provenientes de *splicing* alternativo para dar origem a quatro isoformas dos receptores de ligação para T<sub>3</sub>, onde TR<sub>α1</sub> TR<sub>β1</sub> são predominantes no cardiomiócitos, com TR<sub>α1</sub> sendo expresso tanto no citosol quanto no núcleo celular, podendo então, ativar as ações genômicas e não genômicas do HT no coração, demonstrado na Figura 12 (Kinugawa *et al.*, 2005; Kenessey, Sullivan e Ojamaa, 2006). A ativação da PI3-K pela interação direta da subunidade reguladora p85<sub>α</sub> com o TR<sub>α1</sub> resulta em fosforilação da Akt, mTOR, 4E-BP1, S6 quinase (p70S6K), que iniciam as alterações na expressão de genes que são compatíveis com o fenótipo fisiológico de

hipertrofia cardíaca (Simoncini *et al.*, 2000; Kuzman, Gerdes, *et al.*, 2005; Kuzman, Vogelsang, *et al.*, 2005; Kenessey e Ojamaa, 2006; Dillmann, 2010). Entretanto, outras vias menos evidentes e controversas, como a via da MAPK, parecem estar ativadas na modulação hipertrófica cardíaca, independente da fosforilação de Akt (Pantos, Mourouzis, *et al.*, 2007). Um exemplo específico é a proteína *downstream* da via da MAPK conhecida como p38 (Kinugawa *et al.*, 2005). Assim, a indução de hipertrofia pelo HT via sinalização por MAPK não deveria ser descartada.



**Figura 12:** Ações genômicas e não genômicas relacionadas aos receptores de hormônio tireoidiano e hipertrofia cardíaca. Adaptado de Kinugawa *et al.* (2005). α-MHC: cadeia pesada de miosina α; β-MHC: cadeia pesada de miosina β; SERCA: retículo sarcoendoplasmático Ca<sup>++</sup>/ATP<sub>ase</sub>; ANP: peptídeo natriurético atrial; BNP: peptídeo natriurético do tipo b; sACT: alfa-actina esquelética.

Além de alterações sistêmicas, o HT parece também estar diretamente envolvido com modificações locais sobre a ativação do sistema renina angiotensina (SRA). Alguns estudos demonstram que o hipertireoidismo promove modificações no SRA cardíaco promovendo aumento nos níveis cardíacos de renina, o que estimula a ativação da ECA e eleva a geração de Ang II, que parece ser o principal responsável pelas alterações cardiovasculares, devido ao aumento da expressão de receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> (Marchant, Brown e Sernia, 1993; Sernia *et al.*, 1993; Kobori, Ichihara, Suzuki,

Miyashita, *et al.*, 1997). Além disso, o HT parece ter uma ação importante sobre a geração, secreção e degradação de Ang II sintetizados localmente, que estão diretamente associadas com a modulação da hipertrofia dos cardiomiócitos (Aras *et al.*, 2007).

No coração, a maioria dos efeitos patológicos como fibrose e hipertrofia associados SRA são induzidos pela Ang II e mediado pelo receptor AT<sub>1</sub> (Bader e Ganten, 2008) ativando várias proteína-quinases intracelulares envolvidos no desenvolvimento de hipertrofia, como os membros da família das MAPK, S6 quinase (p70S6K), as várias isoformas da proteína quinase C (PKC), e Akt (Schluter e Wenzel, 2008). Alguns experimentos foram capazes de demonstrar a participação desse sistema, onde o bloqueio dos receptores AT<sub>1</sub> ou inibição da atividade da ECA foi capaz de prevenir ou até mesmo atenuar a hipertrofia induzida pelo HT (Kobori, Ichihara, Suzuki, Takenaka, *et al.*, 1997; Asahi *et al.*, 2001; Basset *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2003; Pantos *et al.*, 2005). Além disso, outro receptor de angiotensina (AT<sub>2</sub>) parece também estar diretamente envolvido com a hipertrofia induzida pelo HT, e possivelmente isso acontece pela sua mediação sobre os níveis de TGF-β1 (Diniz, Carneiro-Ramos e Barreto-Chaves, 2007), o qual é caracterizado como um fator de crescimento pertencente a superfamília das citocinas envolvidos diretamente com o crescimento, diferenciação e proliferação celular (Purnomo *et al.*, 2013).

Os níveis elevados de HT parecem ser capazes de induzir aumento de Ang II no coração, favorecendo a hipertrofia dos cardiomiócitos, já que o silenciamento de AT<sub>1</sub>, o principal receptor para Ang II, leva a redução da hipertrofia induzida por HT, bem como, uma redução da atividade da via de sinalização Akt/ GSK3-β/ mTOR (Diniz, Carneiro-Ramos e Barreto-Chaves, 2009).

Barreto-Chaves *et al.* (2010) descreveram a importância de um novo componente do SRA intracardiaco, a Ang 1-7, seu receptor Mas e a enzima responsável por promover a conversão de Ang II em Ang 1-7, a enzima conversora de Ang II (ECA<sub>2</sub>), sugerindo fortemente a participação do eixo ECA<sub>2</sub>/ Ang 1-7/Mas como mecanismo contra-regulatório do eixo principal do SRA, ECA/ Ang II/AT<sub>1</sub> no processo hipertrófico estimulado pelos HT. Contudo, nenhuma evidencia na literatura até o presente momento demonstrou esse efeito.

## 2.6 O *knockout* para $\beta$ 1-AR como modelo experimental

As diferenças funcionais dos  $\beta$ -ARs foram reveladas pela primeira vez pelo pesquisador Ahlquist em 1948 (Ahlquist, 1948). Passados vinte anos desde a demonstração dos  $\beta$ -AR houve a classificação farmacológica das suas isoformas ( $\beta$ 1-AR e  $\beta$ 2-AR) (Rohrer, 1998). Já na década dos anos 1990 os pesquisadores já reconheciam a função e existência dos diferentes  $\beta$ -ARs ( $\beta$ 1-AR,  $\beta$ 2-AR e  $\beta$ 3-AR) no coração. Contudo, a especificação de cada um desses receptores foi definida farmacologicamente usando compostos seletivos para cada um deles, e já existiam evidências que esses fármacos não possuíam seletividade absoluta. Então, pela incapacidade de isolar farmacologicamente as diferentes isoformas dos  $\beta$ -AR, especialmente em tecidos onde mais de um tipo de receptor é expresso, torna-se muito complicado atribuir funções específicas que são sutis para cada isoforma de  $\beta$ -AR *in vivo*, devido a função distinta de cada um deles (Rohrer *et al.*, 1996; Rohrer, 1998).

A deleção para receptores  $\beta$ -adrenérgicos foi realizado de maneira evidente pelo Dr. Daniel Rohrer que pertencia ao grupo do Dr. Brian Kobilka na universidade de Stanford (Rohrer *et al.*, 1996). Pois já era bem sedimentada por diversos pesquisadores a necessidade de estudos que envolvessem alterações transgênicas, os quais seriam instrumentos importantes para o entendimento da farmacologia e função dos  $\beta$ -AR, além de determinação das cascatas de sinalização em que eles estariam envolvidos e principalmente como uma plataforma experimental para conceber novas intervenções terapêuticas para se alcançar a cura de várias doenças (Rohrer *et al.*, 1996; Rohrer, 1998).



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 *Objetivos Gerais*

O propósito deste trabalho foi verificar a participação do  $\beta$ 1-AR na mediação das vias de sinalização biomoleculares ativadas pela hipertrofia cardíaca induzida pelo  $T_3$  em camundongos.

#### 3.2 *Objetivos Específicos*

*Em camundongos albinos tratados com  $T_3$ :*

- Investigar a ativação do sistema renina-angiotensina cardíaco na mediação da resposta hipertrófica ao  $T_3$ .
- Estudar o papel da modulação do sistema nervoso autônomo simpático, através da variabilidade da frequência cardíaca, na mediação da hipertrofia cardíaca induzida pelo  $T_3$ .

*Em camundongos knockout para  $\beta$ 1-AR tratados com  $T_3$ :*

- Avaliar o papel do  $\beta$ 1-AR na hipertrofia cardíaca induzida pelo  $T_3$ , tanto do ponto de vista funcional como morfológico por meio de ecocardiografia e anatomopatologia.
- Identificar as possíveis diferenças na ativação do sistema renina-angiotensina plasmático e cardíaco em resposta hipertrofia cardíaca induzida pelo  $T_3$ ;
- Avaliar os níveis hormonais do peptídeo natriurético atrial (ANP) plasmático e cardíaco em resposta hipertrofia cardíaca induzida pelo  $T_3$ ;
- Identificar as principais vias celulares moduladas pelo  $\beta$ 1-AR na hipertrofia cardíaca induzida pelo  $T_3$ .

#### 4. JUSTIFICATIVA

A pesquisa básica utilizando modelos animais tem um potencial muito grande de fornecer substratos importantes para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos em diversos tipos de doenças. Além disso, esse conhecimento propicia o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que garantam uma melhor sobrevida e talvez até a cura de determinadas enfermidades. Portanto, o presente trabalho se justifica pela grande controversa observada na literatura científica a respeito dos mecanismos biomoleculares envolvidos na hipertrofia cardíaca induzida pelo hipertireoidismo.

Neste propósito, o objetivo principal deste trabalho foi identificar a importância da participação do  $\beta$ 1-AR no modelo de hipertrofia cardíaca induzida pela administração de  $T_3$  em camundongos. Além disso, poucos estudos *in vivo* descritos na literatura buscaram avaliar a interação dos  $\beta$ 1-ARs no modelo de hipertrofia induzida pelo hormônio tireoidiano, tornando o presente trabalho um dos únicos nessa direção até o presente momento. Para tal fim, foram utilizados animais transgênicos com deleção da expressão de  $\beta$ 1-ARs *in vivo*, técnica esta que representa uma ajuda para ultrapassar algumas limitações inerentes a manipulações puramente farmacológicas ou *ex vivo* desses receptores.

O foco principal do presente trabalho foi detalhar as principais vias e mecanismos que medeiam essa hipertrofia, além de observar se o fenômeno hipertrofico acontece de forma direta pelas ações genômicas e não-genômicas do  $T_3$  ou se esse fenômeno é mediado pela estimulação dos sistemas simpático via  $\beta$ 1-AR e/ou renina-angiotensina cardíaco.

Sendo assim, a compreensão das interações e/ou alterações funcionais, bioquímicas e moleculares que ocorrem nos diferentes tipos de hipertrofia cardíaca poderia auxiliar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que sejam amplamente efetivas para o tratamento de doenças que promovam insuficiência cardíaca ou qualquer outro tipo de fenômeno cardiopatológico, que altere a expressão e síntese de proteínas envolvidas na regulação estrutural ou funcional do coração.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa seguiu as normas e conceitos éticos da Comissão de Ética na Pesquisa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (COMEP). O projeto foi aprovado pela comissão sob o seguinte protocolo: (207/2012). Além disso, todas as manipulações experimentais foram executadas de acordo com o “*Guide for the Use of Laboratory Animals*”, publicado pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (*NIH Publication No. 85-23, revised 1996*) e de acordo com a Lei número 11794 de 8 de Outubro de 2008.

Deve ser destacado que todos os esforços foram feitos a fim de minimizar o sofrimento e proporcionar bem estar de todos os animais utilizados nesse estudo.

### 5.1 Animais

#### 5.1.1 Primeira Etapa: Caracterização da hipertrofia induzida por $T_3$ .

Camundongos adultos machos (8-12 semanas) da linhagem Swiss-Webster (n = 40, PC =  $43,17 \pm 1.0$  g) foram obtidos do biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCFis) da UFRuralRJ, e permaneceram em sala climatizada com controle de claro-escuro (12 horas por período) em caixas contendo no máximo 10 animais com água e ração *ad libitum*.

#### 5.1.2 Segunda Etapa: Caracterização do $\beta_1$ -AR na hipertrofia cardíaca.

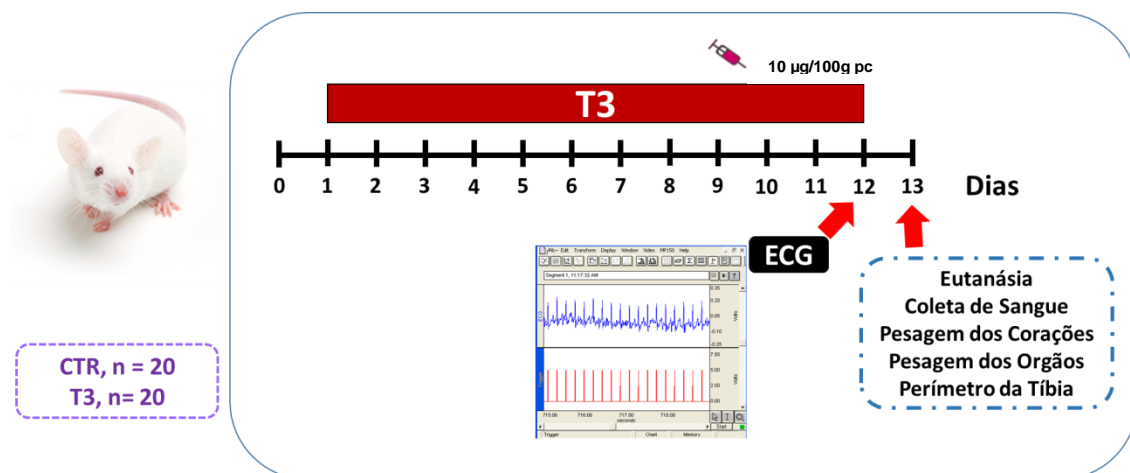
Nessa etapa foram utilizados camundongos machos adultos (16 semanas) selvagens (n= 16; PC =  $28,1 \pm 0,6$ g) e animais *knockout* para  $\beta_1$ -AR ( $\beta_1$ KO<sup>-/-</sup>) previamente genotipados da linhagem C57BL/6J (n = 13; PC =  $31,5 \pm 0,9$  g) fornecidos pelo biotério da Universidade de São Paulo (USP), cedidos pela professora Patricia Chakur Brum. Todos os animais após chegarem ao biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro permaneceram em sala climatizada ( $\pm 22^\circ\text{C}$ ) com controle do ciclo claro-escuro (12 horas por período). Todos os animais foram alocados entre 3-5 animais por caixa, com água e ração *ad libitum*.

## 5.2 Protocolo Experimental

A sequência geral de procedimentos dos protocolos experimentais está descrito em cada subitem dessa seção e todos os métodos e aparatos técnicos aplicados em ambos as etapas do estudo estarão descritas nos itens seguintes.

### 5.2.1 Protocolo experimental da primeira etapa

Os animais foram submetidos ao protocolo de injeção de  $T_3$  por via intraperitoneal ( $10 \mu\text{g}/100\text{g}$  de PC/dia) durante 12 dias ( $n = 20$  animais), e outro grupo serviu de controle, os quais receberam salina 0,9% no mesmo volume ( $0,1 \text{ mL}/\text{dia}$ ), durante o mesmo período de 12 dias ( $n = 27$ ). A dose utilizada nesta fase para induzir hipertrofia cardíaca em camundongos foi a mesma utilizada no trabalho de Silveira *et al.* (2014). Ao final do experimento foi realizada a eletrocardiografia com de eletrodos de espuma (ECG), da onde se originou tacogramas de cada animal para investigação da variabilidade da frequência cardíaca (VFC), descrito pela primeira vez no estudo de Silveira *et al.* (2014). Deve ser destacado que ECG com eletrodo de espuma foi idealizado para evitar que qualquer tipo de perfuração ou pequenas inflamações causadas pelo arame condutor utilizado no eletrocardiograma padrão pudesse interferir os resultados. No dia posterior ao ECG foi realizada a eutanásia para avaliações *post-mortem*. A coleta do sangue foi realizada por decapitação para posterior dosagem dos níveis séricos de  $T_3$ . O coração foi coletado e pesado e o tecido congelado para as dosagens hormonais posteriores e as tíbias direitas foram medidas em cm para a obtenção do peso relativo do coração (Figura 13).



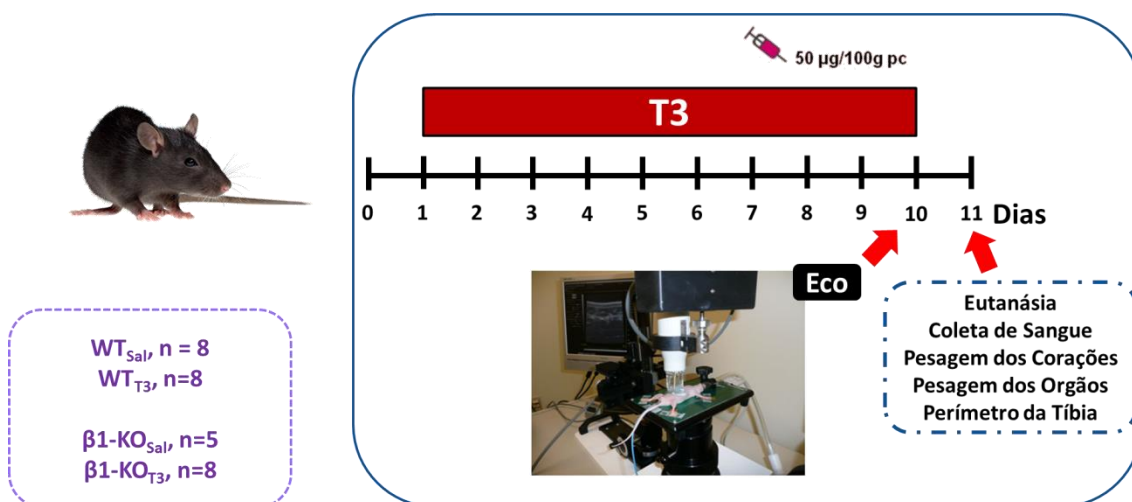
**Figura 13:** Representação do protocolo experimental utilizado na primeira etapa de caracterização do modelo de hipertrofia induzida pelo T<sub>3</sub>.

### 5.2.2 Protocolo experimental segunda etapa

Nesta etapa, os animais selvagens (controles) e experimentais (*knockouts* para  $\beta$ 1-AR) foram submetidos a injeções subcutâneas (s.c.) de triiodotironina (T<sub>3</sub>) (T<sub>3</sub>; Sigma, St Louis, MO, USA), durante 10 dias, na dose de 50  $\mu$ g/100g de PC/dia (WT<sub>T<sub>3</sub></sub> = 8 e  $\beta$ 1KO<sub>T<sub>3</sub></sub> = 8 animais). Este protocolo de dose foi baseado em estudos anteriores do nosso grupo (Império, 2013) e de outros (De Picoli Souza e Nunes, 2014). Já os animais do grupo controle receberam somente veículo (salina 0,9%) durante o mesmo período (WT<sub>Sal</sub> = 7 e  $\beta$ 1KO<sub>Sal</sub> = 5 animais). Deve ser destacado ainda que o mesmo volume (0,1 mL/dia) foi injetado em ambos os grupos, semelhante ao que foi realizado no trabalho de Silveira *et al.*, (2014). As administrações foram realizadas sempre nos mesmos horários (~ 09h00min). O T<sub>3</sub> foi preferido em relação à tiroxina (T<sub>4</sub>), por ele não requerer ativação por desidases, especialmente no tecido cardíaco, o que poderia representar um fator de interferência nos resultados devido à comparação entre animais *knockout* e selvagens.

Ao final do experimento foi realizada análise ecocardiográfica (Eco), para investigação das características anatômicas e funcionais de cada grupo de animais. No dia posterior ao Eco foi realizada a eutanásia para avaliações post-mortem. A coleta do sangue foi realizada por decapitação para posterior dosagem dos níveis séricos de Ang I, Ang II e ANP. Os corações foram coletados e pesados e o tecido congelado para as dosagens hormonais e

avaliação das proteínas celulares, e as tíbias direitas foram medidas em cm para a obtenção do peso relativo do coração (Figura 14).



**Figura 14:** Representação do protocolo experimental utilizado na etapa de caracterização da participação do  $\beta 1$ -AR modelo de hipertrofia induzida pelo  $T_3$ . A figura mostra a realização do exame ecocardiográfico no centro nacional de bioimagens (CENABIO II) da UFRJ em parceria com o prof. Antônio Carlos Campos de carvalho.

### 5.3 ECG - Estudo do balanço simpato-vagal cardíaco por meio das análises da variabilidade da frequência cardíaca e espectral.

Vinte e quatro horas antes da avaliação eletrocardiográfica, os animais foram anestesiados com éter etílico e tricotomizados em toda a extensão torácica, sendo acoplado, a cada hemitórax, um eletrodo de espuma (3M do Brasil, Ltda., Sumaré-SP, Brasil) de aproximadamente 1,0 cm de diâmetro. Momentos antes do registro foram conectados ao sistema de aquisição de dados do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFRRJ (Amplifier 3A9, TEKTRONIX/TL-2 Interface, Bearverton, OR, USA; ADInstruments, Castle Hill, NSW, Australia), para o registro do ECG. Os sinais foram adquiridos em frequência de 13 KHz e amplitude com resolução de 12 bits e, para a visualizações e análise dos registros, foi utilizado o software *AcqKnowledge* versão 3.8.1 (Biopac Systems Inc., Goleta, CA, USA).

Para análise espectral, foram realizados registros de 10 minutos cada. Todo o processamento dos sinais da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) foi realizado utilizando algoritmos baseados em Matlab (Silveira *et al.*, 2014) do software *Cardioseries* versão 1.1 (available at <http://www.sites.google.com/site/cardioseries/home>). Após a detecção do pico

de onda R, foram produzidos tacogramas de 600 segundos, contando todas as flutuações cardíacas dentro deste período de tempo (Silveira *et al.*, 2014). No domínio do tempo, os índices adquiridos foram os seguintes: média do intervalo R-R, desvio padrão dos intervalos RR, raiz quadrada das diferenças da média quadrada dos intervalos RR sucessivos (Silveira *et al.*, 2014). Para a análise espectral da VFC (domínio da frequência), os tacogramas foram redimensionados para intervalos iguais, pelo método de interpolação cúbica, em uma frequência de 13 Hz, e a tendência linear foi removida (Aubert *et al.*, 1999; Pereira-Junior *et al.*, 2006). O espectro de potência foi obtido com uma decomposição rápida baseada no método de Fourier (periodograma de Welch: 256 pontos, 50% de sobreposição, e janela Hamming). Duas bandas de frequência foram determinadas: baixa frequência (LF: 0,1-1,0 Hz), e alta frequência (HF: 1,0-5,0 Hz) e a potência foi estimada como área sob o espectro dentro dessas amplitudes de frequência (Silveira *et al.*, 2014).

#### 5.4 Avaliação da função cardíaca por ecocardiograma

O objetivo do uso de tal ferramenta foi analisar a geometria cardíaca e a função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo. A análise da geometria cardíaca foi feita por meio da utilização do modo bidimensional para a mensuração da área das cavidades ventriculares direita e esquerda ao final da diástole em corte transversal no nível dos músculos papilares. Para a realização do ecocardiograma, os animais foram anestesiados com gás isoflurano 2% em um fluxo de 1L/min de oxigênio, tricotomizados na região do precórdio e examinados com o aparelho Vevo 770<sup>®</sup> *High-Resolution Imaging System* (VisualSonics, Ontário, Canada) com transdutor de 30 MHz. Este aparelho foi desenvolvido exclusivamente para pequenos animais, portanto possui qualidade superior para realização dessas avaliações em estruturas tão pequenas.

Todas as análises foram medidas em milímetros. A determinação da função sistólica do ventrículo esquerdo foi estabelecida através da análise da fração de ejeção o qual foi calculada pelo método de Simpson. Este método consiste na delimitação, com auxílio de um cursor, de toda a cavidade ventricular esquerda em sístole e em diástole de quatro cortes transversais (da base ao ápice) e um longitudinal (da saída da aorta ao ápice). O aparelho

então calcula automaticamente o volume sistólico e o volume diastólico final fornecendo a fração de ejeção. Os animais foram avaliados ao final do protocolo de tratamento, e todos foram avaliados no período entre 08 e 12:00 horas. Os parâmetros ecocardiográficos avaliados e que serão mostrados na sessão dos resultados foram: ESIVd – espessura do septo interventricular em diástole (mm); DDFVEd – diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo em diástole (mm); ERSIVd – espessura relativa do septo interventricular em diástole; Massa corrigida do VE – massa corrigida do ventrículo esquerdo (g), Fração de ejeção do VE – fração de ejeção do ventrículo esquerdo (%).



**Figura 15:** Imagem representativa do equipamento de ecocardiograma para camundongos utilizado no presente estudo.

## 5.5 Análises Hormonais

### 5.5.1 Preparação para as análises hormonais sanguíneas.

O sangue foi colocado em três tubos contendo inibidores de peptidases para as dosagens de ANP, Ang I e II. Esses inibidores são basicamente constituídos de benzoato p-hidroximercurio (1 mM), 10-fenantrolina (30 mM), PMSF (1 mM), pepstatina A (1 mM), EDTA 10% sendo todo procedimento realizado sobre gelo. O plasma foi obtido após centrifugação (20 minutos, 3000 rotações/min a 4 °C) e estocado a -20 °C, até o momento dos procedimentos padrões para realização da mensuração por técnicas específicas.

### 5.5.2 Extração dos Hormônios ANG I, ANGII e ANP.

Inicialmente deve ser destacado que todos os procedimentos de extração hormonal foram realizados sobre gelo. Nesta extração foram utilizados 1 mL de plasma que foi imediatamente acidificado com 2 mL de TFA.



Já para a extração dos mesmos hormônios no tecido-específico, cerca de 10 mg de tecido cardíaco correspondente a região do ápice foi macerada e também acidificado 2 mL de TFA. As extrações de ANP, Ang I e II foram realizadas em colunas Bond-Elut (Peninsula Laboratories, CA, EUA). Essas colunas foram submetidas a uma pré-ativação com 4 mL de uma solução de acetonitrila a 60% (Merck, EUA) diluída em TFA 0,1% (solução A) seguido de 20 mL de TFA 0,1% (solução B). Após esse procedimento as amostras de plasma foram colocadas individualmente nas colunas e diluídas novamente com mais 20 mL de solução B. Os peptídeos absorvidos foram então diluídos em 3 mL de uma solução a 60% de acetonitrila em TFA 0,1%, sendo coletados em tubos com dimensões 12 x 75 mm e liofilizados. No momento do ensaio, o liofilizado foi ressuspenso em 400 µl de tampão de ensaio.

#### *5.5.3 Eficiência da Extração dos Hormônios*

Para determinar a eficiência da extração dos hormônios pelos métodos utilizados, uma quantidade de (~ 25.000 cpm) do peptídeo marcado (com <sup>125</sup>I) foi adicionada à 1 mL de plasma, o qual foi submetido às extrações, como descrito acima. Os sobrenadantes e os precipitados, gerados em cada uma das etapas da extração, foram analisados no contador gama e, a partir dos valores de suas radioatividades obtidas, foi calculada a proporção do hormônio recuperado no final do processo de extração. A extração foi considerada eficiente quando a porcentagem de recuperação do hormônio marcado foi acima de 80%. Os anticorpos específicos para Ang I e II foram obtidos a partir da Peninsula Inc. (San Carlos, CA, USA; Ang I: T4166; Ang II: T4007), e para ANP foi gentilmente cedido por Jolanta Gutkowska (Hotel Dieu, University of Montreal, Canada).

#### *5.5.4 Radioimunoensaio*

Todas as dosagens hormonais foram realizadas através de radioimunoensaios específicos para T<sub>3</sub>, ANP, Ang I e Ang II (Vecsei, 1979; Gutkowska *et al.*, 1984; Botelho *et al.*, 1994; Haanwinckel *et al.*, 1995; Elias, Elias e Moreira, 1998). Todos os ensaios/dosagens foram realizados em duplicata. Inicialmente deve ser salientado que a metodologia descrita acima está implementada e tem sido rotineiramente utilizada no laboratório de

Neuroendocrinologia Básica e Aplicada do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP. A sensibilidade da radioimunoensaio e os coeficientes de variabilidade intra e inter-testes foram, respectivamente, 1,2 pg/mL, 8,1% e 8,7% para Ang I, 0,39 pg/mL, 6,7% e 8,7% para Ang II e 0,7 pg/mL, 4,9% e 7,8% para a ANP.

#### 5.6 Avaliação indireta da hipertrofia cardíaca

O peso do coração foi obtido em miligramas e normalizado pelo comprimento da tíbia em centímetros, que foi medida através do instrumento paquímetro. Desta forma, obteve-se o peso relativo do coração, que permitiu avaliar a hipertrofia cardíaca (Cohen, Aroesty e Rosenfeld, 1966; Otten *et al.*, 1986; Sjaastad *et al.*, 2000; Mircoli *et al.*, 2002; Van Dijk-Ottens *et al.*, 2010).

#### 5.7 Análise Histopatológica

Após a eutanásia dos animais por decapitação, os corações foram removidos, secos em papel filtro e pesados. Para propósito da análise histológica, os corações foram cortados transversalmente ao nível dos músculos papilares de ambos os ventrículos, e os tecidos foram fixados em bouin. Posteriormente, as amostras foram desidratadas por gradiente crescente de etanol (Vetec) (80/100/100%), por 50 min cada, diafanizados em xilol (Vetec) por duas vezes e impregnadas com parafina a 60°C (parafina histológica; Pró-Cito<sup>®</sup>, Porto Alegre, RS, Brasil), em 2 banhos de 50 minutos cada. Foram realizados cortes no micrótomo (RM 2125 RT, Leica) com espessura de 4 µm para a coloração de hematoxilina e eosina, e de 8 µm para a coloração de Picrosirius modificado (Dolber e Spach, 1993). As colorações por hematoxilina e eosina (H&E) e Picrosirius foram realizadas após a desparafinização e hidratação do material com três banhos de xilol com duração de 15 min cada e álcoois em concentrações decrescentes (100/ 100/ 90 / 80 / 70%), por 5 min cada. As lâminas foram lavadas em água destilada por duas vezes, por 5 minutos. Parte das lâminas foram coradas com hematoxilina (Vetec) por 8 min, posteriormente lavadas em água corrente e rapidamente em álcool clorídrico (álcool etílico a 99,5% (Vetec) 940 mL/L, ácido clorídrico PA (Vetec) 20 mL/L, água deionizada 40 mL) e depois lavadas novamente, por 5 minutos em água corrente e água destilada. As lâminas

foram mergulhadas por 3 minutos em eosina (Vetec) e lavadas em água destilada e corrente por 5 minutos.

A hematoxilina e eosina coram o núcleo da célula com a cor azul e o citoplasma celular e a matriz extracelular em tons avermelhados, respectivamente. Esta coloração permite a observação do diâmetro dos cardiomiócitos. A outra parte das lâminas foi corada com picrossirius e teve por objetivo permitir a análise de regiões com aumento da deposição de colágeno e de tecido íntegro. As lâminas foram colocadas em ácido pícrico (Sigma) saturado por 1 hora, lavadas em água corrente e destilada por 10 min. Posteriormente, as lâminas foram colocadas na solução de ácido fosfomolibidico 0,2% (Vetec), por 1 min. Após esse tratamento, as lâminas foram imersas na solução de picrossirius (Vetec) por 90min. Depois as lâminas foram mergulhadas em ácido clorídrico (Vetec) por 2 min e lavadas em água corrente e água destilada por 5 minutos. Após o processo de coloração, todas as lâminas foram banhadas em álcoois em concentrações crescentes (70/100/100/100 %) e em três banhos de xilol puro, todos por um período de 5 minutos. Finalmente, as lâminas foram montadas em resina sintética Entellan<sup>®</sup> (Merck, Darmstadt, Alemanha).

As imagens foram obtidas utilizando um microscópio de luz (Axiovert 100; Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplado a uma câmera digital Olympus, utilizando ampliação 40x. As imagens foram analisadas utilizando o software ImageJ (disponível em <http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) com uma resolução de 2272 × 1704 pixels.

Para a determinação do diâmetro dos cardiomiócitos foram utilizados 3 corações por grupo de animais, onde avaliou-se 8 campos por corte, com captura de 10 células por campo, obtendo-se em média 80 a 90 cardiomiócitos de cada coração para o cálculo das médias de cada campo, onde a variância máxima aceita foi de 2%). Além disso, os cardiomiócitos deveriam atender a duas características fundamentais para que fossem mensurados: o seu corte teria que apresentar o núcleo central e a presença de uma membrana celular íntegra. Dessa forma, o diâmetro foi determinado, delimitando-se uma linha reta de um ponto da membrana plasmática para o lado oposto passando pelo centro do núcleo, de acordo com Grimm *et al.* (1998).

Com o objetivo de evidenciar fibrose foram utilizados os mesmos cortes, porém com coragem dos cortes por picrossirius com ampliação de 20x. Todavia, os dados obtidos após análise dos cortes não demonstraram áreas de fibrose, não sendo necessário o cálculo da área da mesma.

Além disso, todas as medidas morfométricas foram realizadas por dois investigadores independentes (RL, AS), de maneira cega tanto para os grupos quanto para a modalidade de tratamento. A variabilidade foi avaliada através da realização de análises repetidas e foi calculado como variação aceitável de 1% intra-avaliador e 3% inter-avaliadores. Para análise dos dados foram utilizados os cinco campos com medidas mais estáveis para evitar contaminação dos resultados por alta variação.

#### 5.8 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na Presença de SDS (SDS-PAGE)

Os corações de camundongos dos diferentes grupos experimentais foram homogeneizados em Politrom contendo Tris (50 mM, pH 7,4), NaCl (150 mM), EDTA (1 mM), Triton X-100 (1%), deoxicolato de sódio (1%), solução de dodecil sulfato de sódio (SDS, 1%), acrescido de inibidores de proteases [aprotinina (5 µg/mL), leupeptina (1 µg/mL), fluoreto de fenilmetil sufonil (PMSF, 1 mM)] e de fosfatases [ortovanadato de sódio (10mM), fluoreto de sódio (100 mM) e pirofosfato de sódio (10 mM)].

O homogenado foi centrifugado a 21000 g, 4°C, durante 20 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a quantificação de proteínas totais pelo método de Lowry *et al.* (1951) e posteriormente para determinação do conteúdo proteico por *Western blot*. A uma alíquota de sobrenadante foi adicionado tampão da amostra contendo SDS (4%), Tris-HCl (125 mM), glicerol (20%), DTT (100 mM), azul de bromofenol (2%, pH 6,8). A eletroforese em gel de SDS-PAGE foi realizada de acordo com o método descrito por Laemmli *et al.* (1970). As amostras foram aquecidas a 100°C por 4 minutos e aplicadas em sistema de mini-gel vertical (modelo Protean III Cell BioRad®) de acrilamida:bisacrilamida com 0,75 mm de espessura e gel de separação de 10 a 18% de acordo com a proteína analisada. Foi utilizado padrão de peso molecular da Fermentas® contendo proteínas de 10-170 kDa. As corridas eletroforéticas foram realizadas em cubas de acrílico contendo tampão de

corrida [Tris-HCl (25 mM e pH 8,4), glicina (115 mM), SDS (0,1%)], sob voltagem de 90 Volts, durante 4 horas.

### 5.9 Western Blot

Após a corrida eletroforética, o gel foi preparado para a transferência (BioRad<sup>®</sup> Trans-Blot SD Cell, CA, EUA) de acordo com o método descrito por Towbin et al. (Towbin, Staehelin e Gordon, 1979). Inicialmente, o gel e a membrana de nitrocelulose (NC) foram colocados na solução de transferência contendo Tris (48 mM), glicina (39 mM), SDS (10%) e metanol (0,2 M), pH 7,4. Após a montagem do sistema de transferência, as proteínas presentes no gel de poliacrilamida foram transferidas para a membrana NC, sendo o processo de transferência realizado durante 30 minutos sob a voltagem fixa de 20 volts, à temperatura ambiente. Após o término da transferência, a membrana de NC foi submetida a immunoblot, sendo incubada por 1 hora, sob agitação, à temperatura ambiente em solução de leite desnatado em pó 10%, diluído em solução TBS-T contendo Tris-HCl (0,02 M), NaCl (0,16 M) e Tween 20 (0,1%), pH 7,4. Após o bloqueio, a membrana foi incubada durante 12 horas a 4°C com anticorpos primários de coelho das seguintes proteínas analisadas: substratos fosforilados pela PKA (1:1000, Cell Signaling<sup>®</sup>, MA, EUA), ERK1/2 p-Thr202/Tyr204 (1:1000, Cell Signaling<sup>®</sup>, MA, EUA), P38 p-Thr180/Tyr182 (1:1000, Cell Signaling<sup>®</sup>, MA, EUA), 4EBP1 p-Thr70 (1:1000, Cell Signaling<sup>®</sup>, MA, EUA), enzima conversora de ANG 1 (1:1000, abcam<sup>®</sup>, EUA) e anticorpo primário de camundongo para a proteína  $\beta$ -actina (1:3000, Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup>, CA, EUA). As diluições dos anticorpos primários foram realizadas em solução de TBS-T contendo 2,5% de albumina bovina sérica e 0,01% de azida sódica. Os anticorpos foram retirados e as membranas devidamente lavadas com solução de TBS-T, posteriormente incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário anti-IgG ligado à peroxidase (anti-IgG de coelho, diluição de 1:5000 em TBS-T ou anti-IgG de camundongo, diluição de 1:5000 em TBS-T). Após a lavagem das membranas para remoção do excesso de anticorpo secundário não ligado, a membrana foi revelada no aparelho ChemiDoc<sup>™</sup> XRS (BioRad<sup>®</sup>, CA, EUA) por aproximadamente 30 minutos após a adição de partes iguais dos reagentes do kit de quimioluminescência amplificada ECL<sup>™</sup> (Amersham Biosciences<sup>®</sup>, NJ,

EUA). As bandas reveladas foram quantificadas por densitometria utilizando o *software* ImageLab™ (BioRad®, CA, EUA). Após a quantificação densitométrica das proteínas, o valor obtido na análise foi dividido pela densitometria da  $\beta$ -actina, proteína constitutiva utilizada como referência em todos os experimentos. Os resultados obtidos foram comparados com os respectivos grupos controles, os quais foram considerados como 100%.

#### 5.9.1 Controles de Carregamento em Western Blot

Para a análise, interpretação e comparação de resultados provenientes de diferentes *Western blots*, é essencial que aja um controle de carregamento da amostra aplicada, pois este controle garante: a mesma quantidade de proteína aplicada em cada poço; a transferência das proteínas, do gel para a membrana, com eficiência igual entre os diferentes poços; A incubação com o anticorpo e detecção do sinal uniforme ao longo dos poços. Entretanto, alguns autores já propuseram a descontinuação da utilização de proteínas como controles de carregamento para a utilização apenas da coloração *Ponceau* das proteínas antes da etapa de transferência (Romero-Calvo *et al.*, 2010). Dessa forma, a combinação do controle de carregamento e coloração *Ponceau* na membrana de transferência é descrito como ideal para um protocolo de *Western blot*, e por isso este procedimento foi utilizado no presente estudo.

## 6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis que apresentaram elevada variabilidade intragrupo, observada através dos valores do desvio padrão, foram normalizadas pela média dos valores dos animais controle. O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado em todas as variáveis analisadas, após as normalizações dos valores, e em caso de distribuição não normal foram utilizados procedimentos estatísticos não paramétricos. Para a comparação das médias intra e entre grupos aplicou-se o teste de análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA), em caso de valor F significativo fez-se a verificação *post-hoc* com o teste de Tukey, para identificar onde ocorreram tais diferenças. Para a comparação de apenas 2 grupos independentes foi utilizado o teste t de Student. Em todos os testes o grau mínimo de significância adotado foi de 95% ( $p < 0,05$ ) ou 99% ( $p < 0,01$ ).

A análise de variância fatorial (*two-way* ANOVA) seria aplicada no tratamento estatístico do presente estudo. Contudo, um dos pressupostos da ANOVA fatorial é a igualdade numérica de dados em todos os grupos, e por esse motivo a *two-way* ANOVA não foi aplicada, para que as chances de cometer erros do tipo II fossem reduzidas durante a análise e interpretação dos dados.

Para a identificação dos dados amostrais com grande dispersão (do inglês *outliers*) aplicou-se o teste descrito por Dixon (Dixon, 1950; 1951; Dixon, 1953), porém no presente trabalho fez uso da tabela atualizada dos valores críticos desse teste (Verma e Quiroz-Ruiz, 2006).

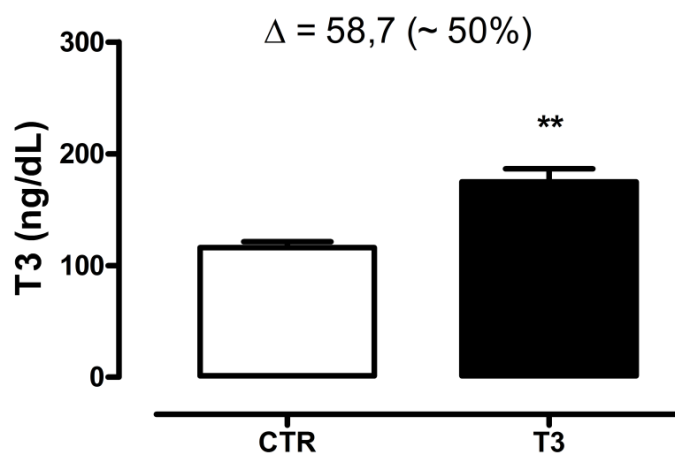
Todos os dados foram descritos como média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM), e todos os cálculos foram realizados pelo software GraphPadPrism® (Versão 6.0, *Graphpad software*, Inc., San Diego, USA).

## 7. RESULTADOS

Além da caracterização morfológica da hipertrofia, se deu ênfase nesta etapa pela investigação da modulação simpática da hipertrofia induzida pelo T<sub>3</sub>. Assim, nesta etapa, nossa hipótese principal era a de que o T<sub>3</sub> não fosse capaz de alterar o balanço simpato-vagal cardíaco. Finalmente, também se avaliou o conteúdo de angiotensina II no coração dos animais para consolidar, como descrito na literatura (Sernia *et al.*, 1993; Kobori, Ichihara, Suzuki, Takenaka, *et al.*, 1997; Diniz, Carneiro-Ramos e Barreto-Chaves, 2007; 2009) e sugerido pelos nossos dados não publicados, a participação do SRA na mediação da resposta hipertrófica induzida pelo T<sub>3</sub>.

### 7.1 Primeira etapa: Caracterização do modelo de hipertrofia cardíaca induzida por T<sub>3</sub>

O tratamento durante 12 dias de administração com T<sub>3</sub> na dose de 0,1 mg/kg) resultou em aumento significativo dos níveis séricos de T<sub>3</sub> total quando comparados ao seu grupo controle (T<sub>3</sub> = 174,8 ± 11,6 ng/dl vs. CTR = 116,1 ± 5,13 ng/dl, p < 0,01, Figura 16).

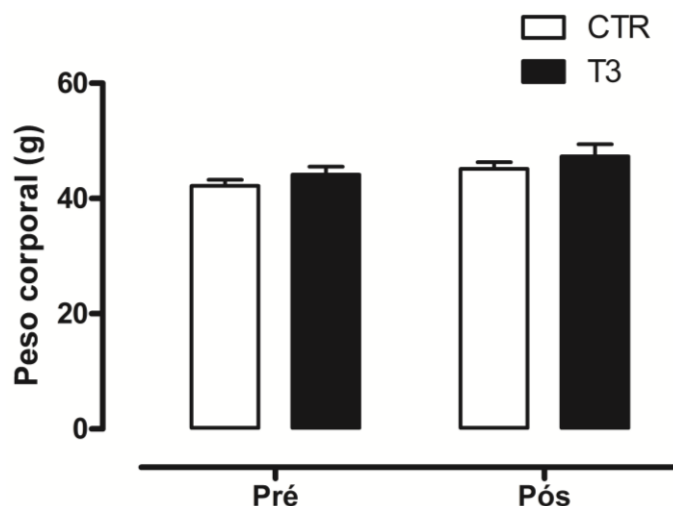


**Figura 16.** Concentração sérica de T<sub>3</sub> total (ng/dl) no grupo de camundongos tratados com T<sub>3</sub> (T<sub>3</sub>, n=20) ou veículo (CTR, n=20). O símbolo sobre a barra indica diferença em relação ao controle CTR (\*\*p < 0,01).

O peso corporal foi acompanhado diariamente e não houve diferença no peso corporal ao longo dos 12 dias de tratamento com T<sub>3</sub> em relação ao seu

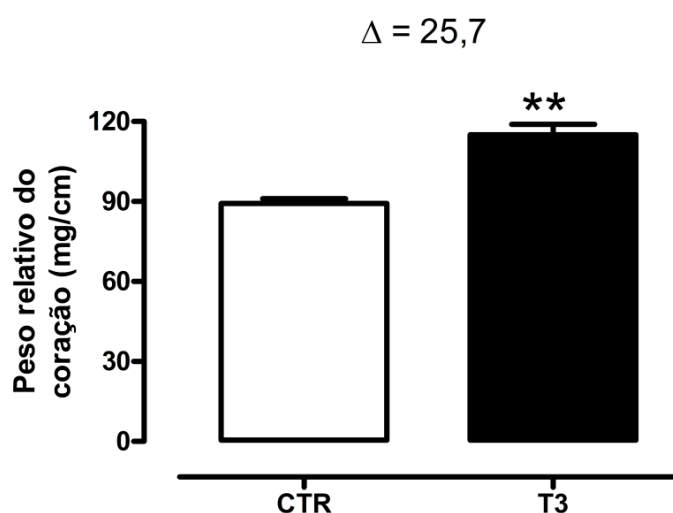


respectivo controle (Figura 17). Corroborando os dados da literatura em protocolo de administração de T<sub>3</sub> com duração de 12 dias (Silveira *et al.*, 2014).



**Figura 17.** Peso corporal do grupo tratado com T<sub>3</sub> (T3, n=20) ou veículo (CTR, n=20). Note que não houve diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

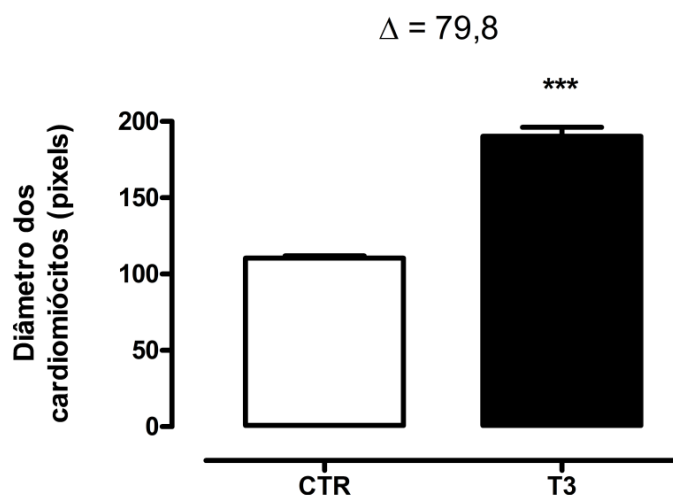
O peso relativo dos corações dos animais 12 dias após o tratamento com T<sub>3</sub> foi significativamente maior quando comparado aos seus grupos controles (T3 = 115,0 ± 3,9 mg/cm vs. CTR = 89,28 ± 1,8 mg/cm,  $p < 0,01$ , Figura 18).



**Figura 18.** Peso relativo do coração (normalizado pelo comprimento da tíbia) no grupo de camundongos tratados com T<sub>3</sub> (T3, n=20) ou veículo (CTR, n=20). O símbolo sobre a barra indica diferença em relação ao controle CTR (\*\* $p < 0,01$ ).

Não houve evidência de fibrose miocárdica nos cortes histológicos dos corações nos grupos estudados, corroborando os resultados do peso relativo

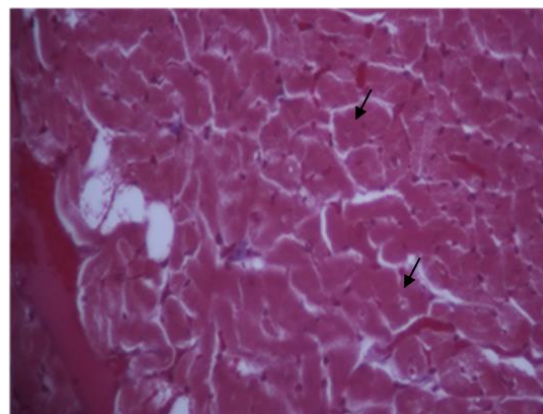
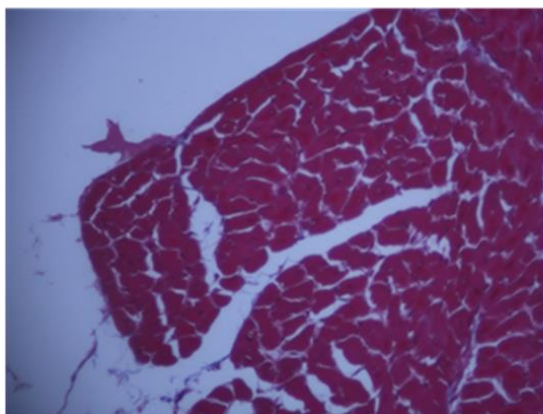
do coração, o diâmetro dos cardiomiócitos apresentou aumento significativo no grupo tratado com T<sub>3</sub> (183,8 ± 6,76 pixels) comparado ao seu controle (118,4 ± 1,94 pixels). Vale ressaltar que o tamanho do efeito foi verificado através do cálculo de variação ( $\Delta = 79,8$  pixels, Figura 19). A Figura 20 mostra o aumento do diâmetro dos cardiomiócitos dos animais tratados em relação aos seus controles.



**Figura 19.** Diâmetro dos cardiomiócitos (pixels) do grupo de animais tratados com o seu respectivo controle, durante 12 dias de tratamento com T<sub>3</sub> (T<sub>3</sub>, n=20) ou salina (CTR, n=20). O símbolo sobre a barra indica diferença em relação ao grupo CTR (\*\*p < 0,001).

Controle

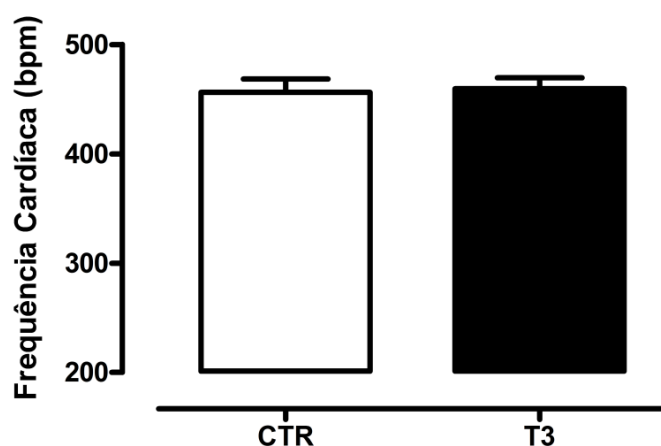
T<sub>3</sub>



**Figura 20.** Fotos de cortes histológicos de músculo cardíaco obtido do ventrículo esquerdo do grupo controle (esquerda) e tratado com T<sub>3</sub> (direita). Note a hipertrofia dos cardiomiócitos mais acentuada no animais tratado com T<sub>3</sub> (setas). Aumento de 40x e coloração HE em ambos os cortes.

A Figura 21 mostra o resultado da mensuração da frequência cardíaca (FC) nos animais acordados, realizada a partir do ECG nos grupos T3 e CTR. Os resultados obtidos foram que a FC encontrada no grupo controle ( $456,18 \pm 12,41$  bpm) foi parecida com o grupo tratado com  $T_3$  ( $459,5 \pm 9,67$  bpm), e portanto, sem nenhuma diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ).

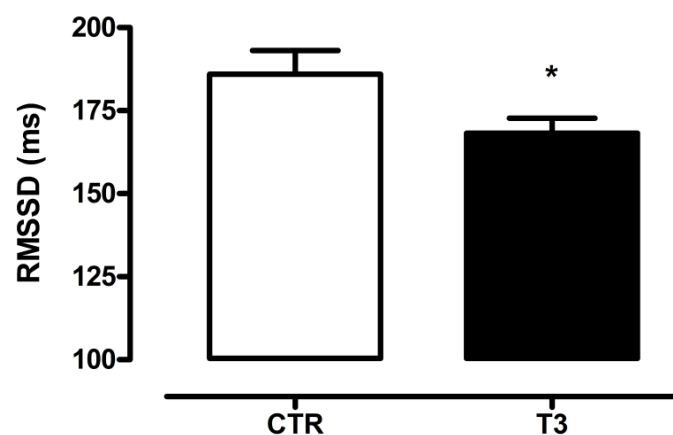
Curiosamente, pode-se concluir preliminarmente que, embora o peso corporal e o cronotropismo não tenham sofrido alterações substanciais, a hipertrofia cardíaca ocorreu em resposta ao protocolo de administração de  $T_3$  utilizado aqui. Pode-se ainda sugerir que, o  $T_3$  neste protocolo, deve exercer efeitos tróficos diretos nos cardiomiócitos, independentemente de seus efeitos no aumento da demanda metabólica. Estudos hemodinâmicos por meio de cateterismo arterial para avaliação dos níveis pressóricos neste modelo contribuirão para confirmar esta hipótese.



**Figura 21.** Mensuração da frequência cardíaca no grupo tratados com  $T_3$  ( $T_3$ ,  $n=20$ ) ou veículo (CTR,  $n=20$ ). Sem diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ).

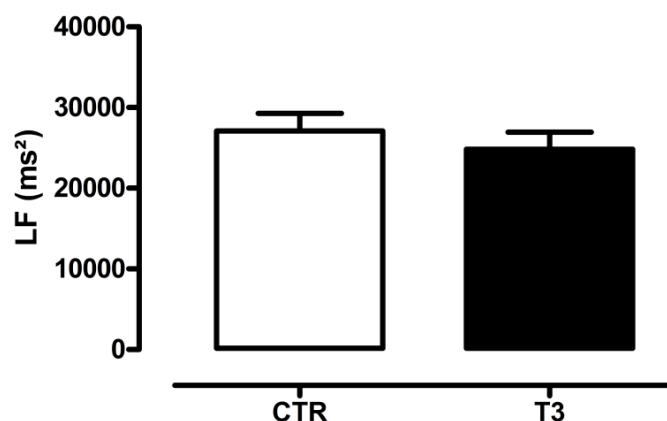
Como descrito anteriormente no início desta sessão, buscou-se investigar a modulação autonômica nos animais tratados com  $T_3$ , corroborar os resultados preliminares do nosso grupo em ratos que indicaram não haver interferência (modulação) autonômica na hipertrofia cardíaca induzida pelo HT. Para tanto, foi feita a análise da variabilidade da frequência cardíaca apresentado na Figura 22. Foram realizadas análises no domínio do tempo, onde o intervalo R-R foi determinado em qualquer ponto no tempo. Essa medida se baseou em simples cálculos estatísticos realizados em um intervalo nas séries de R-R. Foram realizadas análises no domínio do tempo, onde a

frequência cardíaca em qualquer ponto no tempo ou intervalo R-R foi determinada. Essa medida se baseou em simples cálculos estatísticos realizados em um intervalo nas séries de R-R. Como observado, os dados mostraram diminuição significativa na raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre R-R sucessivos (RMSSD) entre o grupo tratado ( $168,24 \pm 4,44$  ms) quando comparado ao seu grupo controle ( $186,014 \pm 7,04$  ms). Essa redução da VFC no grupo tratado sugere que o  $T_3$  leva a redução do tônus parassimpático e/ou aumento do tônus simpático pelo menos em camundongos.



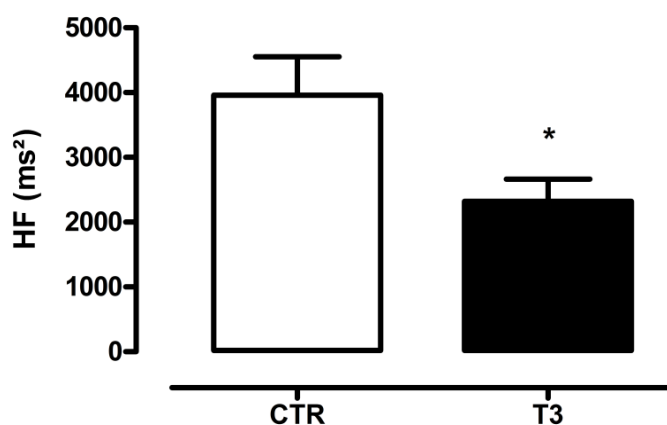
**Figura 22.** Análise da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo através da raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre R-R sucessivos (RMSSD) nos animais tratados com  $T_3$  ( $T_3$ ,  $n=20$ ) ou veículo (CTR,  $n=20$ ). Note a redução do RMSSD que sugere diminuição da modulação parassimpática ou aumento da simpática. O símbolo sobre a barra indica diferença em relação ao controle CTR (\* $p < 0,05$ ).

A Figura 23 mostra a análise espectral das ondas de baixa frequência. A decomposição da frequência no componente oscilatório da onda de baixa frequência (LF) com variação de 0,1 a 0,15 Hz pode ser considerada decorrente de atividade simpática e parassimpática no coração, entretanto sendo o componente simpático predominante (Saul, 1990). Em nosso trabalho a faixa de variação utilizada para essa banda de frequência foi entre 0,1 a 1,0 Hz. Desse modo, não foi identificada qualquer diferença estatística no componente oscilatório de baixa frequência LF entre o grupo controle ( $27085,56 \pm 2183,09$  ms<sup>2</sup>) e o tratado ( $24818,98 \pm 2133,75$  ms<sup>2</sup>).



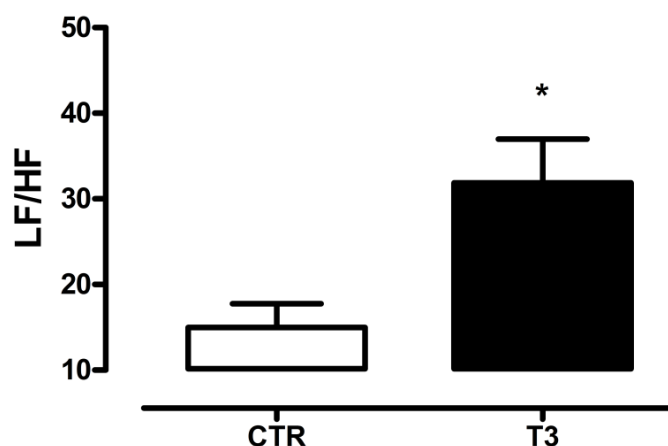
**Figura 23.** Análise espectral da VFC no domínio da frequência, por meio do componente oscilatório LF nos animais tratados (T<sub>3</sub>, n=20) ou veículo (CTR, n=20). Sem diferença estatística significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

A Figura 24 demonstra a mensuração da VFC por meio da decomposição, no domínio da frequência, do componente oscilatório de alta frequência (HF), com variação de HF: 1 a 5 Hz, modulada pelo sistema nervoso parassimpático e gerada pela respiração sendo indicador da modulação do nervo vago no coração (atividade parassimpática) (Furlan *et al.*, 1990). O grupo de animal tratado ( $2322,38 \pm 342,67 \text{ ms}^2$ ) comparado ao controle ( $3959,35 \pm 594,55 \text{ ms}^2$ ) exibiu redução estatística significativa no componente oscilatório de alta frequência (HF). Este achado sugere que o T<sub>3</sub> possa diminuir a atividade vagal nesses animais, corroborando os estudos de Karthik *et al.* (2009) e Silveira *et al.* (2014).



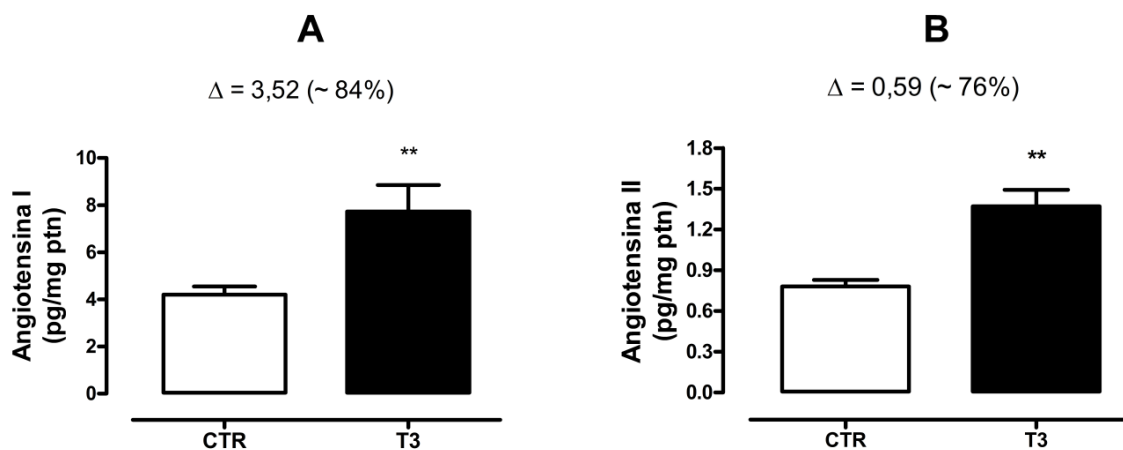
**Figura 24.** Análise espectral da VFC na faixa de alta frequência em camundongos tratados com T<sub>3</sub> (T<sub>3</sub>, n=20) ou veículo (CTR, n=20). O símbolo sobre a barra indica diferença em relação ao controle CTR ( $*p < 0,05$ ).

Analisando a razão LF/HF, que representa o balanço autonômico, simpato-vagal sobre o coração (Vanderlei *et al.*, 2009), pode se notar aumento significativo neste parâmetro no grupo tratado com T<sub>3</sub> ( $31,85 \pm 5,12 \text{ ms}^2$ ) vs. controle ( $14,99 \pm 2,77 \text{ ms}^2$ ) demonstrando que, os níveis séricos de T<sub>3</sub> aumentados alteraram a relação dos espectros, no sentido de uma elevação na razão LF/HF em relação ao grupo controle, sugerindo aumento da modulação simpática para o coração nesses animais quando comparados ao seu controle (Figura 25).



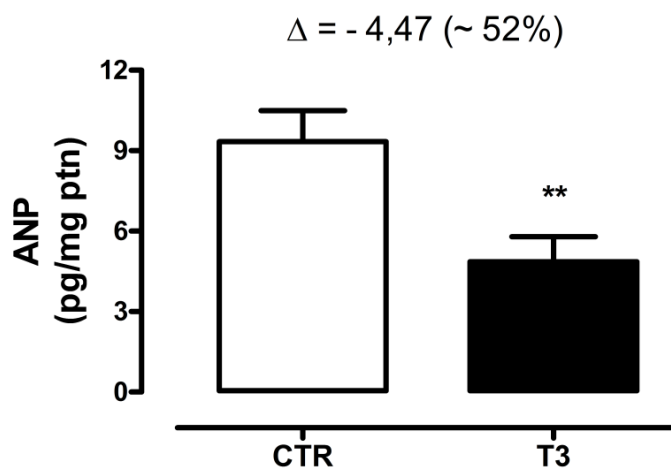
**Figura 25.** Relação dos espectros de baixa e alta frequência no grupo de camundongos tratados com T<sub>3</sub> (T<sub>3</sub>, n=20) ou veículo (CTR, n=20). O símbolo sobre a barra indica diferença em relação ao controle CTR (\*p < 0,05).

Sabendo-se da importância da interação entre o sistema nervoso autonômico e o renina-angiotensina, especulou-se que talvez houvesse diferença na ativação do SRA cardíaco devido as distintas alterações do balanço simpato-vagal em resposta ao T<sub>3</sub> exibidas pelos animais descritas anteriormente. Analisando os conteúdos de Ang I e Ang II cardíaco foi possível observar um aumento significativo de ambas no grupo tratado com T<sub>3</sub> comparado ao seu controle (Ang I =  $7,7 \pm 1,1 \text{ pg/mg ptn}$  vs.  $4,2 \pm 0,4$ ; e Ang II =  $1,4 \pm 0,1 \text{ pg/mg ptn}$  vs.  $0,8 \pm 0,1 \text{ pg/mg ptn}$ , no grupo T<sub>3</sub> vs. controle respectivamente, \*p < 0,05) (Figura 26). Mediante esses dados, possivelmente, a ativação do SRA cardíaco se deu em resposta ao aumento dos níveis séricos de T<sub>3</sub> (Carneiro-Ramos *et al.*, 2010; Diniz, Carneiro-Ramos e Barreto-Chaves, 2010; Silveira *et al.*, 2014).



**Figura 26.** Análise de angiotensina cardíaca no grupo tratado com  $T_3$  ( $T_3$ , n=20) comparado ao controle (CTR, n=20). **A:** Níveis de angiotensina I; **B:** Níveis de angiotensina II. Os símbolos sobre as barras indicam diferença em relação ao controle CTR (\*\* $p < 0,01$ ).

Neste estudo foi avaliado o conteúdo de ANP cardíaco demonstrando que o tratamento com  $T_3$  em comparação ao veículo reduziu a concentração de o ANP ( $T_3 = 4,9 \pm 0,9$  pg/mg de ptn; CTR =  $9,3 \pm 1,2$  pg/mg de ptn, Figura 27).



**Figura 27.** Conteúdo do ANP cardíaco no grupo tratado com  $T_3$  ( $T_3$ , n=20) comparado ao controle (CTR, n=20). O símbolo sobre a barra indica diferença em relação ao controle CTR (\*\* $p < 0,01$ ).

## 7.2 Segunda etapa: Caracterização da participação do $\beta_1$ -AR na hipertrofia cardíaca induzida por $T_3$

Embora não exclua a pouca importância do SNA simpático na hipertrofia cardíaca induzida pelo  $T_3$  em camundongos, podemos concluir que no protocolo utilizado na etapa anterior ocorre aumento da modulação simpática e

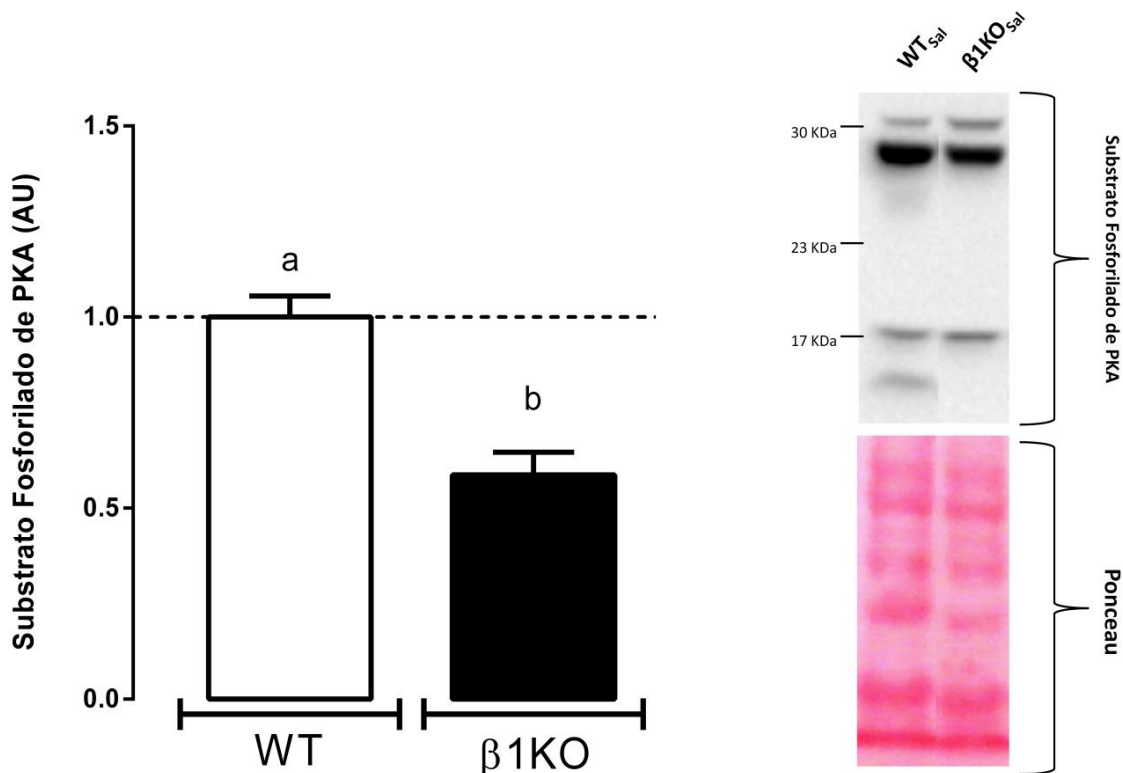
ativação do SRA cardíaco. Portanto a hipótese da não ativação do SNA simpático pelo T<sub>3</sub> neste modelo foi descartada.

Adicionalmente, considerando que a função cardíaca não foi avaliada na etapa anterior, procurou-se investigar nesta etapa, a participação do receptor  $\beta$ -adrenérgico na qualidade (fisiológica vs. patológica) da hipertrofia cardíaca.

Portanto, a hipótese a ser testada neste novo protocolo foi a de que o  $\beta$ 1-AR participa da hipertrofia cardíaca induzida pelo T<sub>3</sub>.

### 7.2.1 Caracterização da via molecular PKA nos animais $\beta$ 1-AR knockout

A via de sinalização clássica mediada pelos  $\beta$ 1-ARs é a ativação da via da PKA. Entretanto, foi verificado que os animais *knockout* para  $\beta$ 1-AR apresentaram redução significativa dos níveis de substratos fosforilados de PKA quando comparados aos animais selvagens ( $\beta$ 1KO= 0,4  $\pm$  0,03 UA vs. WT= 1,0  $\pm$  0,05 UA,  $p < 0,05$ , Figura 28).



**Figura 28:** Nível de substrato fosforilado de PKA em animais *knockout* para  $\beta$ 1-AR e os seus controles selvagens (WT). As letras diferentes sobre as barras representam diferença estatística significativa entre os grupos no teste t de Student para amostras independentes ( $p < 0,001$ ). Número de experimentos = 3; Número de animais = 5/grupo.



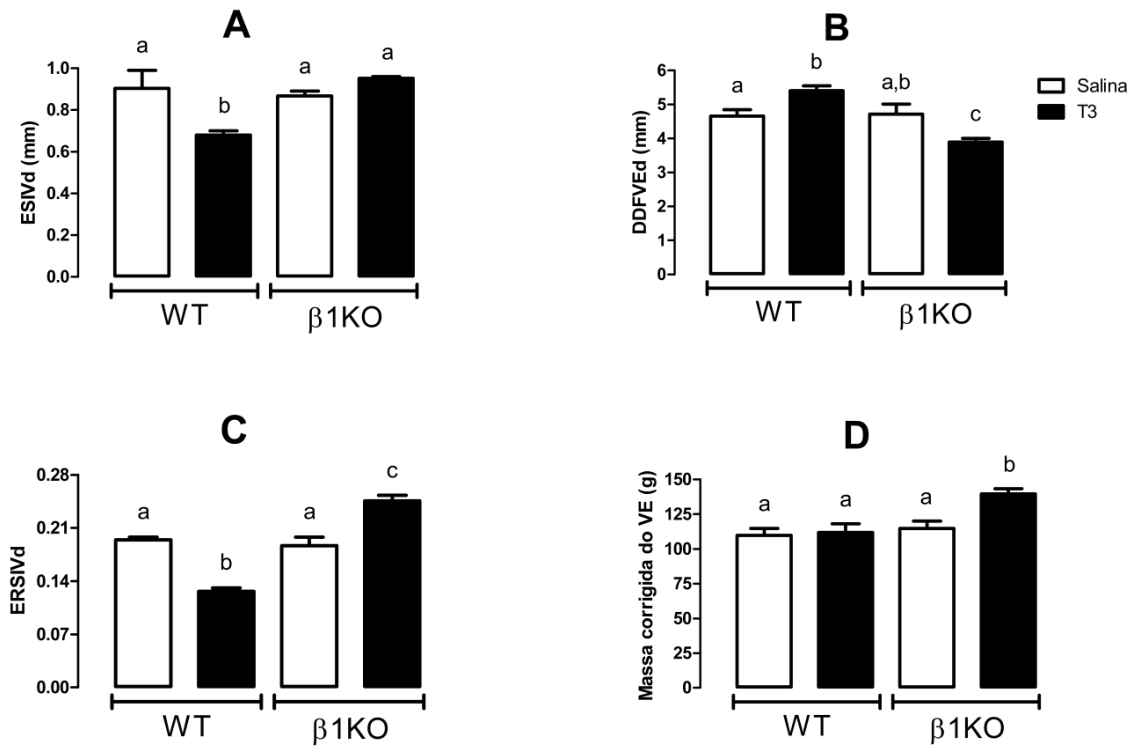
### 7.2.2 Estudo ecocardiográfico

Ao avaliar a espessura do septo interventricular em diástole (ESIVd) foi verificado que o tratamento com  $T_3$  causou uma redução significativa no grupo de animais selvagens tratados com  $T_3$  ( $WT_{T_3} = 0,7 \pm 0,02$  mm) quando comparado ao seu respectivo controle ( $WT_{sal} = 0,9 \pm 0,04$  mm;  $p < 0,05$ ). Nenhuma diferença foi observada entre os grupos de animais *knockout* para  $\beta$ 1-AR ( $\beta 1KO_{sal} = 0,9 \pm 0,02$  mm e  $\beta 1KO_{T_3} = 1,0 \pm 0,0$  mm;  $p < 0,05$ , Figura 29A).

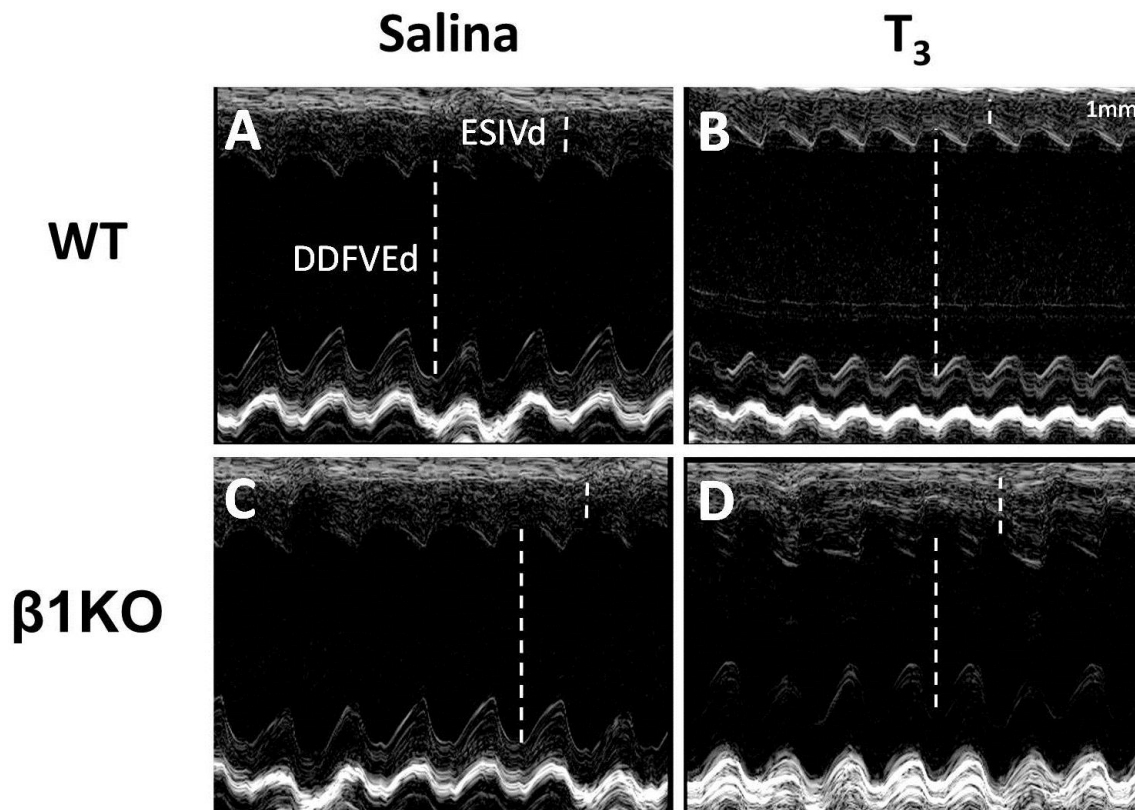
Já a avaliação do diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo em diástole (DDFVEd) demonstrou que o tratamento com  $T_3$  no grupo de animais selvagens provocou aumento significativo dessa variável em relação ao seu controle ( $WT_{T_3} = 5,4 \pm 0,14$  mm vs.  $WT_{sal} = 4,7 \pm 0,19$  mm;  $p < 0,05$ ). Por outro lado, os animais *knockout* para receptor  $\beta$ -adrenérgico tratado com  $T_3$  apresentaram redução significativa para DDFVEd em relação ao seu grupo controle ( $\beta 1KO_{T_3} = 3,9 \pm 0,11$  mm vs.  $\beta 1KO_{sal} = 4,7 \pm 0,3$  mm;  $p < 0,05$ ). Além disso, ao comparar ambos os grupos tratados com  $T_3$  foi observado que o grupo  $\beta 1KO_{T_3}$  exibiu valores significativamente menores que o grupo  $WT_{T_3}$  ( $p < 0,05$ ), significando que o efeito de  $T_3$  foi dependente do  $\beta$ 1-AR (Figura 29B). Isto também pode ser observado na figura representativa do ecocardiograma no Modo-M (Figura 30).

Ao avaliar a espessura relativa do septo interventricular em diástole (ERSIVd), parâmetro que normaliza a espessura do septo pelo diâmetro da cavidade, ambos em diástole (vide materiais e métodos), verificou-se que enquanto os animais  $WT_{T_3}$  ( $0,13 \pm 0,004$ ) apresentaram redução significativa quando comparado ao  $WT_{sal}$  ( $0,19 \pm 0,003$ ;  $p < 0,05$ ), os  $\beta 1KO_{sal}$  apresentaram aumento quando comparados aos seus controles selvagens ( $\beta 1KO_{sal} : 0,19 \pm 0,011$  vs.  $\beta 1KO_{T_3} : 0,25 \pm 0,007$ ;  $p < 0,05$ , Figura 29C). O mesmo pode ser observado na figura representativa do ecocardiograma no Modo-M (Figura 30).

A massa corrigida do ventrículo esquerdo (Massa Corrigida do VE) foi outra variável importante analisada no presente trabalho relacionada a anatomia cardíaca, e conseqüentemente hipertrofia. Neste caso, houve aumento estatisticamente significativo somente no  $\beta 1KO_{T_3}$  ( $139,5 \pm 3,8$  g) quando comparado a  $\beta 1KO_{sal}$  ( $114,6 \pm 5,3$  g;  $p < 0,05$ ). Não houve diferença entre  $WT_{sal}$  ( $109,7 \pm 4,9$  g;  $p < 0,05$ ) e o  $WT_{T_3}$  ( $111,7 \pm 6,3$  g;  $p < 0,05$ , Figura 29D).

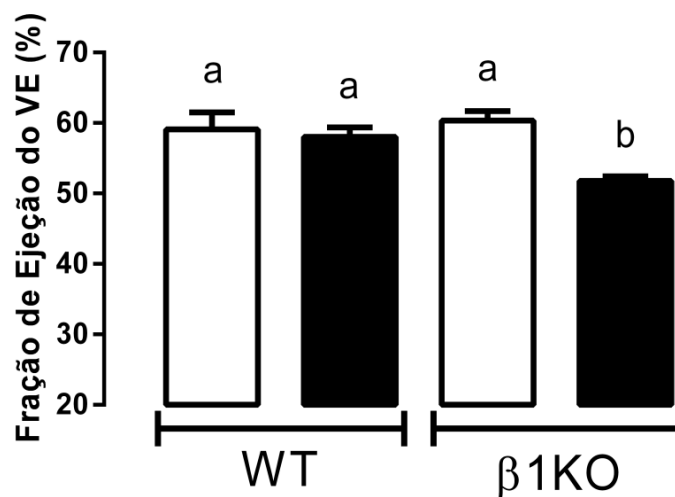


**Figura 29:** Análise ecocardiográfica de diferentes parâmetros morfológicos em animais selvagens e  $\beta 1$ -knockout. **A:** Espessura do septo interventricular em diástole (ESIVd) ( $F = 24,84$ ;  $p < 0,001$ ); **B:** Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo em diástole (DDFVEd) ( $F = 13,77$ ;  $p < 0,001$ ); **C:** Espessura relativa do septo interventricular em diástole (ERSIVd) ( $F = 63,47$ ;  $p < 0,001$ ); **D:** Massa corrigida do ventrículo esquerdo em percentual (Massa Corrigida do VE (%)) ( $F = 7,817$ ;  $p < 0,001$ ). As letras diferentes sobre as barras representam diferença estatística significativa entre os grupos no teste de análise de variância *de uma via* após verificação post hoc de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 30:** Imagens ecocardiográficas no Modo-M representativas dos grupos WT<sub>sal</sub> (A), WT<sub>T<sub>3</sub></sub> (B), β1KO<sub>sal</sub> (C) e β1KO<sub>T<sub>3</sub></sub> (D). Note o aumento da luz do VE (dilatação) do VE no grupo WT<sub>T<sub>3</sub></sub> e a diminuição da luz do VE com maior espessamento do septo interventricular (cardiopatia restritiva) no β1KO<sub>T<sub>3</sub></sub>. As linhas tracejadas mostram o DDFVEd = diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo e o ESIVd = espessura do septo interventricular em diástole. Canto superior direito mostra a escala de 1 mm.

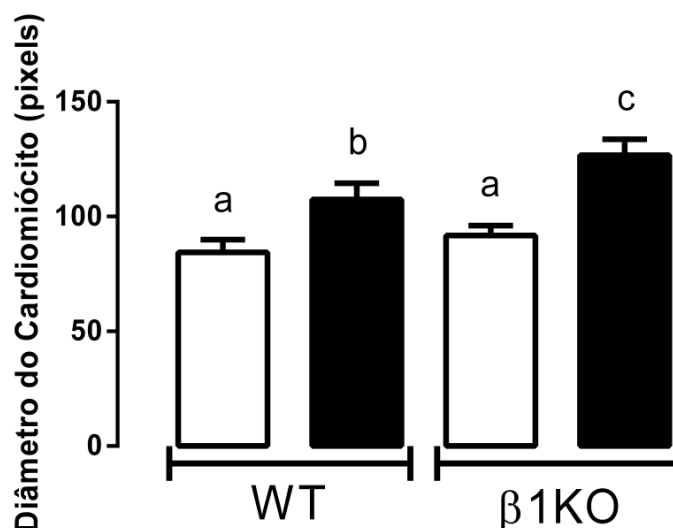
Para caracterizar funcionalmente os corações que hipertrofiaram em direções opostas em resposta a administração de T<sub>3</sub> (i.e, hipertrofia com aumento da luz do VE no WT controle e hipertrofia restritiva, diminuição da luz do VE, no β1KO) avaliou-se a função sistólica cardíaca por meio do cálculo da fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Neste caso, foi percebido que somente o grupo β1KO<sub>T<sub>3</sub></sub> apresentou redução significativa dessa variável quando comparado ao seu respectivo controle (β1KO<sub>T<sub>3</sub></sub> = 51,8 ± 0,6 vs. β1KO<sub>sal</sub> = 60,3 ± 1,4%, p < 0,05), ou ao grupo de animais selvagens tratados com T<sub>3</sub> (β1KO<sub>T<sub>3</sub></sub> = 51,8 ± 0,6 vs. WT<sub>T<sub>3</sub></sub> = 58,1 ± 1,3 %, p < 0,05, Figura 31). Não encontrada diferença significativa para a comparação intra-grupo dos animais selvagens (WT<sub>sal</sub> = 59,1 ± 2,4 vs. WT<sub>T<sub>3</sub></sub> = 58,1 ± 1,3 %, p < 0,05, Figura 31).



**Figura 31:** Função sistólica avaliada pela fração de ejeção do ventrículo esquerdo (VE) após o tratamento com hormônio tireoidiano ou veículo em animais com ausência do  $\beta$ 1-AR ( $\beta$ 1KO) e em animais do grupo controle (WT). As letras diferentes sobre as barras representam diferença estatística significativa entre os grupos na análise de variância *de uma via*, após verificação post hoc de Tukey ( $F = 5,962$ ;  $p < 0,001$ ).

### 7.2.3 Estudo da morfometria dos cardiomiócitos

Ao avaliar o nível de hipertrofia cardíaca através da análise de cortes histológicos, verificou-se que somente nos animais tratados com hormônio tireoidiano ( $WT_{T_3} = 107,4 \pm 3,2$  pixels;  $\beta 1KO_{T_3} = 126,8 \pm 3,1$  pixels) houve aumento do diâmetro dos cardiomiócitos em comparação aos seus respectivos controles ( $WT_{sal} = 84,4 \pm 2,5$  pixels;  $\beta 1KO_{sal} = 91,7 \pm 2,0$  pixels,  $p < 0,05$ ). Entretanto, foi observado que o grupo  $\beta 1KO_{T_3}$  apresentou a maior média de diâmetro em relação a todos os outros grupos ( $F = 47,60$ ;  $p < 0,001$ , Figura 31).



**Figura 32:** Avaliação da hipertrofia cardíaca através do diâmetro dos cardiomiócitos relacionadas à participação do  $\beta$ 1-AR e tratamento com T<sub>3</sub>. As letras diferentes sobre as barras representam diferença estatística significativa entre os grupos no teste de análise de variância *de uma via* após verificação post hoc de Tukey (F = 5,962; p < 0,001).

#### 7.2.4 Estudo da massa corporal e dos órgãos

A massa corporal pré, intra e pós-tratamento não apresentou qualquer alteração intra ou entre grupos. Entretanto, quando observado a variação do peso corporal ( $\Delta$  peso corporal) houve uma diferença significativa somente entre  $\beta$ 1KO<sub>T<sub>3</sub></sub> e WT<sub>sal</sub> (p < 0,05), Tabela 1.

Ao avaliar a massa cardíaca absoluta não foi identificada nenhuma diferença estatística em qualquer dos grupos experimentais. Entretanto, quando a massa cardíaca foi normalizada pelo comprimento da tíbia, o grupo  $\beta$ 1KO<sub>T<sub>3</sub></sub> foi estatisticamente diferente do seu respectivo controle ( $\beta$ 1KO<sub>sal</sub>), e de todos os outros grupos de animais selvagens (p < 0,05) (tabela 1).

Os dados sobre os pesos absolutos e relativos hepáticos e pulmonares não revelaram qualquer diferença entre os grupos, reduzindo a possibilidade de algum tipo de insuficiência congestiva ou alterações anatomopatológicas entre  $\beta$ 1KO e WT (tabela 1)

**Tabela 1:** Análise da massa corporal e dos órgãos nos grupos experimentais.

PARÂMETROS		GRUPOS EXPERIMENTAIS			
Massa		WT <sub>Sal</sub>	WT <sub>T<sub>3</sub></sub>	β1KO <sub>Sal</sub>	β1KO <sub>T<sub>3</sub></sub>
Corporal (g)	Inicial	28.1	28.1	30.2	32.4
	Final	29.8	28.9	30.0	34.3
	Δ	1.6	0.4	0.9	<b>0.4*</b>
Cardíaca (g)	(absoluta)	0.2	0.2	0.2	0.2
	(relativa)	11.0	10.1	10.8	<b>13.0#</b>
Pulmonar (g)	(absoluta)	0.2	0.2	0.2	0.3
	(relativa)	8.3	8.4	6.3	7.8
Hepática (g)	(absoluta)	1.4	1.1	1.3	1.6
	(relativa)	51.2	43.0	43.3	46.6

WT<sub>Sal</sub>: animal selvagem tratado com salina; WT<sub>T<sub>3</sub></sub>: animal selvagem tratado com salina; β1KO<sub>Sal</sub>: animal *knockout* para β1-AR tratado com salina; β1KO<sub>T<sub>3</sub></sub>: animal *knockout* para β1-AR tratado com T<sub>3</sub>. A massa relativa foi estabelecida através da razão entre o peso absoluto do órgão e o peso corporal do animal. \* diferença estatística significativa em relação a todos os grupos no teste de análise de variância *de uma via* após verificação post hoc de Tukey (F= 7,859; p<0,05).

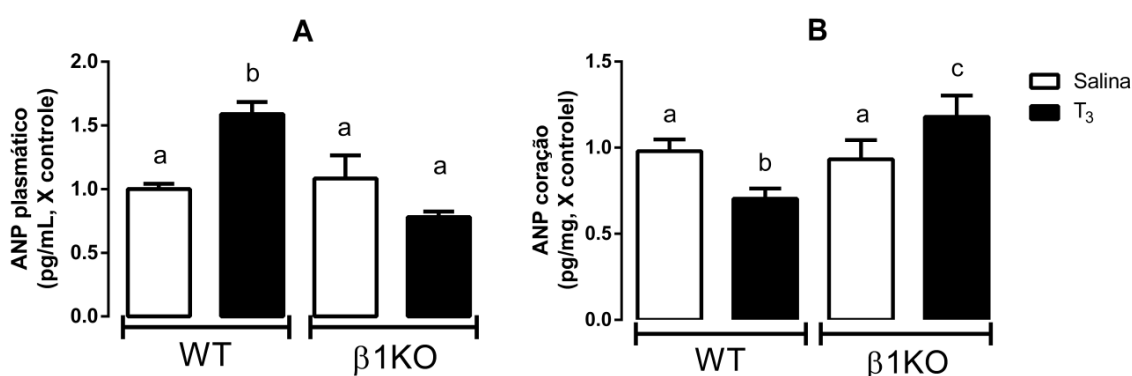
#### 7.2.5 Estudo do peptídeo natriurético atrial (ANP) plasmático e cardíaco

O peptídeo natriurético atrial (ANP) plasmático exibiu um nível significativamente mais elevado nos animais WT<sub>T<sub>3</sub></sub> (1,6±0,1 pg/mL) quando comparados ao seu respectivo controle (WT<sub>Sal</sub>= 1,0±0,04 pg/mL) ou aos animais *knockout* tratados com T<sub>3</sub> (β1KO<sub>T<sub>3</sub></sub>= 0,8±0,04 pg/mL, Figura 32A).

Os níveis cardíacos de ANP encontrados demonstraram uma importante resposta relacionada a hipertrofia cardíaca confirmada por outras variáveis descritas anteriormente. O ANP foi significativamente maior no grupo de animais *knockout* tratados com T<sub>3</sub> quando comparado ao grupo *knockout*

controle ( $\beta 1\text{KO}_{T_3} = 1,2 \pm 0,1$  vs.  $\beta 1\text{KO}_{\text{sal}} = 0,9 \pm 0,06$  pg/mL). Mais uma vez, a resposta no grupo de animais selvagens tratados com  $T_3$  foi oposta aquela apresentada pelos *knockouts* também tratados. Neste caso, o ANP diminuiu no  $\text{WT}_{T_3}$  quando comparado ao  $\text{WT}_{\text{sal}}$  ( $\text{WT}_{\text{sal}} = 0,98 \pm 0,03$  vs.  $\text{WT}_{T_3} = 0,7 \pm 0,02$  pg/mL,  $p < 0,05$ , Figura 32B).

Estes dados em conjunto sugerem uma resposta adaptativa na secreção de ANP no grupo de camundongos selvagens (baixos valores de ANP cardíaco devido a alta secreção para o plasma) comparados aos animais *knockout* (acúmulo de ANP no coração) ambos tratados com  $T_3$ .



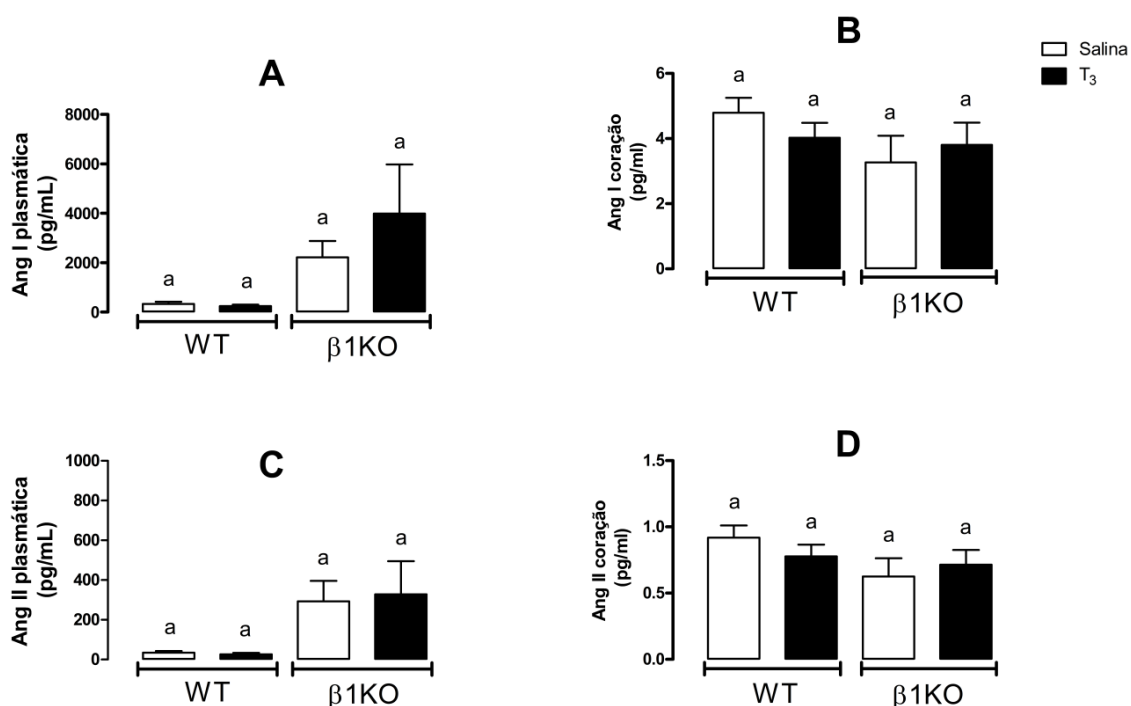
**Figura 33:** Experimento de radioimunoensaios para ANP. Níveis plasmáticos e cardíacos de ANP em resposta ao tratamento com  $T_3$  e modulação do  $\beta 1$ -AR. **A:** Nível plasmático de ANP ( $F = 17,08$ ;  $p < 0,05$ ); **B:** Nível cardíaco de ANP ( $F = 19,85$ ;  $p < 0,05$ ). As letras diferentes sobre as barras representam diferença estatística significativa entre os grupos no teste de análise de variância de *uma via* após verificação post hoc de Tukey.

#### 7.2.6 Estudo do sistema renina angiotensina (SRA) cardíaco e plasmático

A Ang I plasmática não apresentou qualquer diferença estatística independente do tratamento ou grupos ( $p > 0,05$ , Figura 33A). Resposta bastante semelhante foi observada ao avaliar os níveis plasmáticos de Ang II ( $p > 0,05$ , figura 33C).

O comportamento do sistema renina-angiotensina cardíaco foi semelhante o observado no plasma. Desse modo, os níveis de Ang I nos animais tratados com  $T_3$  não apresentaram diferenças estatísticas significativas ( $\text{WT}_{T_3} = 4,0 \pm 0,5$  pg/mL e  $\beta 1\text{KO}_{T_3} = 3,8 \pm 0,7$  pg/mL) quando comparados aos seus respectivos controles ( $\text{WT}_{\text{sal}} = 4,8 \pm 0,5$  pg/mL e  $\beta 1\text{KO}_{\text{sal}} = 3,3 \pm 0,8$  pg/mL), e também, sem diferenças entre eles (Figura 33B).

De modo semelhante ao descrito anteriormente, os níveis de Ang II cardíaco nos grupos tratados com T<sub>3</sub> (WT<sub>T3</sub> = 0,8 ± 0,1 pg/mL; β1KO<sub>T3</sub> = 0,7 ± 0,7 pg/mL) também não exibiram qualquer diferença em relação aos seus respectivos controles (WT<sub>sal</sub> = 0,9 ± 0,1 pg/mL; β1KO<sub>sal</sub> = 0,6 ± 0,1 pg/mL), também sem diferenças estatísticas entre eles (Figura 33D).



**Figura 34:** Experimento de radioimunoensaios para Ang I e II. **A:** Nível plasmático de Ang I ( $F = 2,4$ ;  $p > 0,05$ ); **B:** Nível cardíaco de Ang I ( $F = 1,03$ ;  $p > 0,05$ ); **C:** Nível de ANG II plasmático ( $F = 2,2$ ;  $p > 0,05$ ); **D:** Nível de Ang II cardíaco ( $F = 1,2$ ;  $p > 0,05$ ). As letras diferentes sobre as barras representam diferença estatística significativa entre os grupos no teste de análise de variância de uma via após verificação post hoc de Tukey.

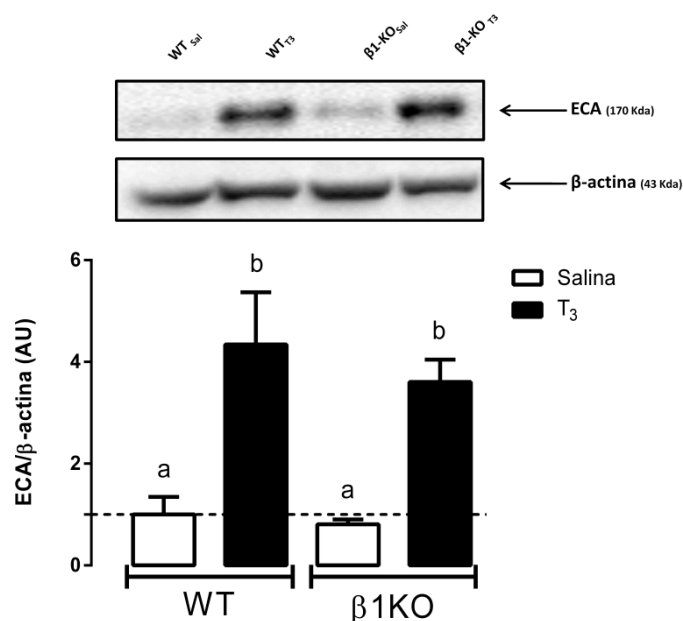
### 7.2.8 Resposta da ECA relativa aos grupos experimentais

Para melhor entendimento sobre a ativação do sistema renina-angiotensina cardíaco, avaliou-se a ativação da ECA no coração de todos os grupos.

Para ECA fosforilada (p-ECA) somente os grupos tratados com T<sub>3</sub> apresentaram elevação significativa quando comparado aos seus respectivos controles, porém sem diferença entre eles (WT<sub>T3</sub> = 4,3 ± 1,0 AU; β1KO<sub>T3</sub> = 3,6 ± 0,3 AU). Não foi evidenciada qualquer diferença entre os grupos tratados com salina (WT<sub>sal</sub> = 1,0 ± 0,2 AU; β1KO<sub>sal</sub> = 0,8 ± 0,1 AU). Este dado reforça a



hipótese de que o SRA é ativado pelo T<sub>3</sub> no coração e este efeito independe da participação do β1-AR (Figura 34).



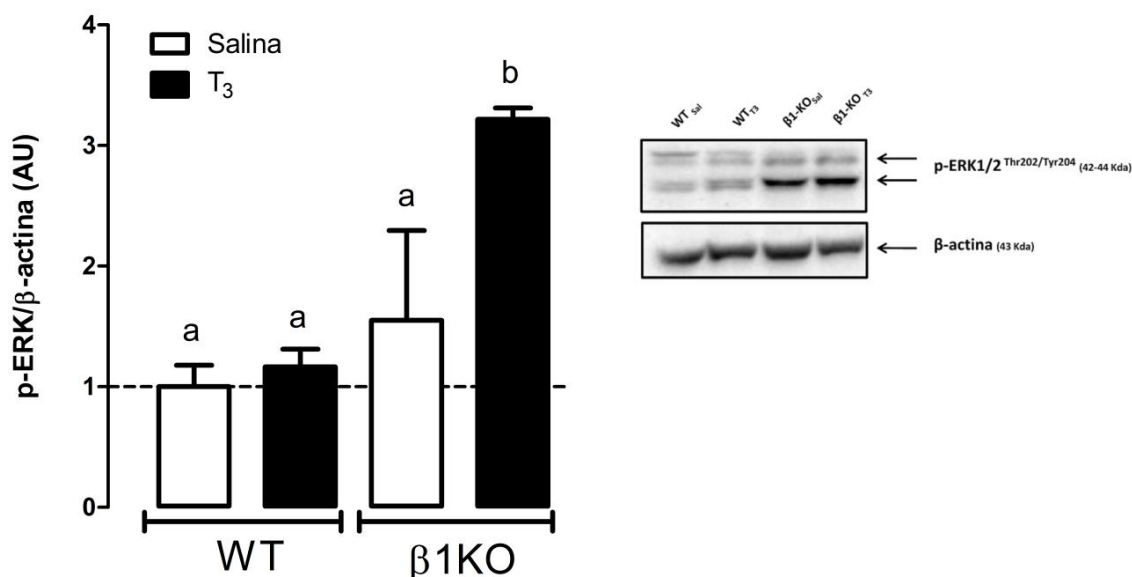
**Figura 35:** Ativação da via ECA marcada pela sua fosforilação em animais selvagens (WT) e *knockout* (β1KO). As letras diferentes sobre as barras representam diferença estatística significativa entre os grupos no teste de análise de variância de uma via após verificação post hoc de Tukey (F = 24,09; p < 0,05). Número de experimentos = 3; Número de animais = 5/grupo.

### 7.2.9 Resposta das vias sinalização celular associadas a hipertrofia cardíaca

#### 7.2.9.1 ERK

Foi observado para o substrato fosforilado da ERK que o grupo *knockout* tratado com T<sub>3</sub> (β1KO<sub>T3</sub> = 2,9 ± 0,3 UA) apresentou elevação significativa dos níveis de ERK fosforilada (p-ERK) quando comparado ao seu respectivo controle (β1KO<sub>sal</sub> = 2,9 ± 0,3 UA), bem como os grupos de animais selvagens (WT<sub>sal</sub> = 1,0 ± 0,2 AU; WT<sub>T3</sub> = 1,2 ± 0,2 UA). No entanto, não foram identificadas diferenças em nenhum outro grupo (Figura 35).

Este dado sugere uma possível modulação da via ERK pela via do β1-AR. Assim, o T<sub>3</sub> ativa a via ERK somente na ausência do β1-AR.

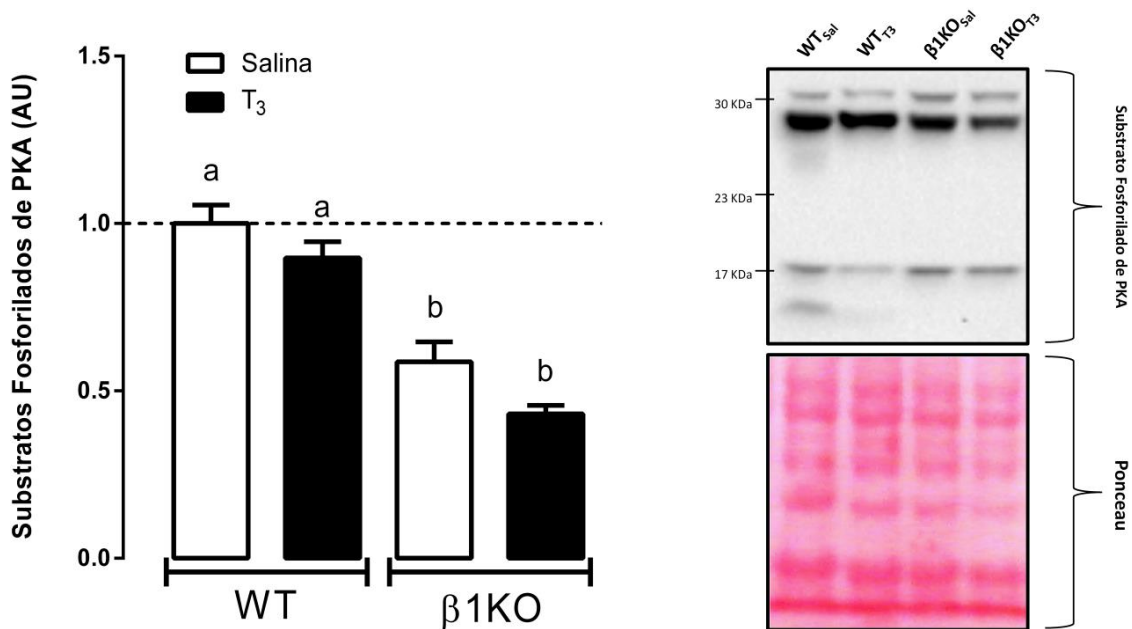


**Figura 36:** Ativação da via marcada pela ERK fosforilada (p-ERK) em animais selvagens (WT) e *knockout* (β1KO). As letras diferentes sobre as barras representam diferença estatística significativa entre os grupos no teste de análise de variância de *uma via* após verificação post hoc de Tukey (F= 10,29; p<0,05). Número de experimentos = 3; Número de animais = 5/grupo.

#### 7.2.9.2 PKA

Para avaliar se a via da PKA estava envolvida na resposta inibitória do β1-AR sobre a ativação da ERK induzida pelo T<sub>3</sub>, montou-se um experimento para avaliar a funcionalidade da via PKA em todos os grupos. Assim, o nível de substratos fosforilados de PKA foi significativamente menor no grupo *knockout* tratado com T<sub>3</sub> (β1KO<sub>T3</sub> = 0,4 ± 0,02 UA) quando comparado ao seu respectivo controle (β1KO<sub>sal</sub> = 0,7 ± 0,002 UA), ou aos grupos WT (WT<sub>sal</sub> = 1,0 ± 0,05 UA e WT<sub>T3</sub> = 0,9 ± 0,05 UA). Além disso, o grupo β1KO<sub>sal</sub> também demonstrou níveis significativamente menores de substratos fosforilados de PKA quando comparado aos grupos WT. Entretanto não foi evidenciada nenhuma diferença entre os grupos de animais selvagens (Figura 36).

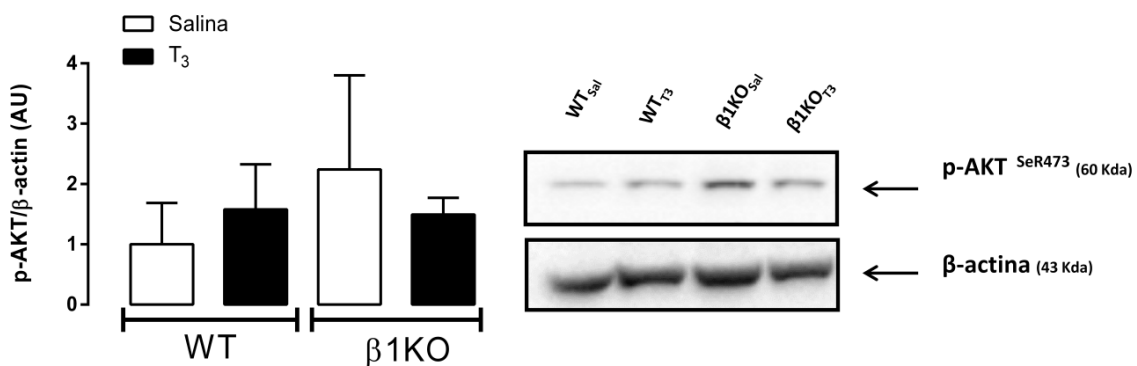
Estes dados sugerem que, como descrito no início desta sessão, a via da PKA está significativamente reduzida nos animais do grupo *knockout* e o T<sub>3</sub> não está envolvido na ativação desta via, independentemente da presença ou não do β1-AR funcional. Portanto, provavelmente, a via PKA não deve estar envolvida na modulação da via ERK induzida pelo T<sub>3</sub>.



**Figura 37:** Nível de substrato de PKA fosforilado em resposta ao tratamento com  $T_3$  em animais selvagens (WT) e *knockout* para  $\beta$ 1-AR ( $\beta$ 1KO). As letras diferentes sobre as barras representam diferença estatística significativa entre os grupos no teste de análise de variância *de uma via* após verificação post hoc de Tukey ( $F = 36,53$ ;  $p < 0,05$ ). Número de experimentos = 3; Número de animais = 5/grupo.

### 7.2.9.3 AKT e 4E-BP1

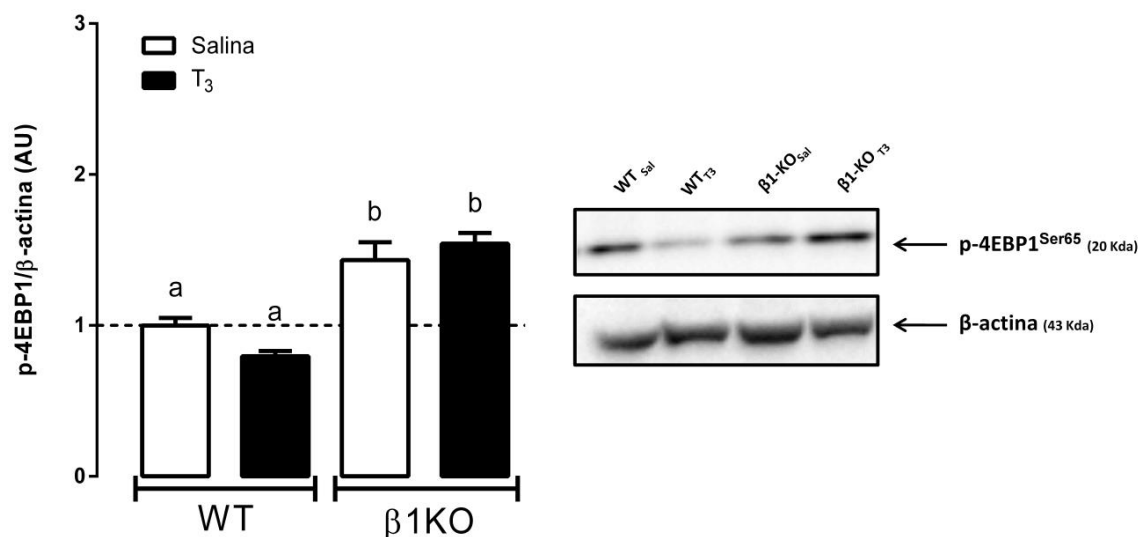
Quando o objetivo foi de investigar a via da Akt como possível candidata na modulação da ERK, avaliou-se o conteúdo de Akt em todos os grupos. Assim, não foi observada nenhuma alteração do padrão relativo ao conteúdo de Akt em nenhum dos grupos ( $p > 0,05$ , Figura 37).



**Figura 38:** Nível de AKT fosforilada (p-AKT) no resíduo serina em resposta ao tratamento com  $T_3$  em animais selvagens (WT) e *knockout* para  $\beta$ 1-AR ( $\beta$ 1KO). WT: selvagem;  $\beta$ 1KO: *knockout* para  $\beta$ 1-AR. Número de experimentos = 3; Número de animais = 4/grupo.

No entanto, ao avaliar 4E-BP1, que é uma proteína *downstream* da via Akt, foi observado que somente os animais que não possuem  $\beta$ 1-AR exibiram

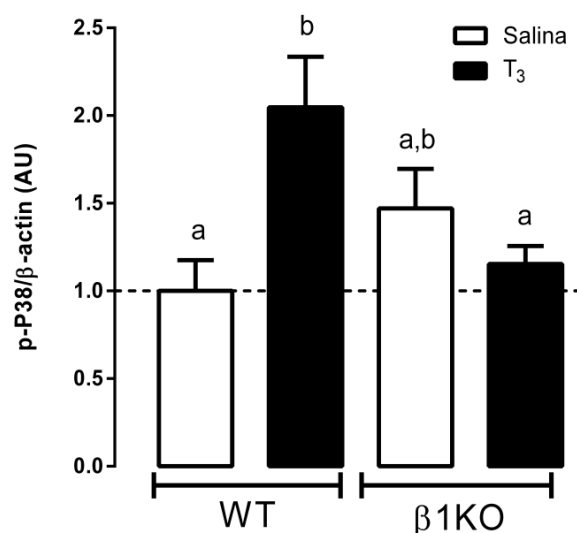
elevação significativa do substrato fosforilado em relação aos animais WT ( $\beta 1\text{KO}_{\text{sal}} = 1,4 \pm 0,1 \text{ UA}$  e  $\beta 1\text{KO}_{\text{T}_3} = 1,5 \pm 0,07 \text{ UA}$  vs.  $\text{WT}_{\text{sal}} = 1,0 \pm 0,05 \text{ UA}$ ;  $\text{WT}_{\text{T}_3} = 0,8 \pm 0,03 \text{ UA}$ ) dessa proteína sem diferença intra-grupo (Figura 38). Estes dados sugerem que o  $\beta 1\text{-AR}$  é um importante modulador da via 4E-BP1, e este efeito independe do  $\text{T}_3$ .



**Figura 39:** Ativação da via marcada pelos substratos fosforilados de 4E-BP1 (p-4EBP1) em animais selvagens (WT) e *knockout* ( $\beta 1\text{KO}$ ). As letras diferentes sobre as barras representam diferença estatística significativa entre os grupos no teste de análise de variância *de uma via* após verificação post hoc de Tukey ( $F = 31,14$ ;  $p < 0,05$ ). Número de experimentos = 3; Número de animais = 5/grupo.

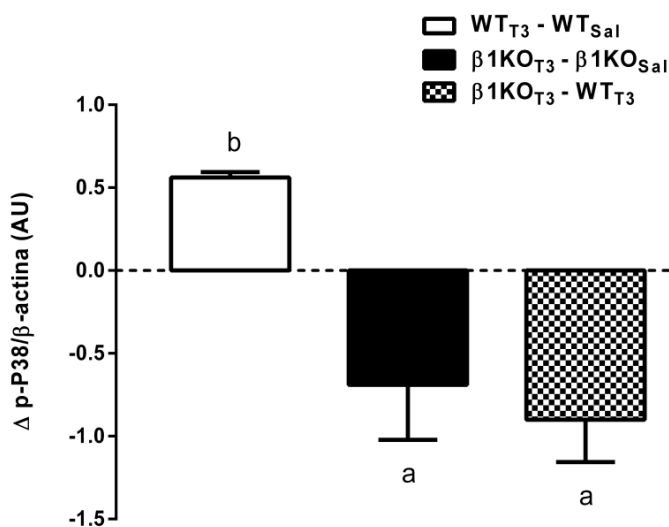
#### 7.2.9.4 p38

Continuando a busca por possíveis candidatos para a modulação exercida pelo  $\beta 1\text{-AR}$  na ativação da ERK, avaliou-se o conteúdo de p38 em todos os grupos. Quando os grupos foram avaliados individualmente foi possível observar que o grupo WT tratado com  $\text{T}_3$  demonstrou aumento significativo do substrato fosforilado de p38 em relação ao seu respectivo controle ( $\text{WT}_{\text{T}_3} = 2,1 \pm 0,2$  vs.  $\text{WT}_{\text{sal}} = 1,0 \pm 0,2$ ,  $p < 0,05$ ) e também em relação ao grupo *knockout* tratado com  $\text{T}_3$  ( $\beta 1\text{KO}_{\text{T}_3} = 1,2 \pm 0,1$ ,  $p < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças significativas nos grupos *knockout* tratado e não tratado com  $\text{T}_3$  (Figura 39).



**Figura 40:** Ativação da via marcada pelos substratos fosforilados da p38 (p-P38) em animais selvagens (WT) e *knockout* (β1KO). As letras diferentes sobre as barras representam diferença estatística significativa entre os grupos no teste de análise de variância *de uma via* após verificação post hoc de Tukey ( $F = 5,377$ ;  $p < 0,05$ ). Número de experimentos = 3; Número de animais = 5/grupo.

Ao utilizar uma análise para observar o grau de variação intragrupo dos níveis do substrato fosforilado de p38 foi observado aumento de aproximadamente 60% no grupo WT e redução de aproximadamente 65% no delta de variação dos grupos tratados com T<sub>3</sub> – tratados com salina (controles). Ainda na Figura 40 observa-se que o delta na variação dos grupos tratados com T<sub>3</sub> (*knockout* – selvagem) foi de aproximadamente 90%.



**Figura 41:** Variação dos níveis fosforilados de p38 entre os grupos. As letras diferentes sobre as barras representam diferença estatística significativa no teste de análise de variância *de uma via* (*one-way ANOVA*) ( $p < 0,001$ ).

Estes dados sugerem fortemente que a via p38 é ativada em resposta ao T<sub>3</sub> somente em condições onde o β1-AR está funcional. Por outro lado, na ausência do β1-AR, o T<sub>3</sub> não somente é incapaz de ativá-la como inibi esta via, sugerindo um papel modulador do β1-AR sobre a p38, que deve ser inibida por outras vias de sinalização induzidas pelo T<sub>3</sub>.

## 8. DISCUSSÃO

O achado mais relevante deste estudo foi a constatação de que o receptor  $\beta$ 1-adrenérgico ( $\beta$ 1-AR) exerce ação fundamental na mediação da hipertrofia cardíaca adaptativa induzida pelo hormônio tireoidiano. Apesar da ativação da via da ERK, esta mediada pelo sistema renina-angiotensina cardíaco, uma via descrita na literatura como “via maladaptativa” (Diniz, Carneiro-Ramos e Barreto-Chaves, 2007; 2009; Barreto-Chaves *et al.*, 2010) nossos dados apontam para um papel contrarregulador exercido pela ativação concomitante do  $\beta$ 1-AR no modelo de hipertrofia induzida pelo T<sub>3</sub>. Essa conclusão foi possível graças a técnica de transgênese (*knockout*) específica para o  $\beta$ 1-AR. Embora seja difícil atribuir este papel modulador do  $\beta$ 1-AR especificamente no coração, pois o modelo de animal utilizado não foi o de deleção do receptor em todo o organismo e não tecido-específica, os animais *knockout* para  $\beta$ 1-AR ( $\beta$ 1KO) apresentaram hipertrofia patológica (maladaptativa) comprovada por exames morfofuncionais *in vivo* (Ecocardiografia) e morfométricos *ex vivo* (patologia).

Na análise das possíveis vias de sinalização celular envolvidas na resposta adaptativa a hipertrofia cardíaca induzida pelo T<sub>3</sub>, observou-se que uma das principais vias envolvidas nesta resposta adaptativa foi a via da p38. Assim, a distinção da hipertrofia dos cardiomiócitos entre os animais selvagens e  $\beta$ 1KO esteve diretamente relacionado a capacidade do  $\beta$ 1-AR ativar a p38, que deve ter atuado de maneira contra-regulatória sobre a via de sinalização MAPK/MEK1/2/ERK1/2, conferindo assim a hipertrofia adaptativa para os animais selvagens tratados com hormônio tireoidiano. Vários estudos na literatura (Marchant, Brown e Sernia, 1993; Sernia *et al.*, 1993; Kobori, Ichihara, Suzuki, Miyashita, *et al.*, 1997) e dados publicados (Silveira *et al.*, 2014) ou não publicados pelo nosso grupo, já descreveram o papel fundamental do SRA cardíaco na mediação da resposta hipertrófica cardíaca ao HT. Embora a maioria deles ou não investigaram (Kobori, Ichihara, Suzuki, Takenaka, *et al.*, 1997; Asahi *et al.*, 2001; Basset *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2003; Pantos *et al.*, 2005) ou desprezaram a importância (Schluter e Wenzel, 2008; Diniz, Carneiro-Ramos e Barreto-Chaves, 2009) da via  $\beta$ -adrenérgica na modulação da hipertrofia, nossos resultados sustentam a ideia de que esta via deva estar envolvida não na exacerbação ou sinergismo da hipertrofia patológica, mas sim

na contra-regulação do processo, i.e., na atenuação ou mesmo na proteção do coração contra os efeitos deletérios no remodelamento e na função cardíaca.

Provavelmente, essa controvérsia pode ser explicada, pelo menos em parte, pelas diferenças nos modelos utilizados na literatura (espécie animal, tipo de hormônio utilizado: T<sub>4</sub> vs T<sub>3</sub>, dose, via de administração, protocolo utilizado, etc.). No entanto, acreditamos também que o fato da via  $\beta$ -adrenérgica não ter sido descrita frequentemente como importante para o desenvolvimento da hipertrofia patológica, os autores provavelmente não buscaram o contrário, ou seja, não investigaram o papel desta via na modulação da hipertrofia em direção a uma hipertrofia adaptativa, que sempre (talvez) estava recrutada em todo momento atenuando o processo maladaptativo. Talvez isso só tenha sido desmascarado com a utilização pela primeira vez, neste estudo, de um modelo de deleção do  $\beta$ 1-AR.

Dados do nosso laboratório nos levavam a acreditar, assim como já descrito na literatura, no papel fundamental do SRA cardíaco na hipertrofia cardíaca induzida pelo HT. No entanto, possuíamos indícios de que a inervação autonômica simpática não era importante na hipertrofia, pois ela acontecia da mesma forma (pelo menos avaliada em termos de peso relativo do coração) tanto no grupo de ratos intactos, como no grupo de ratos denervados farmacologicamente pela guanetidina (dados não publicados).

Na busca por explicações para as hipóteses levantadas foi realizada, inicialmente, a caracterização do modelo de hipertrofia cardíaca induzida por T<sub>3</sub> em camundongos Swiss Webster, para nos certificar que o protocolo utilizado seria eficiente para esse fim. Para isso, algumas variáveis relacionadas à hipertrofia induzida por T<sub>3</sub> e identificadas como críticas na literatura fizeram parte do nosso conjunto de análises. Nossos dados demonstraram que o nosso protocolo de administração de hormônio tireoidiano elevou os níveis plasmáticos de T<sub>3</sub> em 50%, aumentou os níveis cardíacos de Ang I / Ang II e reduzir reduziu os de ANP, provavelmente pelo aumento de sua secreção non plasma. Adicionalmente, o T<sub>3</sub> induziu hipertrofia dos cardiomiócitos e esses achados estão de acordo com o que já se tem descrito na literatura (Diniz, Carneiro-Ramos e Barreto-Chaves, 2007; 2009; Barreto-Chaves *et al.*, 2010; Carneiro-Ramos *et al.*, 2010; Diniz, Carneiro-Ramos e Barreto-Chaves, 2010; Silveira *et al.*, 2014), confirmando a efetividade do nosso modelo.



O achado novo, e mais intrigante, pelo menos a princípio, foi a de que o T<sub>3</sub> aumentou a modulação simpática, sugerida neste trabalho pelo aumento da relação LF/HF na análise espectral da variabilidade cardíaca dos animais tratados com T<sub>3</sub>. Salvaguardando diferenças marcantes entre os modelos (dados anteriores do nosso grupo utilizando T<sub>4</sub> em ratos vs. este estudo utilizando T<sub>3</sub> em camundongos) não esperávamos este resultado uma vez que em ratos, o T<sub>4</sub> promoveu hipertrofia independentemente da inervação simpática. Levantou-se, portanto, a hipótese de que a modulação simpática aumentada em nosso modelo poderia ter um substrato anatômico pós e não pré-sináptico. Assim, montou-se um segundo protocolo experimental, chamado aqui de Etapa 2, para investigar se a ausência do receptor β-adrenérgico poderia alterar o padrão de hipertrofia cardíaca em resposta ao T<sub>3</sub>. O resultado confirmou a hipótese de que a modulação simpática deve estar aumentada pela ação do T<sub>3</sub> sobre a via β-adrenérgica em nível pós-sináptico e isto seria importante para induzir a um hipertrofia adaptativa, como descrito anteriormente nesta sessão. A conclusão de que a hipertrofia do coração foi fisiológica (adaptativa) se fundamenta pelos resultados já expostos de ecocardiografia, morfometria e secreção de ANP.

Os hormônios tireoidianos apresentam efeitos intrínsecos e extrínsecos ao coração, o que torna essencial uma avaliação anatômica e funcional desse órgão para inferir de maneira precisa esses efeitos. Alguns estudos foram realizados em cultura de cardiomiócitos ou em coração isolado avaliando esses efeitos de maneira intrínseca (Mcdonough, Chen e Spitzer, 1987; Gloss *et al.*, 2001; Pachucki *et al.*, 2001). Entretanto, poucos trabalhos buscaram avaliar a função cardiovascular relacionada a ação dos hormônios tireoidianos *in vivo* e de maneira não invasiva (Weiss *et al.*, 2002). Sendo assim, a ecocardiografia em camundongos, considerada uma ferramenta de alta confiabilidade, traz informações fidedignas no que tange a avaliação anatômica e funcional do coração (Fentzke *et al.*, 1997; Fentzke *et al.*, 1998; Mor-Avi *et al.*, 1999; Feldman *et al.*, 2000; Collins *et al.*, 2001; Fentzke *et al.*, 2001). Assim, baseado nas informações de todas as variáveis do ecocardiograma foi possível observar que o tratamento com T<sub>3</sub> foi capaz de promover hipertrofia excêntrica nos animais selvagens, o qual foi caracterizado por redução da espessura da parede relativa do septo interventricular e aumento do diâmetro diastólico final

do ventrículo esquerdo. Por outro lado, os animais  $\beta$ 1KO apresentaram uma hipertrofia concêntrica, caracterizada por um aumento da espessura relativa do septo interventricular e uma redução do diâmetro diastólico final. Deve ser destacado também, que a análise histológica dos corações corroborou os resultados do ecocardiograma onde os animais que foram tratados com  $T_3$  apresentaram um aumento significativo na média da área de seção transversa dos cardiomiócitos, fortalecendo ainda mais a confiabilidade dos resultados. Nosso grupo já havia demonstrado resultados idênticos, sobre a hipertrofia e diâmetro dos cardiomiócitos, em um protocolo experimental bastante semelhante ao do presente estudo (Silveira *et al.*, 2014), o que elevou a confiabilidade dos resultados obtidos neste estudo.

Ao analisar a resposta funcional do coração pela fração de ejeção do ventrículo esquerdo foi possível observar que os animais selvagens não apresentaram qualquer alteração na fração de ejeção, o que demonstra uma hipertrofia excêntrica sem prejuízo funcional, mesmo diante de uma alta demanda metabólica exercida pelo  $T_3$ . Por outro lado, os animais  $\beta$ 1KO apresentam queda significativa nessa variável evidenciando uma hipertrofia concêntrica com disfunção ventricular esquerda. Deve ser destacado, que os hormônios tireoidianos são reconhecidos por induzir hipertrofia cardíaca sem alteração funcional ventricular tanto em humanos (Ching *et al.*, 1996) quanto em camundongos (Bedotto *et al.*, 1989), por serem capazes de regular genes específicos que codificam tanto proteínas estruturais quanto funcionais. Isto resulta em crescimento de maneira harmônica dos capilares e do miocárdio (Craft-Cormney e Hansen, 1980; Chilian *et al.*, 1985; Tomanek e Busch, 1998), mesmo com níveis elevados de  $T_3$  circulante, desde que isso aconteça em um curto intervalo de tempo (Dillmann, 1990; Nicolini *et al.*, 2013), exatamente como o aplicado no presente estudo, onde o tempo de administração de  $T_3$  foi de apenas 10 dias. No entanto, na ausência do  $\beta$ 1-AR esse protocolo promoveu hipertrofia cardíaca com disfunção funcional ventricular esquerda.

É descrito na literatura que o excesso de hormônio tireoidiano circulante está associado à elevação dos níveis plasmáticos de ANP. Semelhantemente, as patologias cardíacas hipertróficas caracterizadas por alterações na geometria cardíaca com disfunção funcional ventricular esquerda, também estão associadas ao aumento da síntese de ANP pelos

átrios e ventrículos (Chien *et al.*, 1991; Vezyraki, Kalfakakou e Evangelou, 2000; Koukoulis *et al.*, 2002; Olson e Schneider, 2003; Yasuno *et al.*, 2009). Além disso, existe uma correlação inversa entre os níveis plasmático e cardíaco para ANP, induzido pelo hormônio tireoideano (Wong *et al.*, 1989; Yasuno *et al.*, 2009). De acordo com os nossos resultados, os animais selvagens tratados com T<sub>3</sub> apresentaram maiores níveis plasmáticos para ANP, enquanto os β1KO exibiram os menores. Porém, ao analisar os níveis cardíacos foi possível observar resultados inversos aos encontrados no plasma. Possivelmente, o fato dos animais selvagens tratados com T<sub>3</sub> exibirem alta secreção de ANP, sugerido pelo aumento de ANP plasmático e baixo ANP cardíaco (Yegin *et al.*, 1997; Silveira *et al.*, 2014), deve ter contribuído para o estabelecimento de um ambiente hemodinâmico mais favorável (redução da pré e pós-carga, excreção de sódio e água aumentados, etc...), assim como descrito por Kohno *et al.* (1986) em indivíduos com hipertensão. No entanto, os corações dos animais com deleção para β1-AR não apresentaram tal adaptação e isso provavelmente deve ter contribuído para um remodelamento cardíaco maladaptativo com comitente prejuízo funcional sistólico. Adicionalmente, a literatura relata que na hipertrofia cardíaca patológica ocorre aumento da síntese de ANP no coração, pois este hormônio parece exercer funções parácrinas anti-hipertróficas e anti-fibróticas, além de contra regular os efeitos do SRA e do sistema nervoso simpático (Fujisaki *et al.*, 1995; Nakao *et al.*, 1996; Oliver *et al.*, 1997; Oliver *et al.*, 1998; Tamura *et al.*, 2000; Knowles *et al.*, 2001). De maneira geral, a análise dos resultados ecocardiográficos e morfométrico, em conjunto com a resposta de ANP foram capazes de identificar que os animais WT<sub>T3</sub> apresentaram uma hipertrofia adaptativa ou fisiológica enquanto os animais β1KO<sub>T3</sub> apresentaram uma hipertrofia mal adaptativa ou patológica.

A perda de peso corporal relacionado ao excesso de HT é um sinal bem descrito na literatura (Basset, Blanc e Elghozi, 2000; Basset *et al.*, 2001), porém o nosso regime de tratamento com T<sub>3</sub> não foi suficiente para promover alterações metabólicas que levassem a essa resposta. Nossos dados estão de acordo com os descritos por Silveira *et al.* (2014), que mudanças no peso corporal de camundongos em protocolo de excesso de T<sub>3</sub> circulante é mais evidente em períodos longos de administração. No estudo conduzido por

Freitas (2011), o tratamento com tiroxina por um período de 35 dias foi capaz de induzir perda de peso. Sendo assim, a alteração do peso corporal em modelo experimental parece ser dependente do tempo de administração, o que nos sugere no caso do presente trabalho, que o tratamento com T<sub>3</sub> por 10 dias na dose de 50µg/100pc não foi suficiente para produzir esse efeito. Observando esse fato com um olhar translacional é bastante coerente a alteração do peso corporal se comportar de maneira tempo-dependente em relação ao nível T<sub>3</sub>, uma vez que a manifestação dos sinais clássicos do hipertireoidismo em humanos acontece de maneira gradual e em longo prazo.

Diversos estudos demonstram que o excesso de HT está relacionado com hipertrofia cardíaca excêntrica ou concêntrica e de acordo com os nossos resultados, o tratamento com T<sub>3</sub> durante 10 dias promoveu aumento no peso relativo dos corações somente no coração dos animais β1KO, corroborando os dados demonstrados pelo ecocardiograma. Possivelmente, os animais β1KO perderam a sua capacidade de regular o crescimento proporcional e pouco intensa entre diâmetro e as paredes ventriculares do coração como observado na hipertrofia fisiológica (Heineke e Molkentin, 2006; Dorn, 2007; Maillet, Van Berlo e Molkentin, 2013). Assim, a ausência dos β1-ARs levou ao crescimento desproporcional que se traduziu no aumento desordenado, o que provavelmente levou as alterações na fração de ejeção.

Disfunções ventriculares semelhantes as que acontecem no infarto do miocárdio podem desenvolver aumento das pressões de enchimento ventricular e conseqüentemente, ocasionar a congestão pulmonar e hepática (Bocchi *et al.*, 2009; Montera *et al.*, 2009). A literatura descreve a relação da congestão pulmonar e/ou hepática nos quadros de insuficiência cardíaca, em que a análise dos pesos relativo e absoluto desses órgãos serve como um parâmetro indireto de avaliação para essa patologia (Kiriazis *et al.*, 2002; Schmidt-Ott e Ascheim, 2006). No entanto, os nossos resultados não apresentaram quaisquer alterações para o peso relativo e absoluto dos pulmões e fígado entre os grupos demonstrando que, a dose e o tempo de administração de T<sub>3</sub> não foram capazes de provocar insuficiência cardíaca congestiva. Por outro lado, o estudo de Araujo *et al.* (2006) identificou que o hipertireoidismo experimental provocou congestão hepática e pulmonar, no entanto, hormônio (T<sub>4</sub>), animal (ratos), tempo de administração de HT (4

semanas) e via de administração (água de beber) utilizados no desenho experimental desse trabalho foram totalmente diferentes aos do presente estudo, o que pode ter conferido a discrepância entre os resultados, especialmente, pelo tempo muito longo de administração de hormônio tireoidiano.

Os dados relativos a resposta do SRA plasmático no presente estudo não evidenciou qualquer diferença estatística entre os grupos tratados com  $T_3$  e seus respectivos controles, e também foi possível observar que os níveis de Ang I e Ang II não apresentaram qualquer relação com a hipertrofia cardíaca. Na mesma direção, outros trabalhos também não evidenciaram qualquer alteração no SRA periférico no hipertireoidismo experimental (Verma, Noble e Miller, 1986; Carneiro-Ramos *et al.*, 2006).

As principais funções fisiológicas do SRA cardíaco parece ser a manutenção do equilíbrio ideal de estímulos intracelulares que sejam capazes de induzir e inibir o crescimento e a proliferação celular, além da mediação de respostas adaptativas ao estresse miocárdico. Convém ressaltar, que esse sistema tem sido o principal mecanismo descrito para explicar as alterações hipertróficas induzidas pela sinalização ativada por Ang I e Ang II (Paul, Poyan Mehr e Kreutz, 2006; Barreto-Chaves *et al.*, 2010). Os dados do presente estudo evidenciam que em relação ao SRA houve ativação de ECA no coração dependente da administração de  $T_3$ , porém, sem qualquer alteração significativa de Ang I e Ang II independente do grupo. Possivelmente, essa resposta é um mecanismo de cardioproteção na tentativa de prevenir um efeito trófico adicional ativado pela angiotensina sobre o tecido cardíaco. Lino, Shibata e Barreto-Chaves (2014) demonstraram redução na ativação de ECA no coração sem interferência sobre os níveis de Ang I e Ang II, em filhotes com hipertireoidismo em período gestacional. Entretanto, convém ressaltar que a amostra e o objetivo do estudo de Lino, Shibata e Barreto-Chaves (2014) foi completamente diferente do nosso e todas as tentativas de comparação entre os trabalhos relatados aqui tem apenas caráter especulativo.

Embora o corpo de evidências ainda seja escasso, alguns autores descrevem que o nível elevado de hormônio tireoidiano é capaz de aumentar a atividade da  $ECA_2$  e conseqüentemente a conversão em Ang 1-7. Além disso, esse mecanismo parece exercer funções contra-regulatórias no coração,

ativado pelo próprio SRA (Crackower *et al.*, 2002; Paul, Poyan Mehr e Kreutz, 2006; Barreto-Chaves *et al.*, 2010). Portanto, outra provável explicação para os nossos resultados seria o excesso de hormônio tireoidiano ter promovido maior atividade de ECA<sub>2</sub> aumentando a formação de Ang 1-7 no coração, em que o próprio SRA local serviu de gatilho, e dessa maneira, mantendo os níveis cardíacos de AngI/AngII. Assim, podemos observar que o SRA foi ativado nos animais de maneira dependente ao T<sub>3</sub>, porém o sistema renina-angiotensina não foi capaz de contribuir para a possível explicação a respeito das diferenças nos tipos de hipertrofia encontrada entre os grupos tratados com T<sub>3</sub>.

De maneira geral, os nossos dados demonstram que o tratamento com T<sub>3</sub> promoveu tipos diferentes de hipertrofia cardíaca, de forma dependente do  $\beta$ 1-AR, e também foi capaz de ativar o SRA só que de maneira independente da ativação adrenérgica. Contudo, com os resultados apresentados até aqui não é possível identificar uma explicação plausível que justifique o excesso de T<sub>3</sub> provocar hipertrofia excêntrica fisiológica nos animais selvagens e hipertrofia concêntrica patológica nos animais  $\beta$ 1KO.

Para alcançar uma possível explicação sobre os fenômenos observados até aqui, seria de grande valia a avaliação proteínas-chave envolvidas nas cascatas de sinalização celular ativadas durante o processo hipertrofia dos cardiomiócitos.

Ao dar início as análises moleculares foi necessário fazer a caracterização da via clássica de sinalização  $\beta$ 1-adrenérgica no modelo de animais com deleção para esse receptor ( $\beta$ 1KO), para certificar se as respostas relativas à ativação das vias intracelulares avaliadas na hipertrofia cardíaca seriam dependentes do papel desse receptor. É bem descrito que  $\beta$ 1-AR são acoplados a proteína G<sub>s</sub> e quando ativados faz com G<sub>os</sub> troque GDP por GTP (G<sub>os</sub>-GTP) e se separa dos dímeros  $\beta$ ,  $\gamma$  dando início a interação com adenilato ciclase, que culmina com a elevação da concentração intracelular de AMPc, e finalmente, aumento a atividade da PKA. Sendo assim, a estimulação do  $\beta$ 1-AR promove um aumento da atividade de PKA e este fato é bem conhecido na literatura (Devic *et al.*, 2001). Mediante esses dados, a resposta clássica esperada em animais com a ausência dos  $\beta$ 1-ARs seria a redução da ativação da PKA quando comparado aos animais selvagens (Devic *et al.*, 2001). De acordo com a literatura, os animais  $\beta$ 1KO apresentaram uma redução

significativa da ativação de PKA em comparação aos animais selvagens, caracterizando o nosso modelo animal. Cabe ressaltar ainda, que todos os animais foram previamente genotipados para evitar interferências nos resultados relativas a deleção ineficiente dos  $\beta$ 1-ARs. A partir de então foi possível focar nas principais proteínas envolvidas com a sinalização de hipertrofia cardíaca.

A ERK1/2 é uma proteína central do grupo das MAPK ativada no processo de diferenciação, multiplicação e crescimento celular, pela sua capacidade de fosforilar diversos fatores de transcrição, que induzem expressão de diversos genes no coração. Portanto, essa proteína desempenha um papel crucial nos estágios iniciais do desenvolvimento cardíaco (Harris *et al.*, 2004; Heineke e Molkentin, 2006; Purcell *et al.*, 2007; Ruppert *et al.*, 2013). Entretanto, na fase adulta a ativação adicional dessa via está diretamente associada com o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca patológica (Boulton *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2001; Harris *et al.*, 2004; Muslin, 2008). Adicionalmente, algumas evidências relatam que em quadros de excesso de HT a ativação da ERK1/2 pode acontecer de maneira direta (Pantos, Xinaris, *et al.*, 2007) ou indireta, através da ativação do SRA (Balakumar e Jagadeesh, 2010). Entretanto, esse efeito é contrabalançado pela estimulação concomitante dos  $\beta$ 1-ARs, que exercem uma ação inibitória sobre a ativação da ERK (Kim *et al.*, 2008). De acordo com os nossos resultados, a ERK1/2 estava elevada nos animais  $\beta$ 1KO com uma ativação adicional significativa no grupo tratado com  $T_3$ , sugerindo que a ausência do  $\beta$ 1-AR foi determinante para essa ativação expressiva da ERK1/2, durante a simulação do hipertireoidismo sistêmico. Os nossos dados estão em consonância com trabalhos de excelente qualidade metodológica, que demonstraram elevação significativa da ativação de ERK1/2 com o bloqueio funcional do  $\beta$ 1-AR (Kim *et al.*, 2008). Adicionalmente, a ativação expressiva de ERK1/2 na fase adulta está diretamente associada com o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca concêntrica patológica (Ruppert *et al.*, 2013).

Assim, os nossos dados até o momento demonstram que a ausência do  $\beta$ 1-AR promove uma ativação de ERK1/2 que é potencializado com o excesso de  $T_3$ , especificamente, nos animais que desenvolveram hipertrofia patológica. Sendo assim, um passo importante para a compreensão desse

fenômeno seria determinação da via de sinalização mediada pelo  $\beta$ 1-AR envolvida na inibição da ERK1/2. Para tanto, algumas proteínas envolvidas na sinalização hipertrófica de cardiomiócito foram avaliadas.

Devido os animais apresentar deleção para  $\beta$ 1-AR, a mensuração da atividade de PKA foi tomada como ponto inicial pela sua ativação ser intimamente mediada pela ativação adrenérgica. Classicamente, a estimulação dos  $\beta$ -ARs provoca o aumento de AMPc e, conseqüentemente, ativa PKA que é responsável por fosforilar canal de  $\text{Ca}^{++}$  do tipo L, canal de rianodina ( $\text{RyR}_2$ ) e fosfolambam, e assim coordenar o *turnover* de  $\text{Ca}^{++}$  citosólico, durante a contração e relaxamento cardíaco (Wallukat, 2002). O aumento do  $\text{Ca}^{++}$  citosólico induzido pela PKA ativa a calmodulina/calmodulina quinase (CAMK), por conseguinte a calcineurina e por fim a NFAT que aciona a maquinaria nuclear para hipertrofia cardíaca (Heineke e Molkentin, 2006; Bernardo *et al.*, 2010).

Como esperado, os animais  $\beta$ 1KO demonstraram redução na ativação da PKA quando comparados aos animais selvagens, porém sem nenhuma diferença intra-grupos. Isso denota que independentemente do tipo de hipertrofia cardíaca, esse efeito não foi relacionado com a participação da PKA. Uma constatação adicional desse fato pode ser retirada do trabalho de Zhang *et al.* (2013), onde observaram que frente a estímulos hipertróficos a redução da PKA estava envolvida com a cardioproteção e redução da hipertrofia. Como se observa em nossos dados, os animais com menor ativação da PKA apresentaram os maiores índices de hipertrofia cardíaca com característica patológica, o que poderia ser um fenômeno contra-regulatório, mas como não houve diferença entre os grupos, isso caracterizou que o sinal hipertrófico provocado pelo  $\text{T}_3$  não foi importante e que essa via não está diretamente envolvida nessa resposta.

Avaliar a via clássica associada ao crescimento e hipertrofia celular, através das proteínas *downstream* da via Akt/mTOR, seria outro alvo importante para que explicar as respostas hipertróficas mediadas pelo  $\beta$ 1-AR. Essa via encontra-se ativa de maneira fisiológica durante os processos de maturação e multiplicação dos cardiomiócitos no estágio fetal, assim como em processos hipertróficos induzidos pelo exercício na fase adulta (Tee e Blenis, 2005; Kemi *et al.*, 2008). Nesta direção, um alvo importante da via Akt/mTOR é



a ativação de 4E-BP1 que está amplamente envolvida nos processos de síntese proteica (Tee e Blenis, 2005). Entretanto, os nossos resultados apontam que não houve qualquer alteração intra-grupos da Akt e 4E-BP1, o que parece em um primeiro momento uma contradição, já que houve síntese de proteína nos grupos tratados com T<sub>3</sub>. No entanto, convém ressaltar que os processos hipertróficos induzidos por HT estão preferencialmente associados à fosforilação da p70<sup>S6K</sup>, que também é uma proteína alvo da via Akt/mTOR (Kenessey e Ojamaa, 2006), e que a hipertrofia pode acontecer sem qualquer alteração na fosforilação de 4E-BP1, independentemente da estimulação hipertrófica ser induzida por sinal patológico ou fisiológico, como descrito no estudo de Kemi *et al.* (2008).

Além disso, uma resposta bastante curiosa foi os animais  $\beta$ 1KO apresentaram níveis de 4E-BP1 significativamente maiores que os WT, indicando que essa via estava ativa mesmo no grupo que não hipertrofiou ( $\beta$ 1KO<sub>Sal</sub>). Isto possivelmente aconteceu, devido a deleção dos  $\beta$ 1-AR ter reduzido o nível intracelular de AMPc, indicado pela queda na ativação de PKA, o que diminuiu a ação inibitória do AMPc sobre a Akt ativando a fosforilação de 4E-BP1. Confirmando essa hipótese, Chruscinski *et al.* (2013) observaram que o AMPc possui uma ação inibitória sobre a via Akt/mTOR, e consequentemente, também sobre a fosforilação de 4E-BP1. Portanto, mediante aos nossos dados, observamos que a Akt não exerceu interferência no processo hipertrófico ativado por T<sub>3</sub>.

É descrito na literatura que a via das MAPKs está envolvida na sinalização celular relacionada tanto em resposta fisiológica quanto patológica. Como exemplo, a via p38-MAPK é descrita como um importante mediador de diversos processos biológicos, e especificamente no coração, essa via está envolvida com metabolismo energético, contratilidade, proliferação, apoptose e hipertrofia cardíaca. Muitos estudos relacionam a ativação da via p38-MAPK à respostas letais no coração, porém outros relatam que a ativação dessa via confere cardioproteção (Bassi *et al.*, 2008). Os nossos resultados demonstraram que a ativação da via p38-MAPK foi dependente da modulação exercida pelo  $\beta$ 1-AR, além de estar diretamente associada com o fenótipo de hipertrofia fisiológica observada no grupo WT<sub>T<sub>3</sub></sub>, frente ao estímulo hipertrófico induzido pelo T<sub>3</sub>. De maneira oposta, a p38 exibiu os menores níveis de

ativação nos animais *knockout* tratados com T<sub>3</sub>, exatamente, o mesmo grupo que desenvolveu hipertrofia concêntrica patológica. Para elucidar esses resultados, devemos destacar inicialmente, que a capacidade do hormônio tireoideano em ativar a p38 no coração é totalmente dependente da modulação do  $\beta$ 1-AR, corroborando os dados de Sabri *et al.* (2000), visto que na ausência desses receptores o grupo tratado com T<sub>3</sub> ( $\beta$ 1KO<sub>T3</sub>) exibiu os menores níveis de ativação dessa via. Devemos destacar ainda, que a ativação de p38 apresentou comportamento oposto ao de ERK1/2, o que nos leva a crer que a p38 por meio da ativação da fosfatase P2A (PP2A) exerceu um efeito inibitório sobre a ERK1/2 no coração, como descrito por Liu e Hofmann (2004). Como descrito anteriormente, somente os animais *knockout* tratados com T<sub>3</sub> apresentaram a maior ativação de ERK1/2 e a menor de p38, o que demonstra que o efeito contra-regulatório exercido pela p38 sobre a ERK1/2 foi reduzido, o que levou esses animais a desenvolverem hipertrofia cardíaca concêntrica patológica. Corroborando nossos resultados, Lorenz *et al.* (2009) descreveram que tanto em animais quanto em biopsias de corações humanos, o aumento da fosforilação de ERK leva a fosforilação de alvos nucleares o que promove a transcrição de genes relacionados à hipertrofia e esse fenômeno é crítico para o desenvolvimento da hipertrófica cardíaca patológica. Outra evidência que fortalece ainda mais a hipótese que a perda da capacidade contra-regulatória exercida da p38 sobre a ERK pode levar ao desenvolvimento de hipertrofia patológica, foi o grupo de animais com a p38 menos ativa exibir os maiores níveis de ANP cardíaco, o que também está diretamente relacionado com o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca concêntrica e patológica. Os nossos dados foram muito semelhantes aos descritos por Braz *et al.* (2003) em animais *knockout* para p38.

Sumarizando, podemos observar que a hipertrofia cardíaca induzida pelo T<sub>3</sub> é mediado pelo  $\beta$ 1-AR que ativa p38, a qual exerce seu efeito inibitório sobre ERK1/2, e desse modo regula o crescimento dos cardiomiócitos de maneira coordenada frente ao estímulo hipertrófico de curta duração.

Na perspectiva de discutir de forma translacional os resultados encontrados no presente estudo, devemos destacar que é amplamente recomendado o uso  $\beta$ -bloqueadores como tratamento padrão em indivíduos com hipertireoidismo, em doses que podem variar entre 80 e 320mg/dia

(Lennquist *et al.*, 1985; Adlerberth, Stenstrom e Hasselgren, 1987; Reid e Wheeler, 2005; Ogbera, 2010). Entretanto, observamos em nosso modelo experimental que a p38 inibe a ERK1/2 de maneira contra-regulatória, através da mediação do  $\beta$ 1-AR, e isso parece ser um mecanismo cardioprotetor que impede o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca patológica, frente a estímulos excitatórios, como no hipertireoidismo. Sendo assim, a utilização de  $\beta$ -bloqueadores no tratamento dessa doença poderia representar, de maneira linear, em mais riscos além de aumentar a possibilidade desse paciente desenvolver hipertrofia cardíaca com disfunção ventricular. Estudos experimentais que tiveram o propósito de avaliar o efeito de drogas  $\beta$ -bloqueadores sobre a sinalização celular em cardiomiócitos demonstraram que essas drogas aumentavam a ativação de ERK1/2 nos cardiomiócitos, e que essa resposta estava diretamente associada ao desenvolvimento de hipertrofia cardíaca patológica (Kim *et al.*, 2008; Ruppert *et al.*, 2013). No entanto, alguns  $\beta$ -bloqueadores promissores como o carvedilol são descritos na literatura como capazes de evitar o remodelamento cardíaco, porém não existe ainda um corpo de evidências que relatem seus efeitos em longo prazo na hipertrofia cardíaca induzida pelo hipertireoidismo em humanos. Drogas agonistas parciais  $\beta$ 1-adrenérgicas poderiam trazer benefícios no sentido de manter a integridade de vias contra regulatórias importantes e ao mesmo tempo evitarem os malefícios do bloqueio dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos exercidos pelos antagonistas. Apesar de teoricamente promissora, esta abordagem terapêutica deve ser mais bem investigada tanto em nível experimental (pré-clínico) como em ensaios clínicos. De qualquer forma, os resultados apresentados em nosso trabalho indicam que a redução da ativação dos  $\beta$ 1-ARs está associada ao desenvolvimento de hipertrofia cardíaca concêntrica com disfunção ventricular, o que levanta a suspeita que a utilização de bloqueadores dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta$ -bloqueadores), como estratégia de tratamento no hipertireoidismo, deve ser tomada com cautela pela possível desregulação no *crosstalk* entre as vias de sinalização celular, quando esses receptores são inativados.

Por fim acreditamos que os dados do presente trabalho traz uma importante contribuição para a fisiologia por apresentar novas propostas de sinalização celular na hipertrofia cardíaca, mediadas diretamente pelo  $\beta$ 1-AR,

ampliando os horizontes do conhecimento nessa área de investigação. Contudo, o desenvolvimento de novos desenhos metodológicos, bem como, avaliação de outras proteínas e cascatas de sinalização celular são condições *sine qua non* para confirmar as hipóteses levantadas pelo presente estudo e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas relacionadas à hipertrofia cardíaca.

## 9. CONCLUSÕES

- O  $T_3$  é capaz induzir hipertrofia cardíaca de maneira independente do  $\beta 1$ -AR;
- A participação do  $\beta 1$ -AR é determinante para a diferenciação do fenótipo hipertrófico induzido pelo  $T_3$ ;
- A ativação do sistema renina-angiotensina periférico e cardíaco pelo  $T_3$  é independente da participação do  $\beta 1$ -AR;
- A ativação da ERK1/2 frente a estímulo hipertrófico é modulada pelo  $\beta 1$ -AR através da ação inibitória exercida pela p38;
- A redução da atividade do  $\beta 1$ -AR frente à estimulação hipertrófica induzida por  $T_3$  diminui o efeito contra-regulatório da p38, o que causa aumento expressivo da ativação de ERK e elevação de ANP cardíaco culminando com o desenvolvimento da hipertrofia concêntrica patológica em camundongos.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, S. et al. The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. **J Biol Chem**, v. 276, n. 43, p. 39721-6, Oct 26 2001.

ACETO, J. F.; BAKER, K. M. [Sar1]angiotensin II receptor-mediated stimulation of protein synthesis in chick heart cells. **Am J Physiol**, v. 258, n. 3 Pt 2, p. H806-13, Mar 1990.

ADLERBERTH, A.; STENSTROM, G.; HASSELGREN, P. O. The selective beta 1-blocking agent metoprolol compared with antithyroid drug and thyroxine as preoperative treatment of patients with hyperthyroidism. Results from a prospective, randomized study. **Ann Surg**, v. 205, n. 2, p. 182-8, Feb 1987.

AHLQUIST, R. P. A study of the adrenotropic receptors. **Am J Physiol**, v. 153, n. 3, p. 586-600, Jun 1948.

AKHTER, S. A. et al. Targeting the receptor-Gq interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy. **Science**, v. 280, n. 5363, p. 574-7, Apr 24 1998.

ANTOS, C. L. et al. Activated glycogen synthase-3 beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 2, p. 907-12, Jan 22 2002.

AOKI, V. S.; WILSON, W. R.; THEILEN, E. O. Studies of the reputed augmentation of the cardiovascular effects of catecholamines in patients with spontaneous hyperthyroidism. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 181, n. 2, p. 362-8, May 1972.

ARAS, O. et al. The role and regulation of cardiac angiotensin-converting enzyme for noninvasive molecular imaging in heart failure. **Curr Cardiol Rep**, v. 9, n. 2, p. 150-8, Apr 2007.

ARAUJO, A. S. et al. Myocardial antioxidant enzyme activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism. **Mol Cell Endocrinol**, v. 249, n. 1-2, p. 133-9, Apr 25 2006.

ASAHI, T. et al. Cilazapril prevents cardiac hypertrophy and postischemic myocardial dysfunction in hyperthyroid rats. **Thyroid**, v. 11, n. 11, p. 1009-15, Nov 2001.

AUBERT, A. E. et al. The analysis of heart rate variability in unrestrained rats. Validation of method and results. **Comput Methods Programs Biomed**, v. 60, n. 3, p. 197-213, Nov 1999.

BADER, M.; GANTEN, D. Update on tissue renin-angiotensin systems. **J Mol Med (Berl)**, v. 86, n. 6, p. 615-21, Jun 2008.

BADORFF, C. et al. Fas receptor signaling inhibits glycogen synthase kinase 3 beta and induces cardiac hypertrophy following pressure overload. **J Clin Invest**, v. 109, n. 3, p. 373-81, Feb 2002.

BAINES, C. P.; MOLKENTIN, J. D. STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis. **J Mol Cell Cardiol**, v. 38, n. 1, p. 47-62, Jan 2005.

BALAKUMAR, P.; JAGADEESH, G. Multifarious molecular signaling cascades of cardiac hypertrophy: can the muddy waters be cleared? **Pharmacol Res**, v. 62, n. 5, p. 365-83, Nov 2010.

BARRETO-CHAVES, M. L. et al. The crosstalk between thyroid hormones and the Renin-Angiotensin System. **Vascul Pharmacol**, v. 52, n. 3-4, p. 166-70, Mar-Apr 2010.

BARROS, R. A.; OKOSHI, M. P.; CICOGNA, A. C. Via beta-adrenérgica em corações normais e hipertrofiados. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 72, n. 5, p. 641-656, 1999.

BASSET, A.; BLANC, J.; ELGHOZI, J. L. [Contribution of the renin-angiotensin system to blood pressure variability in hyperthyroid rats]. **Arch Mal Coeur Vaiss**, v. 93, n. 8, p. 905-10, Aug 2000.

BASSET, A. et al. Renin-angiotensin system contribution to cardiac hypertrophy in experimental hyperthyroidism: an echocardiographic study. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 37, n. 2, p. 163-72, Feb 2001.

BASSI, R. et al. Targeting p38-MAPK in the ischaemic heart: kill or cure? **Curr Opin Pharmacol**, v. 8, n. 2, p. 141-6, Apr 2008.

BEDOTTO, J. B. et al. Cardiac hypertrophy induced by thyroid hormone is independent of loading conditions and beta adrenoceptor blockade. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 248, n. 2, p. 632-6, Feb 1989.

BENOVIC, J. L. et al. Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein. **J Biol Chem**, v. 260, n. 11, p. 7094-101, Jun 10 1985.

BERNARDO, B. C. et al. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. **Pharmacol Ther**, v. 128, n. 1, p. 191-227, Oct 2010.

BIANCO, A. C.; KIM, B. W. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. **J Clin Invest**, v. 116, n. 10, p. 2571-9, Oct 2006.

BILEZIKIAN, J. P.; LOEB, J. N. The influence of hyperthyroidism and hypothyroidism on alpha- and beta-adrenergic receptor systems and adrenergic responsiveness. **Endocr Rev**, v. 4, n. 4, p. 378-88, Fall 1983.

BOCCHI, E. A. et al. III Diretriz brasileira de insuficiência cardíaca crônica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 93, n. 1, p. 3-70, 2009.

BOTELHO, L. M. et al. Plasma angiotensin(1-7) immunoreactivity is increased by salt load, water deprivation, and hemorrhage. **Peptides**, v. 15, n. 4, p. 723-9, 1994.

BOULTON, T. G. et al. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. **Cell**, v. 65, n. 4, p. 663-75, May 17 1991.

BRAVERMAN, L. E.; INGBAR, S. H.; STERLING, K. Conversion of thyroxine (T4) to triiodothyronine (T3) in athyreotic human subjects. **J Clin Invest**, v. 49, n. 5, p. 855-64, May 1970.

BRAZ, J. C. et al. Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin-NFAT signaling. **J Clin Invest**, v. 111, n. 10, p. 1475-86, May 2003.

BRILLA, C. G. et al. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. **J Mol Cell Cardiol**, v. 26, n. 7, p. 809-20, Jul 1994.

BROWER, G. L. et al. The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. **Eur J Cardiothorac Surg**, v. 30, n. 4, p. 604-10, Oct 2006.

BROWNE, G. J.; PROUD, C. G. Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells. **Eur J Biochem**, v. 269, n. 22, p. 5360-8, Nov 2002.

BUENO, O. F. et al. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. **EMBO J**, v. 19, n. 23, p. 6341-50, Dec 1 2000.

CANTLEY, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1655-7, May 31 2002.

CARNEIRO-RAMOS, M. S. et al. Blockage of angiotensin II type 2 receptor prevents thyroxine-mediated cardiac hypertrophy by blocking Akt activation. **Basic Res Cardiol**, v. 105, n. 3, p. 325-35, May 2010.

CARNEIRO-RAMOS, M. S. et al. Tissue-specific modulation of angiotensin-converting enzyme (ACE) in hyperthyroidism. **Peptides**, v. 27, n. 11, p. 2942-9, Nov 2006.

CHAI, S. Y. et al. The angiotensin IV/AT4 receptor. **Cell Mol Life Sci**, v. 61, n. 21, p. 2728-37, Nov 2004.



CHANOINE, J. P. et al. The thyroid gland is a major source of circulating T3 in the rat. **J Clin Invest**, v. 91, n. 6, p. 2709-13, Jun 1993.

CHEN, Z. et al. MAP kinases. **Chem Rev**, v. 101, n. 8, p. 2449-76, Aug 2001.

CHIEN, K. R. et al. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. **FASEB J**, v. 5, n. 15, p. 3037-46, Dec 1991.

CHILIAN, W. M. et al. Thyroxine-induced left ventricular hypertrophy in the rat. Anatomical and physiological evidence for angiogenesis. **Circ Res**, v. 57, n. 4, p. 591-8, Oct 1985.

CHING, G. W. et al. Cardiac hypertrophy as a result of long-term thyroxine therapy and thyrotoxicosis. **Heart**, v. 75, n. 4, p. 363-8, Apr 1996.

CHRUSCINSKI, A. J. et al. Broad-scale phosphoprotein profiling of beta adrenergic receptor (beta-AR) signaling reveals novel phosphorylation and dephosphorylation events. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e82164, 2013.

CLARK, J. E.; SARAFRAZ, N.; MARBER, M. S. Potential of p38-MAPK inhibitors in the treatment of ischaemic heart disease. **Pharmacol Ther**, v. 116, n. 2, p. 192-206, Nov 2007.

CLERK, A. et al. Peptide growth factors signal differentially through protein kinase C to extracellular signal-regulated kinases in neonatal cardiomyocytes. **Cell Signal**, v. 18, n. 2, p. 225-35, Feb 2006.

COHEN, J.; AROESTY, J. M.; ROSENFELD, M. G. Determinants of thyroxine-induced cardiac hypertrophy in mice. **Circ Res**, v. 18, n. 4, p. 388-97, Apr 1966.

COLLINS, K. A. et al. Accuracy of echocardiographic estimates of left ventricular mass in mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 280, n. 5, p. H1954-62, May 2001.

CONDORELLI, G. et al. Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 19, p. 12333-8, Sep 17 2002.

CONLON, I.; RAFF, M. Size control in animal development. **Cell**, v. 96, n. 2, p. 235-44, Jan 22 1999.

COOK, S. A.; SUGDEN, P. H.; CLERK, A. Activation of c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases in human heart failure secondary to ischaemic heart disease. **J Mol Cell Cardiol**, v. 31, n. 8, p. 1429-34, Aug 1999.

CRACKOWER, M. A. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. **Nature**, v. 417, n. 6891, p. 822-8, Jun 20 2002.

CRAFT-CORMNEY, C.; HANSEN, J. T. Early ultrastructural changes in the myocardium following thyroxine-induced hypertrophy. **Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol**, v. 33, n. 3, p. 267-73, 1980.

CROZATIER, B. et al. Species differences in myocardial beta-adrenergic receptor regulation in response to hyperthyroidism. **Circ Res**, v. 69, n. 5, p. 1234-43, Nov 1991.

D'ANGELO, D. D. et al. Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 15, p. 8121-6, Jul 22 1997.

DE PICOLI SOUZA, K.; NUNES, M. T. Neonatal hyper- and hypothyroidism alter the myoglobin gene expression program in adulthood. **Braz J Med Biol Res**, v. 47, n. 8, p. 670-8, Aug 2014.

DEBOSCH, B. et al. Akt1 is required for physiological cardiac growth. **Circulation**, v. 113, n. 17, p. 2097-104, May 2 2006.

DEVEREUX, R. B. Therapeutic options in minimizing left ventricular hypertrophy. **Am Heart J**, v. 139, n. 1 Pt 2, p. S9-14, Jan 2000.

DEVIC, E. et al. Beta-adrenergic receptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes from beta(1) and beta(2) adrenoceptor knockout mice. **Mol Pharmacol**, v. 60, n. 3, p. 577-83, Sep 2001.

DILLMANN, W. Cardiac hypertrophy and thyroid hormone signaling. **Heart Fail Rev**, v. 15, n. 2, p. 125-32, Mar 2010.

DILLMANN, W. H. Biochemical basis of thyroid hormone action in the heart. **Am J Med**, v. 88, n. 6, p. 626-30, Jun 1990.

DINIZ, G. P.; CARNEIRO-RAMOS, M. S.; BARRETO-CHAVES, M. L. Angiotensin type 1 (AT1) and type 2 (AT2) receptors mediate the increase in TGF-beta1 in thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy. **Pflugers Arch**, v. 454, n. 1, p. 75-81, Apr 2007.

\_\_\_\_\_. Angiotensin type 1 receptor mediates thyroid hormone-induced cardiomyocyte hypertrophy through the Akt/GSK-3beta/mTOR signaling pathway. **Basic Res Cardiol**, v. 104, n. 6, p. 653-67, Nov 2009.

\_\_\_\_\_. Thyroid Hormone Increases TGF-beta1 in Cardiomyocytes Cultures Independently of Angiotensin II Type 1 and Type 2 Receptors. **Int J Endocrinol**, v. 2010, p. 384890, 2010.

DIXON, R. A. et al. Structural features required for ligand binding to the beta-adrenergic receptor. **EMBO J**, v. 6, n. 11, p. 3269-75, Nov 1987.

DIXON, W. Processing data for outliers. **Biometrics**, v. 9, n. 1, p. 74-89, 1953.

DIXON, W. J. Analysis of extreme values. **The Annals of Mathematical Statistics**, p. 488-506, 1950.

\_\_\_\_\_. Ratios involving extreme values. **The Annals of Mathematical Statistics**, v. 22, n. 1, p. 68-78, 1951.

DOLBER, P. C.; SPACH, M. S. Conventional and confocal fluorescence microscopy of collagen fibers in the heart. **J Histochem Cytochem**, v. 41, n. 3, p. 465-9, Mar 1993.

DORN, G. W., 2ND. The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. **Hypertension**, v. 49, n. 5, p. 962-70, May 2007.

EGHBALI, M. et al. Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. **Circ Res**, v. 96, n. 11, p. 1208-16, Jun 10 2005.

ELIAS, P. C.; ELIAS, L. L.; MOREIRA, A. C. Padronização do teste de infusão de salina hipertônica para o diagnóstico do diabetes insípido com dosagem de vasopressina plasmática. **Arq. bras. endocrinol. metab**, v. 42, n. 3, p. 198-204, 1998.

FAGARD, R. H. Impact of different sports and training on cardiac structure and function. **Cardiol Clin**, v. 15, n. 3, p. 397-412, Aug 1997.

FAZIO, S. et al. Effects of thyroid hormone on the cardiovascular system. **Recent Prog Horm Res**, v. 59, p. 31-50, 2004.

FELDMAN, M. D. et al. Validation of a mouse conductance system to determine LV volume: comparison to echocardiography and crystals. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 279, n. 4, p. H1698-707, Oct 2000.

FENTZKE, R. C. et al. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice expressing a dominant-negative CREB transcription factor in the heart. **J Clin Invest**, v. 101, n. 11, p. 2415-26, Jun 1 1998.

FENTZKE, R. C. et al. The left ventricular stress-velocity relation in transgenic mice expressing a dominant negative CREB transgene in the heart. **J Am Soc Echocardiogr**, v. 14, n. 3, p. 209-18, Mar 2001.

FENTZKE, R. C. et al. Evaluation of ventricular and arterial hemodynamics in anesthetized closed-chest mice. **J Am Soc Echocardiogr**, v. 10, n. 9, p. 915-25, Nov-Dec 1997.

FERKEY, D. M.; KIMELMAN, D. GSK-3: new thoughts on an old enzyme. **Dev Biol**, v. 225, n. 2, p. 471-9, Sep 15 2000.

FITZSIMONS, J. T. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. **Physiol Rev**, v. 78, n. 3, p. 583-686, Jul 1998.

FRANCIS, G. S. et al. Comparison of neuroendocrine activation in patients with left ventricular dysfunction with and without congestive heart failure. A substudy of the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). **Circulation**, v. 82, n. 5, p. 1724-9, Nov 1990.

FREITAS, F. S. S. D. **Investigação das alterações cardiovasculares e microcirculatórias em um modelo de hipertireoidismo experimental**. 2011. Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Oswaldo Cruz

FUJISAKI, H. et al. Natriuretic peptides inhibit angiotensin II-induced proliferation of rat cardiac fibroblasts by blocking endothelin-1 gene expression. **J Clin Invest**, v. 96, n. 2, p. 1059-65, Aug 1995.

FURLAN, R. et al. Continuous 24-hour assessment of the neural regulation of systemic arterial pressure and RR variabilities in ambulant subjects. **Circulation**, v. 81, n. 2, p. 537-47, Feb 1990.

GARRINGTON, T. P.; JOHNSON, G. L. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. **Curr Opin Cell Biol**, v. 11, n. 2, p. 211-8, Apr 1999.

GEENEN, D. L.; MALHOTRA, A.; BUTTRICK, P. M. Angiotensin receptor 1 blockade does not prevent physiological cardiac hypertrophy in the adult rat. **J Appl Physiol (1985)**, v. 81, n. 2, p. 816-21, Aug 1996.

GINGRAS, A. C.; RAUGHT, B.; SONENBERG, N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. **Genes Dev**, v. 15, n. 7, p. 807-26, Apr 1 2001.

GLOSS, B. et al. Cardiac ion channel expression and contractile function in mice with deletion of thyroid hormone receptor alpha or beta. **Endocrinology**, v. 142, n. 2, p. 544-50, Feb 2001.

GOODFRIEND, T. L.; ELLIOTT, M. E.; CATT, K. J. Angiotensin receptors and their antagonists. **N Engl J Med**, v. 334, n. 25, p. 1649-54, Jun 20 1996.

GRAIS, I. M.; SOWERS, J. R. Thyroid and the Heart. **Am J Med**, v. 127, n. 8, p. 691-698, Aug 2014.

GRAVES, R. J. Newly observed affection of the thyroid gland in females. **Lond Med Surg J**, v. 7, n. Part 2, p. 516-517, 1835.

GREGORIO, C. C.; ANTIN, P. B. To the heart of myofibril assembly. **Trends Cell Biol**, v. 10, n. 9, p. 355-62, Sep 2000.

GRIMM, D. et al. Differential effects of growth hormone on cardiomyocyte and extracellular matrix protein remodeling following experimental myocardial infarction. **Cardiovasc Res**, v. 40, n. 2, p. 297-306, Nov 1998.

GRISANTI, L. A. et al. beta-Adrenergic receptor-mediated transactivation of epidermal growth factor receptor decreases cardiomyocyte apoptosis through

differential subcellular activation of ERK1/2 and Akt. **J Mol Cell Cardiol**, v. 72, p. 39-51, Jul 2014.

GROSSMAN, W.; JONES, D.; MCLAURIN, L. P. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. **J Clin Invest**, v. 56, n. 1, p. 56-64, Jul 1975.

GROSSMAN, W. et al. The enhanced myocardial contractility of thyrotoxicosis. Role of the beta adrenergic receptor. **Ann Intern Med**, v. 74, n. 6, p. 869-74, Jun 1971.

GUARNIERI, T. et al. Enhanced contractile response and protein kinase activation to threshold levels of beta-adrenergic stimulation in hyperthyroid rat heart. **J Clin Invest**, v. 65, n. 4, p. 861-8, Apr 1980.

GUTKIND, J. S. Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. **Oncogene**, v. 17, n. 11 Reviews, p. 1331-42, Sep 17 1998.

GUTKOWSKA, J. et al. Direct radioimmunoassay of atrial natriuretic factor. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 122, n. 2, p. 593-601, Jul 31 1984.

HAANWINCKEL, M. A. et al. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 17, p. 7902-6, Aug 15 1995.

HALL, J. E. Historical perspective of the renin-angiotensin system. **Mol Biotechnol**, v. 24, n. 1, p. 27-39, May 2003.

HAMMOND, H. K. et al. Increased myocardial beta-receptors and adrenergic responses in hyperthyroid pigs. **Am J Physiol**, v. 252, n. 2 Pt 2, p. H283-90, Feb 1987.

HAQ, S. et al. Glycogen synthase kinase-3beta is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. **J Cell Biol**, v. 151, n. 1, p. 117-30, Oct 2 2000.

HARADA, E. et al. Aldosterone induces angiotensin-converting-enzyme gene expression in cultured neonatal rat cardiocytes. **Circulation**, v. 104, n. 2, p. 137-9, Jul 10 2001.

HARDT, S. E.; SADOSHIMA, J. Glycogen synthase kinase-3beta: a novel regulator of cardiac hypertrophy and development. **Circ Res**, v. 90, n. 10, p. 1055-63, May 31 2002.

HARRIS, I. S. et al. Raf-1 kinase is required for cardiac hypertrophy and cardiomyocyte survival in response to pressure overload. **Circulation**, v. 110, n. 6, p. 718-23, Aug 10 2004.

HARWOOD, A. J. Regulation of GSK-3: a cellular multiprocessor. **Cell**, v. 105, n. 7, p. 821-4, Jun 29 2001.

HEIN, L. et al. Overexpression of angiotensin AT1 receptor transgene in the mouse myocardium produces a lethal phenotype associated with myocyte hyperplasia and heart block. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 12, p. 6391-6, Jun 10 1997.

HEINEKE, J.; MOLKENTIN, J. D. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 7, n. 8, p. 589-600, Aug 2006.

HOIT, B. D. et al. Effects of thyroid hormone on cardiac beta-adrenergic responsiveness in conscious baboons. **Circulation**, v. 96, n. 2, p. 592-8, Jul 15 1997.

HOUSER, S. R. et al. Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association. **Circ Res**, v. 111, n. 1, p. 131-50, Jun 22 2012.

HU, L. W. et al. Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: influence of adrenergic nervous system versus renin-angiotensin system on myocyte remodeling. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 285, n. 6, p. R1473-80, Dec 2003.

HU, L. W.; LIBERTI, E. A.; BARRETO-CHAVES, M. L. Myocardial ultrastructure in cardiac hypertrophy induced by thyroid hormone--an acute study in rats. **Virchows Arch**, v. 446, n. 3, p. 265-9, Mar 2005.

HUNTER, J. J. et al. Ventricular expression of a MLC-2v-ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice. **J Biol Chem**, v. 270, n. 39, p. 23173-8, Sep 29 1995.

IMPÉRIO, G. E. **INVESTIGAÇÃO DA HIPERTROFIA CARDÍACA MEDIADA PELO RECEPTOR PARA HORMÔNIO TIREOIDIANO BETA: POSSÍVEL PAPEL DE microRNAs**. 2013. 89 Mestrado Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

JIANG, Y. et al. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. **J Biol Chem**, v. 272, n. 48, p. 30122-8, Nov 28 1997.

KAHALY, G. J.; DILLMANN, W. H. Thyroid hormone action in the heart. **Endocr Rev**, v. 26, n. 5, p. 704-28, Aug 2005.

KANNEL, W. B. Role of blood pressure in cardiovascular morbidity and mortality. **Prog Cardiovasc Dis**, v. 17, n. 1, p. 5-24, Jul-Aug 1974.

KAPLAN, M. L. et al. Cardiac adaptations to chronic exercise in mice. **Am J Physiol**, v. 267, n. 3 Pt 2, p. H1167-73, Sep 1994.

KEMI, O. J. et al. Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. **J Cell Physiol**, v. 214, n. 2, p. 316-21, Feb 2008.

KENESSEY, A.; OJAMAA, K. Thyroid hormone stimulates protein synthesis in the cardiomyocyte by activating the Akt-mTOR and p70S6K pathways. **J Biol Chem**, v. 281, n. 30, p. 20666-72, Jul 28 2006.

KENESSEY, A.; SULLIVAN, E. A.; OJAMAA, K. Nuclear localization of protein kinase C-alpha induces thyroid hormone receptor-alpha1 expression in the cardiomyocyte. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 290, n. 1, p. H381-9, Jan 2006.

KIM, I. M. et al. Beta-blockers alprenolol and carvedilol stimulate beta-arrestin-mediated EGFR transactivation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 38, p. 14555-60, Sep 23 2008.

KINUGAWA, K. et al. Thyroid hormone induces cardiac myocyte hypertrophy in a thyroid hormone receptor alpha1-specific manner that requires TAK1 and p38 mitogen-activated protein kinase. **Mol Endocrinol**, v. 19, n. 6, p. 1618-28, Jun 2005.

KIRIAZIS, H. et al. Hypertrophy and functional alterations in hyperdynamic phospholamban-knockout mouse hearts under chronic aortic stenosis. **Cardiovasc Res**, v. 53, n. 2, p. 372-81, Feb 1 2002.

KLEIN, I.; OJAMAA, K. Thyrotoxicosis and the heart. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 27, n. 1, p. 51-62, Mar 1998.

KNOWLES, J. W. et al. Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in natriuretic peptide receptor A-deficient mice. **J Clin Invest**, v. 107, n. 8, p. 975-84, Apr 2001.

KOBORI, H. et al. Thyroid hormone stimulates renin synthesis in rats without involving the sympathetic nervous system. **Am J Physiol**, v. 272, n. 2 Pt 1, p. E227-32, Feb 1997.

KOBORI, H. et al. Role of the renin-angiotensin system in cardiac hypertrophy induced in rats by hyperthyroidism. **Am J Physiol**, v. 273, n. 2 Pt 2, p. H593-9, Aug 1997.

KOCH, W. J. et al. Cardiac function in mice overexpressing the beta-adrenergic receptor kinase or a beta ARK inhibitor. **Science**, v. 268, n. 5215, p. 1350-3, Jun 2 1995.

KOHN, L. D. et al. The thyrotropin receptor. **Vitam Horm**, v. 50, p. 287-384, 1995.

KOHNO, M. et al. Atrial natriuretic polypeptide in atria and plasma in experimental hyperthyroidism and hypothyroidism. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 134, n. 1, p. 178-83, Jan 14 1986.

KOHRLE, J. The selenoenzyme family of deiodinase isozymes controls local thyroid hormone availability. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 1, n. 1-2, p. 49-58, Jan 2000.

KOSTENIS, E. et al. G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. **Circulation**, v. 111, n. 14, p. 1806-13, Apr 12 2005.

KOUKOULIS, G. et al. Normalization of thyroid hormone levels in patients with either hyper- or hypothyroidism results in a profound change of atrial natriuretic peptide (ANP) levels. **Hormones (Athens)**, v. 1, n. 2, p. 104-12, Apr-Jun 2002.

KOZIRIS, L. P. et al. Serum levels of total and free IGF-I and IGFBP-3 are increased and maintained in long-term training. **J Appl Physiol (1985)**, v. 86, n. 4, p. 1436-42, Apr 1999.

KUZMAN, J. A. et al. Thyroid hormone activates Akt and prevents serum starvation-induced cell death in neonatal rat cardiomyocytes. **J Mol Cell Cardiol**, v. 39, n. 5, p. 841-4, Nov 2005.

KUZMAN, J. A.; O'CONNELL, T. D.; GERDES, A. M. Rapamycin prevents thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy. **Endocrinology**, v. 148, n. 7, p. 3477-84, Jul 2007.

KUZMAN, J. A. et al. L-Thyroxine activates Akt signaling in the heart. **J Mol Cell Cardiol**, v. 39, n. 2, p. 251-8, Aug 2005.

LAEMMLI, U. K.; BEGUIN, F.; GUJER-KELLENBERGER, G. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. **J Mol Biol**, v. 47, n. 1, p. 69-85, Jan 14 1970.

LARSEN, P.; DAVIES, T.; HAY, I. The thyroid gland in Williams Textbook of Endocrinology, ed. **JD Wilson, DW Foster, HM Kronenberg and PR Larson, Saunders, Philadelphia**, p. 390-515, 1998.

LEFKOWITZ, R. J. G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. **J Biol Chem**, v. 273, n. 30, p. 18677-80, Jul 24 1998.

LEMKE, L. E. et al. Decreased p38 MAPK activity in end-stage failing human myocardium: p38 MAPK alpha is the predominant isoform expressed in human heart. **J Mol Cell Cardiol**, v. 33, n. 8, p. 1527-40, Aug 2001.

LENNQUIST, S. et al. Betablockers compared with antithyroid drugs as preoperative treatment in hyperthyroidism: drug tolerance, complications, and postoperative thyroid function. **Surgery**, v. 98, n. 6, p. 1141-7, Dec 1985.



LEVY, D. et al. Echocardiographically detected left ventricular hypertrophy: prevalence and risk factors. The Framingham Heart Study. **Ann Intern Med**, v. 108, n. 1, p. 7-13, Jan 1988.

LEVY, D. et al. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. **N Engl J Med**, v. 322, n. 22, p. 1561-6, May 31 1990.

LIAO, P. et al. The in vivo role of p38 MAP kinases in cardiac remodeling and restrictive cardiomyopathy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 21, p. 12283-8, Oct 9 2001.

LIGGETT, S. B. Polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor. **N Engl J Med**, v. 346, n. 7, p. 536-8, Feb 14 2002.

LIGGETT, S. B.; SHAH, S. D.; CRYER, P. E. Increased fat and skeletal muscle beta-adrenergic receptors but unaltered metabolic and hemodynamic sensitivity to epinephrine in vivo in experimental human thyrotoxicosis. **J Clin Invest**, v. 83, n. 3, p. 803-9, Mar 1989.

LINO, C. A.; SHIBATA, C. E.; BARRETO-CHAVES, M. L. Maternal hyperthyroidism alters the pattern of expression of cardiac renin-angiotensin system components in rat offspring. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v. 15, n. 1, p. 52-60, Mar 2014.

LIU, J. et al. Pressure overload induces greater hypertrophy and mortality in female mice with p38alpha MAPK inhibition. **J Mol Cell Cardiol**, v. 41, n. 4, p. 680-8, Oct 2006.

LIU, Q.; HOFMANN, P. A. Protein phosphatase 2A-mediated cross-talk between p38 MAPK and ERK in apoptosis of cardiac myocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 286, n. 6, p. H2204-12, Jun 2004.

LORENZ, K. et al. A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. **Nat Med**, v. 15, n. 1, p. 75-83, Jan 2009.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov 1951.

LUO, J. et al. Class IA phosphoinositide 3-kinase regulates heart size and physiological cardiac hypertrophy. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 21, p. 9491-502, Nov 2005.

MAILLET, M.; VAN BERLO, J. H.; MOLKENTIN, J. D. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 14, n. 1, p. 38-48, Jan 2013.

MARCHANT, C.; BROWN, L.; SERNIA, C. Renin-angiotensin system in thyroid dysfunction in rats. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 22, n. 3, p. 449-55, Sep 1993.

MARTIN, K. A.; BLENIS, J. Coordinate regulation of translation by the PI 3-kinase and mTOR pathways. **Adv Cancer Res**, v. 86, p. 1-39, 2002.

MARTIN, W. H., 3RD; SPINA, R. J.; KORTE, E. Effect of hyperthyroidism of short duration on cardiac sensitivity to beta-adrenergic stimulation. **J Am Coll Cardiol**, v. 19, n. 6, p. 1185-91, May 1992.

MATSUDA, T. et al. Distinct roles of GSK-3alpha and GSK-3beta phosphorylation in the heart under pressure overload. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 52, p. 20900-5, Dec 30 2008.

MATSUI, T. et al. Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart. **J Biol Chem**, v. 277, n. 25, p. 22896-901, Jun 21 2002.

MCDONOUGH, K. H.; CHEN, V.; SPITZER, J. J. Effect of altered thyroid status on in vitro cardiac performance in rats. **Am J Physiol**, v. 252, n. 4 Pt 2, p. H788-95, Apr 1987.

MCMULLEN, J. R.; JENNINGS, G. L. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 34, n. 4, p. 255-62, Apr 2007.

MCMULLEN, J. R. et al. Inhibition of mTOR signaling with rapamycin regresses established cardiac hypertrophy induced by pressure overload. **Circulation**, v. 109, n. 24, p. 3050-5, Jun 22 2004.

MCMULLEN, J. R. et al. The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) pathway. **J Biol Chem**, v. 279, n. 6, p. 4782-93, Feb 6 2004.

MCMULLEN, J. R. et al. Deletion of ribosomal S6 kinases does not attenuate pathological, physiological, or insulin-like growth factor 1 receptor-phosphoinositide 3-kinase-induced cardiac hypertrophy. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 14, p. 6231-40, Jul 2004.

MCMULLEN, J. R. et al. Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 21, p. 12355-60, Oct 14 2003.

MELMED, S. et al. **Williams textbook of endocrinology: Expert consult**. Elsevier Health Sciences, 2011.

MENDE, U. et al. Transient cardiac expression of constitutively active Galphaq leads to hypertrophy and dilated cardiomyopathy by calcineurin-dependent and independent pathways. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 23, p. 13893-8, Nov 10 1998.

MERILLON, J. P. et al. Left ventricular function and hyperthyroidism. **Br Heart J**, v. 46, n. 2, p. 137-43, Aug 1981.

MEYER, E. L.; WAGNER, M. S.; MAIA, A. L. [Iodothyronine deiodinases expression in thyroid neoplasias]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 51, n. 5, p. 690-700, Jul 2007.

MILL, J. G.; VASSALLO, D. V. Hipertrofia cardíaca. **Rev. Bras. Hipertens**, v. 8, p. 63-75, 2001.

MINTZ, G.; PIZZARELLO, R.; KLEIN, I. Enhanced left ventricular diastolic function in hyperthyroidism: noninvasive assessment and response to treatment. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 73, n. 1, p. 146-50, Jul 1991.

MIRCOLI, L. et al. Preservation of the baroreceptor heart rate reflex by chemical sympathectomy in experimental heart failure. **Circulation**, v. 106, n. 7, p. 866-72, Aug 13 2002.

MOLKENTIN, J. D. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. **Cardiovasc Res**, v. 63, n. 3, p. 467-75, Aug 15 2004.

MONTERA, M. W. et al. II Diretriz brasileira de insuficiência cardíaca aguda. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 93, n. 3, p. 2-65, 2009.

MOR-AVI, V. et al. Quantitative evaluation of left ventricular function in a Transgenic Mouse model of dilated cardiomyopathy with 2-dimensional contrast echocardiography. **J Am Soc Echocardiogr**, v. 12, n. 3, p. 209-14, Mar 1999.

MORGAN, H. E. et al. Biochemical mechanisms of cardiac hypertrophy. **Annu Rev Physiol**, v. 49, p. 533-43, 1987.

MORISCO, C. et al. Glycogen synthase kinase 3beta regulates GATA4 in cardiac myocytes. **J Biol Chem**, v. 276, n. 30, p. 28586-97, Jul 27 2001.

MORISCO, C. et al. The Akt-glycogen synthase kinase 3beta pathway regulates transcription of atrial natriuretic factor induced by beta-adrenergic receptor stimulation in cardiac myocytes. **J Biol Chem**, v. 275, n. 19, p. 14466-75, May 12 2000.

MORISHITA, R. et al. Single intraluminal delivery of antisense cdc2 kinase and proliferating-cell nuclear antigen oligonucleotides results in chronic inhibition of neointimal hyperplasia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 18, p. 8474-8, Sep 15 1993.

MORKIN, E.; FLINK, I. L.; GOLDMAN, S. Biochemical and physiologic effects of thyroid hormone on cardiac performance. **Prog Cardiovasc Dis**, v. 25, n. 5, p. 435-64, Mar-Apr 1983.

MULLUR, R.; LIU, Y. Y.; BRENT, G. A. Thyroid hormone regulation of metabolism. **Physiol Rev**, v. 94, n. 2, p. 355-82, Apr 2014.

MUSLIN, A. J. MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. **Clin Sci (Lond)**, v. 115, n. 7, p. 203-18, Oct 2008.

NAKAO, K. et al. The natriuretic peptide family. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 5, n. 1, p. 4-11, Jan 1996.

NEER, E. J.; CLAPHAM, D. E. Roles of G protein subunits in transmembrane signalling. **Nature**, v. 333, n. 6169, p. 129-34, May 12 1988.

NERI SERNERI, G. G. et al. Increased cardiac sympathetic activity and insulin-like growth factor-I formation are associated with physiological hypertrophy in athletes. **Circ Res**, v. 89, n. 11, p. 977-82, Nov 23 2001.

NICOLINI, G. et al. New insights into mechanisms of cardioprotection mediated by thyroid hormones. **J Thyroid Res**, v. 2013, p. 264387, 2013.

NISHIDA, K. et al. p38alpha mitogen-activated protein kinase plays a critical role in cardiomyocyte survival but not in cardiac hypertrophic growth in response to pressure overload. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 24, p. 10611-20, Dec 2004.

OGBERA, A. O. A two-year audit of thyroid disorders in an urban hospital in Nigeria. **Nig Q J Hosp Med**, v. 20, n. 2, p. 81-5, Apr-Jun 2010.

OJAMAA, K. Signaling mechanisms in thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy. **Vascul Pharmacol**, v. 52, n. 3-4, p. 113-9, Mar-Apr 2010.

OJAMAA, K. et al. Changes in adenylyl cyclase isoforms as a mechanism for thyroid hormone modulation of cardiac beta-adrenergic receptor responsiveness. **Metabolism**, v. 49, n. 2, p. 275-9, Feb 2000.

OLIVER, P. M. et al. Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 26, p. 14730-5, Dec 23 1997.

OLIVER, P. M. et al. Natriuretic peptide receptor 1 expression influences blood pressures of mice in a dose-dependent manner. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 5, p. 2547-51, Mar 3 1998.

OLSON, E. N.; SCHNEIDER, M. D. Sizing up the heart: development redux in disease. **Genes Dev**, v. 17, n. 16, p. 1937-56, Aug 15 2003.

OPIE, L. H. **Heart physiology: from cell to circulation**. Lippincott Williams & Wilkins, 2004.

OPIE, L. H.; SWYNGHEDAUW, B. **The heart: physiology and metabolism.** Raven Press New York, 1991.

OTTEN, J. V. et al. Thyrotoxic myopathy in mice: accentuation by a creatine transport inhibitor. **Metabolism**, v. 35, n. 6, p. 481-4, Jun 1986.

PACHUCKI, J. et al. Type 2 iodothyronin deiodinase transgene expression in the mouse heart causes cardiac-specific thyrotoxicosis. **Endocrinology**, v. 142, n. 1, p. 13-20, Jan 2001.

PANTOS, C.; MOUROUZIS, I.; COKKINOS, D. V. Thyroid hormone and cardiac repair/regeneration: from Prometheus myth to reality? **Can J Physiol Pharmacol**, v. 90, n. 8, p. 977-87, Aug 2012.

PANTOS, C. et al. Thyroid hormone attenuates cardiac remodeling and improves hemodynamics early after acute myocardial infarction in rats. **Eur J Cardiothorac Surg**, v. 32, n. 2, p. 333-9, Aug 2007.

PANTOS, C. et al. Thyroid hormone and "cardiac metamorphosis": potential therapeutic implications. **Pharmacol Ther**, v. 118, n. 2, p. 277-94, May 2008.

PANTOS, C. et al. Blockade of angiotensin II type 1 receptor diminishes cardiac hypertrophy, but does not abolish thyroxin-induced preconditioning. **Horm Metab Res**, v. 37, n. 8, p. 500-4, Aug 2005.

PANTOS, C. et al. Thyroid hormone changes cardiomyocyte shape and geometry via ERK signaling pathway: potential therapeutic implications in reversing cardiac remodeling? **Mol Cell Biochem**, v. 297, n. 1-2, p. 65-72, Mar 2007.

PARMENTIER, M. et al. Molecular cloning of the thyrotropin receptor. **Science**, v. 246, n. 4937, p. 1620-2, Dec 22 1989.

PARRY, C. H. **Collections from the Unpublished Medical Writings of the Late Caleb Hillier Parry.** Underwoods, 1825.

PAUL, M.; POYAN MEHR, A.; KREUTZ, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. **Physiol Rev**, v. 86, n. 3, p. 747-803, Jul 2006.

PENG, J. et al. Tumor necrosis factor-alpha-induced AT1 receptor upregulation enhances angiotensin II-mediated cardiac fibroblast responses that favor fibrosis. **Circ Res**, v. 91, n. 12, p. 1119-26, Dec 13 2002.

PEREIRA-JUNIOR, P. P. et al. Cardiac autonomic dysfunction in rats chronically treated with anabolic steroid. **Eur J Appl Physiol**, v. 96, n. 5, p. 487-94, Mar 2006.

PETRICH, B. G.; WANG, Y. Stress-activated MAP kinases in cardiac remodeling and heart failure; new insights from transgenic studies. **Trends Cardiovasc Med**, v. 14, n. 2, p. 50-5, Feb 2004.

PLUIM, B. M. et al. The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. **Circulation**, v. 101, n. 3, p. 336-44, Jan 25 2000.

PROUD, C. G. Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy. **Cardiovasc Res**, v. 63, n. 3, p. 403-13, Aug 15 2004.

PURCELL, N. H. et al. Genetic inhibition of cardiac ERK1/2 promotes stress-induced apoptosis and heart failure but has no effect on hypertrophy in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 35, p. 14074-9, Aug 28 2007.

PURNOMO, Y. et al. Oxidative stress and transforming growth factor-beta1-induced cardiac fibrosis. **Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets**, v. 13, n. 2, p. 165-72, Aug 2013.

RAPACCIUOLO, A.; ROCKMAN, H. A. Role of  $\beta$ -Adrenoceptor Desensitization in Heart Failure. **Cardiovascular drug reviews**, v. 17, n. 4, p. 384-394, 1999.

REID, J. R.; WHEELER, S. F. Hyperthyroidism: diagnosis and treatment. **Am Fam Physician**, v. 72, n. 4, p. 623-30, Aug 15 2005.

REISS, K. et al. Overexpression of insulin-like growth factor-1 in the heart is coupled with myocyte proliferation in transgenic mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 16, p. 8630-5, Aug 6 1996.

ROHRER, D. K. Physiological consequences of beta-adrenergic receptor disruption. **J Mol Med (Berl)**, v. 76, n. 11, p. 764-72, Oct 1998.

ROHRER, D. K. et al. Targeted disruption of the mouse beta1-adrenergic receptor gene: developmental and cardiovascular effects. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 14, p. 7375-80, Jul 9 1996.

ROMERO-CALVO, I. et al. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. **Anal Biochem**, v. 401, n. 2, p. 318-20, Jun 15 2010.

ROTA, M. et al. Nuclear targeting of Akt enhances ventricular function and myocyte contractility. **Circ Res**, v. 97, n. 12, p. 1332-41, Dec 9 2005.

RUPPERT, C. et al. Interference with ERK(Thr188) phosphorylation impairs pathological but not physiological cardiac hypertrophy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 18, p. 7440-5, Apr 30 2013.

SABRI, A. et al. Coupling function of endogenous alpha(1)- and beta-adrenergic receptors in mouse cardiomyocytes. **Circ Res**, v. 86, n. 10, p. 1047-53, May 26 2000.

SANNA, B. et al. Direct and indirect interactions between calcineurin-NFAT and MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathways regulate

cardiac gene expression and cellular growth. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 3, p. 865-78, Feb 2005.

SANTOS, R. A.; FERREIRA, A. J. Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 16, n. 2, p. 122-8, Mar 2007.

SAUL, J. P. Beat-to-beat variations of heart rate reflect modulation of cardiac autonomic outflow. **News Physiol Sci**, v. 5, n. 1, p. 32-37, 1990.

SAYER, G.; BHAT, G. The renin-angiotensin-aldosterone system and heart failure. **Cardiol Clin**, v. 32, n. 1, p. 21-32, vii, Feb 2014.

SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v. 103, n. 2, p. 211-25, Oct 13 2000.

SCHLUTER, K. D.; WENZEL, S. Angiotensin II: a hormone involved in and contributing to pro-hypertrophic cardiac networks and target of anti-hypertrophic cross-talks. **Pharmacol Ther**, v. 119, n. 3, p. 311-25, Sep 2008.

SCHMIDT-OTT, U. M.; ASCHEIM, D. D. Thyroid hormone and heart failure. **Curr Heart Fail Rep**, v. 3, n. 3, p. 114-9, Sep 2006.

SEIDMAN, J. G.; SEIDMAN, C. The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 557-67, Feb 23 2001.

SERNIA, C. et al. Cardiac angiotensin receptors in experimental hyperthyroidism in dogs. **Cardiovasc Res**, v. 27, n. 3, p. 423-8, Mar 1993.

SHIOI, T. et al. The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. **EMBO J**, v. 19, n. 11, p. 2537-48, Jun 1 2000.

SHIOI, T. et al. Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. **Mol Cell Biol**, v. 22, n. 8, p. 2799-809, Apr 2002.

SHIOI, T. et al. Rapamycin attenuates load-induced cardiac hypertrophy in mice. **Circulation**, v. 107, n. 12, p. 1664-70, Apr 1 2003.

SHIRAISHI, I. et al. Nuclear targeting of Akt enhances kinase activity and survival of cardiomyocytes. **Circ Res**, v. 94, n. 7, p. 884-91, Apr 16 2004.

SHUPNIK, M. A.; RIDGWAY, E. C.; CHIN, W. W. Molecular biology of thyrotropin. **Endocr Rev**, v. 10, n. 4, p. 459-75, Nov 1989.

SIBLEY, D. R. et al. Phosphorylation/dephosphorylation of the beta-adrenergic receptor regulates its functional coupling to adenylate cyclase and subcellular distribution. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 83, n. 24, p. 9408-12, Dec 1986.

SILVEIRA, A. L. et al. Sexual dimorphism in autonomic changes and in the renin-angiotensin system in the hearts of mice subjected to thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy. **Exp Physiol**, v. 99, n. 6, p. 868-80, Jun 2014.

SIMONCINI, T. et al. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. **Nature**, v. 407, n. 6803, p. 538-41, Sep 28 2000.

SJAASTAD, I. et al. Echocardiographic criteria for detection of postinfarction congestive heart failure in rats. **J Appl Physiol (1985)**, v. 89, n. 4, p. 1445-54, Oct 2000.

SMANIK, P. A. et al. Cloning of the human sodium iodide symporter. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 226, n. 2, p. 339-45, Sep 13 1996.

SOONPAA, M. H. et al. Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. **Am J Physiol**, v. 271, n. 5 Pt 2, p. H2183-9, Nov 1996.

SORIANO, P. et al. Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. **Cell**, v. 64, n. 4, p. 693-702, Feb 22 1991.

STOLL, M. et al. The angiotensin AT<sub>2</sub>-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. **J Clin Invest**, v. 95, n. 2, p. 651-7, Feb 1995.

STRADER, C. D. et al. Identification of two serine residues involved in agonist activation of the beta-adrenergic receptor. **J Biol Chem**, v. 264, n. 23, p. 13572-8, Aug 15 1989.

SUGDEN, P. H.; CLERK, A. "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. **Circ Res**, v. 83, n. 4, p. 345-52, Aug 24 1998.

SUSSMAN, M. A. et al. Myocardial AKT: the omnipresent nexus. **Physiol Rev**, v. 91, n. 3, p. 1023-70, Jul 2011.

TAMURA, N. et al. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 8, p. 4239-44, Apr 11 2000.

TANIYAMA, Y. et al. Akt3 overexpression in the heart results in progression from adaptive to maladaptive hypertrophy. **J Mol Cell Cardiol**, v. 38, n. 2, p. 375-85, Feb 2005.

TEE, A. R.; BLENIS, J. mTOR, translational control and human disease. **Semin Cell Dev Biol**, v. 16, n. 1, p. 29-37, Feb 2005.

TILLEY, D. G. G protein-dependent and G protein-independent signaling pathways and their impact on cardiac function. **Circ Res**, v. 109, n. 2, p. 217-30, Jul 8 2011.



TOKER, A.; CANTLEY, L. C. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. **Nature**, v. 387, n. 6634, p. 673-6, Jun 12 1997.

TOMANEK, R. J.; BUSCH, T. L. Coordinated capillary and myocardial growth in response to thyroxine treatment. **Anat Rec**, v. 251, n. 1, p. 44-9, May 1998.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 76, n. 9, p. 4350-4, Sep 1979.

TSAI, J. S.; CHEN, A. Effect of L-triiodothyronine on (–)-3H-dihydroalprenolol binding and cyclic AMP response to (–)-adrenaline in cultured heart cells. **Nature**, v. 275, n. 5676, p. 138-40, Sep 14 1978.

UETA, C. B. et al. Absence of myocardial thyroid hormone inactivating deiodinase results in restrictive cardiomyopathy in mice. **Mol Endocrinol**, v. 26, n. 5, p. 809-18, May 2012.

UNGER, T. The angiotensin type 2 receptor: variations on an enigmatic theme. **J Hypertens**, v. 17, n. 12 Pt 2, p. 1775-86, Dec 1999.

URATA, H.; NISHIMURA, H.; GANTEN, D. Chymase-dependent angiotensin II forming systems in humans. **Am J Hypertens**, v. 9, n. 3, p. 277-84, Mar 1996.

VAKILI, B. A.; OKIN, P. M.; DEVEREUX, R. B. Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. **Am Heart J**, v. 141, n. 3, p. 334-41, Mar 2001.

VAN DIJK-OTTENS, M. et al. Thyroid hormone-induced cardiac mechano growth factor expression depends on beating activity. **Endocrinology**, v. 151, n. 2, p. 830-8, Feb 2010.

VAN KATS, J. P. et al. Angiotensin production by the heart: a quantitative study in pigs with the use of radiolabeled angiotensin infusions. **Circulation**, v. 98, n. 1, p. 73-81, Jul 7 1998.

VAN ROOIJ, E. et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 35, p. 13027-32, Sep 2 2008.

VANDERLEI, L. C. M. et al. Noções básicas de variabilidade da frequência cardíaca e sua aplicabilidade clínica. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, v. 24, n. 2, p. 205-17, 2009.

VECSEI, P. Glucocorticoids: cortisol, cortisone, corticosterone, compound S, and their metabolites. **Methods of hormone radioimmunoassays**. Academic Press, New York, p. 767-792, 1979.

VERMA, P.; NOBLE, S.; MILLER, R. Effect of L-thyroxine on serum angiotensin converting enzyme activity in sheep. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 13, n. 8, p. 609-12, Aug 1986.

VERMA, S. P.; QUIROZ-RUIZ, A. Critical values for six Dixon tests for outliers in normal samples up to sizes 100, and applications in science and engineering. **Revista Mexicana de Ciencias Geológicas**, v. 23, n. 2, p. 133-161, 2006.

VEZYRAKI, P.; KALFAKAKOU, V.; EVANGELOU, A. Atrial natriuretic peptide and thyroid hormones' relation to plasma and heart calcium and magnesium concentrations of Wistar rats exposed to cold and hot ambients. **Biol Trace Elem Res**, v. 73, n. 2, p. 163-73, Feb 2000.

WAKATSUKI, T.; SCHLESSINGER, J.; ELSON, E. L. The biochemical response of the heart to hypertension and exercise. **Trends Biochem Sci**, v. 29, n. 11, p. 609-17, Nov 2004.

WALLUKAT, G. The beta-adrenergic receptors. **Herz**, v. 27, n. 7, p. 683-90, Nov 2002.

WALLUKAT, G. et al. Anti-beta 1-adrenoceptor autoantibodies with chronotropic activity from the serum of patients with dilated cardiomyopathy: mapping of epitopes in the first and second extracellular loops. **J Mol Cell Cardiol**, v. 27, n. 1, p. 397-406, Jan 1995.

WANG, Y. Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases. **Circulation**, v. 116, n. 12, p. 1413-23, Sep 18 2007.

WANG, Y. et al. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. **J Biol Chem**, v. 273, n. 4, p. 2161-8, Jan 23 1998.

WEBER, K. T. Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. **Circulation**, v. 96, n. 11, p. 4065-82, Dec 2 1997.

WEISS, R. E. et al. Thyroid hormone and cardiac function in mice deficient in thyroid hormone receptor-alpha or -beta: an echocardiograph study. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 283, n. 3, p. E428-35, Sep 2002.

WETTSCHURECK, N. et al. Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of Galphq/Galpha11 in cardiomyocytes. **Nat Med**, v. 7, n. 11, p. 1236-40, Nov 2001.

WILLIAMS, L. T. et al. Thyroid hormone regulation of beta-adrenergic receptor number. **J Biol Chem**, v. 252, n. 8, p. 2787-9, Apr 25 1977.

WILSON, K. P. et al. Crystal structure of p38 mitogen-activated protein kinase. **J Biol Chem**, v. 271, n. 44, p. 27696-700, Nov 1 1996.

WONG, N. L. et al. Effects of thyroid status on atrial natriuretic peptide release from isolated rat atria. **Am J Physiol**, v. 256, n. 1 Pt 1, p. E64-7, Jan 1989.

- WU, J. et al. The athlete's electrocardiogram. **Am J Emerg Med**, v. 24, n. 1, p. 77-86, Jan 2006.
- YAO, J.; EGHBALI, M. Decreased collagen gene expression and absence of fibrosis in thyroid hormone-induced myocardial hypertrophy. Response of cardiac fibroblasts to thyroid hormone in vitro. **Circ Res**, v. 71, n. 4, p. 831-9, Oct 1992.
- YASUNO, S. et al. Endogenous cardiac natriuretic peptides protect the heart in a mouse model of dilated cardiomyopathy and sudden death. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 296, n. 6, p. H1804-10, Jun 2009.
- YEGIN, E. et al. Serum angiotensin-converting enzyme and plasma atrial natriuretic peptide levels in hyperthyroid and hypothyroid rabbits. **Jpn Heart J**, v. 38, n. 2, p. 273-9, Mar 1997.
- YEH, J. K. et al. Effect of growth hormone administration and treadmill exercise on the body composition of rats. **J Appl Physiol (1985)**, v. 77, n. 1, p. 23-9, Jul 1994.
- YEN, P. M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. **Physiol Rev**, v. 81, n. 3, p. 1097-142, Jul 2001.
- YOSHIDA, M. et al. Mineralocorticoid receptor is overexpressed in cardiomyocytes of patients with congestive heart failure. **Congest Heart Fail**, v. 11, n. 1, p. 12-6, Jan-Feb 2005.
- ZEHENDER, M. et al. ECG variants and cardiac arrhythmias in athletes: clinical relevance and prognostic importance. **Am Heart J**, v. 119, n. 6, p. 1378-91, Jun 1990.
- ZHAI, P. et al. Glycogen synthase kinase-3alpha reduces cardiac growth and pressure overload-induced cardiac hypertrophy by inhibition of extracellular signal-regulated kinases. **J Biol Chem**, v. 282, n. 45, p. 33181-91, Nov 9 2007.
- ZHANG, S. et al. The role of the Grb2-p38 MAPK signaling pathway in cardiac hypertrophy and fibrosis. **J Clin Invest**, v. 111, n. 6, p. 833-41, Mar 2003.
- ZHANG, X. et al. Cardiotoxic and cardioprotective features of chronic beta-adrenergic signaling. **Circ Res**, v. 112, n. 3, p. 498-509, Feb 1 2013.

## **ANEXO**

## Research Paper

## Sexual dimorphism in autonomic changes and in the renin–angiotensin system in the hearts of mice subjected to thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy

Anderson Luiz Bezerra da Silveira<sup>1</sup>, Manuela França de Souza Miranda<sup>2</sup>, André Souza Mecawi<sup>3</sup>, Roberto Laureano Melo<sup>1</sup>, Michelle Porto Marassi<sup>1</sup>, Alba Cenêlia Matos da Silva<sup>1</sup>, José Antunes-Rodrigues<sup>3</sup> and Emerson Lopes Olivares<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Multicenter Graduate Program in Physiological Sciences, Department of Physiological Sciences, Institute of Biology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, Brazil

<sup>2</sup>Graduate Program in Veterinary Medicine, Department of Physiological Sciences, Institute of Biology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, Brazil

<sup>3</sup>Department of Physiology, School of Medicine, Ribeirão Preto USP – São Paulo, Brazil

## New Findings

- **What is the central question of this study?**  
Based on the relevance of the renin–angiotensin system and the controversy regarding the role of the sympathetic nervous system in thyroid hormone-related cardiac hypertrophy, the present study sought to establish whether there is a gender difference in activation of these systems and the degree of cardiac hypertrophy in mice.
- **What is the main finding and its importance?**  
Triiodothyronine increased sympathetic modulation and induced higher levels of cardiac angiotensin II in male than in female mice. This could explain the greater degree of cardiac hypertrophy induced by thyroid hormone found in the male mice.

Based on the relevance of the renin–angiotensin system and the ongoing controversy regarding the role of the sympathetic nervous system in thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy, the aim of the present study was to establish whether the putative difference in the degree of cardiac hypertrophy exhibited by males and females might be related to differences in the sympathetic–vagal balance and/or in the cardiac renin–angiotensin system in mice of different genders. Male and female mice ( $n = 117$ ) were given  $0.1 \text{ mg kg}^{-1}$  of triiodothyronine or normal saline each day for 10 days consecutively. At the end of that period, study of the heart rate variability, spectral analysis and histopathological examination were performed to assess the sympathetic–vagal balance and the diameter of cardiomyocytes. The cardiac levels of angiotensin I and II were also measured. Treatment with triiodothyronine induced a greater degree of cardiac hypertrophy in male (~73%) than in female mice (~42%). This difference was attributed to greater modulation of the sympathetic nervous system and higher levels of angiotensin I and II in male than in female mice. Our data indicate that thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy was more intense in male mice due to the synergic effect of the sympathetic nervous system and the cardiac renin–angiotensin system.

(Received 29 October 2013; accepted after revision 18 March 2014; first published online 21 March 2014)

Corresponding author E. L. Olivares: Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro: BR 465, Km 7, 23897-000, Seropédica, RJ, Brazil. Email: olivares.el@gmail.com, elopes@ufrrj.br

## Introduction

Historically, the effect of thyrotoxicosis on the cardiovascular system has been compared to a state of adrenergic hyperactivity (Staffurth & Morrison, 1968; Ching *et al.* 1996). Indeed, some authors have suggested that the sympathetic nervous system (SNS) may play a role in thyrotoxic cardiomyopathy. That hypothesis was lent further support by Klein (1988), who showed that treatment with propranolol, a  $\beta$ -adrenergic receptor antagonist, prevented the occurrence of cardiac hypertrophy in rats treated with thyroxine, indicating that  $\beta$ -adrenergic receptors might play a role in the production of thyrotoxicosis-related cardiac hypertrophy.

Despite this evidence, the complex interactions between thyroxine and the SNS are far from being understood. In addition, the progression of disease over time might eventually give rise to opposite clinical findings. For instance, plasma catecholamine levels can be normal or even low in individuals with hyperthyroidism (Coulombe *et al.* 1977; Esler, 1982). While some authors believe that high concentrations of thyroid hormone cause cardiac hypertrophy through direct action on the myocardium (Klein & Ojamaa, 1998; Kahaly & Dillmann, 2005), according to others the activity of the SNS and of the renin–angiotensin system (RAS) are increased in hyperthyroidism and thus make a relevant contribution to the development of thyrotoxic cardiac hypertrophy (Carneiro-Ramos *et al.* 2010; Xiao *et al.* 2011). Clinical signs of heart effects might also occur due to a state of elevated sensitivity to catecholamines brought about by an increase in the number and affinity of  $\beta$ -adrenergic receptors on the cell surface (Carvalho-Bianco *et al.* 2004; Silva & Bianco, 2008).

In the early 1990s, RAS components were identified in several tissues and cells in which local RAS was previously thought not to be present. Those studies showed that local RASs perform specific functions independently of the plasma RAS (Paul *et al.* 2006). Kobori *et al.* (1997) showed that after administration of thyroxine for 8 weeks, the cardiac renin level increased more than the plasma angiotensin II (Ang II) level. Those findings lend further support to the hypothesis that thyroid hormones activate the cardiac RAS independently of the SNS by increasing the expression of cardiac renin, which in turn induces cardiac hypertrophy, a finding that is supported by previous studies (Kobori *et al.* 1997; Pantos *et al.* 2005; Diniz *et al.* 2009; Carneiro-Ramos *et al.* 2010).

Myocardial hypertrophy induced by thyroid hormones (TH) diverges in some pathophysiological aspects from the hypertrophy induced by RAS or adrenergic overdrive, e.g. TH-induced cardiac hypertrophy is not accompanied by a shift of  $\alpha$ - to  $\beta$ -myosin heavy chain isoform or by fibrosis, in contrast to cardiomyopathy induced by Ang II (Wang *et al.* 2006) or catecholamines (Brooks & Conrad,

2009). In addition, other studies have found evidence for participation of the SNS and RAS in hyperthyroidism in animals (Klein & Ojamaa, 1998, 2001; Kobori *et al.* 1999; Pantos *et al.* 2005). As a result, the past belief that thyrotoxic cardiomyopathy is due to increased sympathetic activity with concomitant elevation of the systolic pressure has not been confirmed by other studies.

Although we are not able to account for these discrepancies, we believe that some of them might be explained by the use of different thyroxinaemia protocols in the cited studies and by gender-related differences in hypertrophic response. Indeed, several studies addressing cardiovascular diseases have identified striking differences between males and females, and these differences have been largely attributed to oestrogens (Fisman *et al.* 2002). This is a highly debated and controversial topic; according to various studies, the risk of cardiovascular disease is greater among males than among same-age fertile females until menopause, when the tendency reverses (Kannel *et al.* 1976; Barrett-Connor & Bush, 1991; Wiinberg *et al.* 1993; Sakabe *et al.* 2004; Mendelsohn & Karas, 2005). Thus, for example, Wiinberg *et al.* (1995) found that in menopausal women blood pressure is higher than that of same-age men. A study of spontaneously hypertensive rats found that endothelium-dependent dilatation of the aorta was greater in females than in males (Silva-Antonialli *et al.* 2000). Some studies have focused on the changes elicited directly on the cardiovascular system; for instance, in the study of Hayashi *et al.* (1992) it was shown that the release of nitric oxide from aortic rings was greater in intact females than in males and ovariectomized females, thus pointing to the dependence of that effect on the circulating oestrogen concentration and thus on sex.

With regard to the RAS, some studies showed that women undergoing oestrogen-replacement therapy exhibit considerably lower plasma renin levels compared with women not using that treatment. Interestingly, the renin concentration is much lower among women compared with same-age men (Schunkert *et al.* 1997). A study by Silva-Antonialli *et al.* (2004) found that Ang II-induced vasoconstriction was greater in males than in spontaneously hypertensive intact female rats, thus pointing to an influence of oestrogen. In addition, following ovariectomy, the genetic expression of Ang II type 1 receptors increased and, consequently, the response to Ang II also increased, thus pointing once again to the role of the RAS in the origin of cardiovascular diseases.

Based on the relevance of the RAS and the controversy in the literature regarding the role of the SNS in thyroid hormone-related cardiac hypertrophy, the present study sought to establish, for the first time, whether there is a gender difference in the degree of cardiac hypertrophy associated with differences in the sympathetic–vagal balance and in the level of cardiac RAS activation in mice.

## Methods

The present study complied with the ethical principles and rules formulated by the research ethics committee of the Federal Rural University of Rio de Janeiro (Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro), which approved it (ruling 2 July 2012; protocol no. 207/2012) in consonance with pertinent Brazilian legislation. The study also complied with the norms described in the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH publication no. 85-23, revised 1996).

## Animals

Adult Swiss Webster mice of both sexes (8–10 weeks old) were provided by the animal facility of the Department of Physiological Sciences, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro and maintained in a room with controlled dark–light periods (12 h per period) in boxes with up to six animals each. Water and food were provided *ad libitum*.

## Triiodothyronine-induced cardiac hypertrophy model

A total of 117 animals were used and randomly allocated to two groups. The animals in one group were given triiodothyronine ( $T_3$ ; Sigma, St Louis, MO, USA) intraperitoneally at a dose of  $0.1 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$  as previously described (van Dijk-Ottens *et al.* 2010) over a period of 10 days, while the animals in the other group received vehicle alone (0.9% saline solution, control) over the same period. The treatment was applied at the same time each day (~08.00 h). Triiodothyronine was preferred over thyroxine because it does not require activation by tissue deiodinases, which might represent a further sex-related differential factor.

## Experimental protocol

To minimize differences in the experimental results due to differences in the oestrous cycle, a study of the oestrous cycle was performed for 15 days consecutively at the beginning of the protocol by means of examination of vaginal smears, which were analysed according to previous studies (Long & Evans, 1922; Meziane *et al.* 2007). Anoestrous females were excluded from the study (three of 60 mice).

Figure 1 depicts the study protocol. One group of males (group MT<sub>3</sub>,  $n = 30$ ) and females (group FT<sub>3</sub>,  $n = 29$ ) received  $T_3$  by intraperitoneal injection daily for 10 days, while another group of males (M control,  $n = 28$ ) and females (F control,  $n = 28$ ) was given the same volume of 0.9% saline solution over the same period of time. At the end of the experiment, electrocardiography was performed, and the corresponding tachograms were used to assess the heart rate variability (HRV; for more detail see

next subsection). The animals were killed by decapitation the following day. For the purpose of post-mortem assessment, the heart was removed and weighed, the right tibia of each animal was measured (in centimetres), and the heart relative weight was calculated. Blood samples were also collected for measurement of serum  $T_3$  levels.

## Electrocardiographic study of the heart sympathetic–vagal balance by means of heart rate variability and spectral analysis

Twenty-four hours prior to ECG, the animals were sedated with isoflurane, trichotomy was performed across the entire thoracic surface, and a foam electrode ~1.0 cm in diameter (3M do Brasil, Ltda, Sumaré-SP, Brazil) was applied to each side of the thorax. Immediately before ECG recording, the electrodes were connected to a data acquisition system (Amplifier 3A9, TEKTRONIX/TL-2 Interface, Bearverton, OR, USA; ADInstruments, Castle Hill, NSW, Australia). The signals were acquired at a frequency of 13 kHz, and signal amplitude was measured with 12-bit resolution; the records were visualized and analysed using AcqKnowledge version 3.8.1 software (Biopac Systems Inc., Goleta, CA, USA).

Ten-minute records were used in spectral analysis. Following the detection of the R-wave peak, 600 s tachograms were obtained, and all the heart variations occurring over that period of time were counted (Pereira-Junior *et al.* 2006). Processing of the HRV signals was performed using Matlab algorithms (Pereira-Junior *et al.* 2006) included in the *Cardioseries* software version 1.1 (available at <http://www.sites.google.com/site/cardioseries/home>). The data acquired relative to the time domain were the R–R interval average (NN), the standard deviation of the R–R intervals (SDNN) and the square root of the mean of the sum of the squares of the successive differences between successive R–R intervals (RMSSD; Aubert *et al.* 1999; Pereira-Junior *et al.* 2006). Relative to the frequency domain, the tachograms were resampled to equal intervals by means of the cubic interpolation method at 10 Hz to permit spectral analysis of HRV, and the linear tendency was removed (Aubert *et al.* 1999; Pereira-Junior *et al.* 2006). The power spectrum was obtained by means of fast decomposition based on the Fourier method (Welch's periodogram, 256 points, 50% overlapping, and Hamming window). Two frequency ranges were defined, a low-frequency range (LF; 0.1–1 Hz) and a high-frequency range (HF; 1–5 Hz); the potency (in milliseconds) was calculated as the area under the spectrum within those frequency ranges (Ishii *et al.* 1996; Joaquim *et al.* 2004; Fazan *et al.* 2005; Farah *et al.* 2006).

## Indirect assessment of cardiac hypertrophy

The heart weight (in milligrams) was normalized to the tibial length (in centimetres), which was measured using

callipers. Thus, the heart relative weight was calculated for use in the assessment of cardiac hypertrophy (Cohen *et al.* 1966; Otten *et al.* 1986; Sjaastad *et al.* 2000; Mircoli *et al.* 2002; van Dijk-Ottens *et al.* 2010).

#### Serum collection and measurement of triiodothyronine

After the animals were decapitated, 1.0–2.0 ml of blood was collected in Eppendorf-like tubes. To separate the serum, the samples were centrifuged at 1931.9 g for 20 min. The serum was pipetted with a 200  $\mu$ l automatic pipettor, placed in an Eppendorf-like tube, and stored in a freezer at  $-13^{\circ}\text{C}$  until use. The serum T<sub>3</sub> levels were measured by means of the chemiluminescence method with an Immulite 1000 System (DPC Biemann, BN, Germany) at the laboratory of clinical analysis of the Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

#### Measurement of cardiac angiotensin I and II and atrial natriuretic peptide (ANP)

The hearts were collected and quickly frozen (with liquid nitrogen) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Subsequently, the hearts were homogenized with 0.045 N HCl in ethanol [10 ml (g tissue)<sup>-1</sup>] containing 0.9  $\mu\text{M}$  *p*-hydroxymercuribenzoate, 131.5  $\mu\text{M}$  1,10-phenanthroline, 0.9  $\mu\text{M}$  phenylmethylsulfonyl fluoride, 1.75  $\mu\text{M}$  pepstatin A, 0.032% EDTA and 0.0043% protease-free bovine serum albumin. The protein concentration in the plasma and crude homogenates was determined by the Bradford method. These homogenates were centrifuged (10621 g for 40 min at  $4^{\circ}\text{C}$ ), the supernatant was evaporated and the residue diluted in 2 ml of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA). After this, tissue peptides were extracted onto Bond-Elut solid-phase extraction columns (Peninsula Laboratories, San Carlos, CA, USA). The columns were pre-activated by sequential washes with 4 ml of 60% acetonitrile/0.1% TFA and 20 ml of 0.1% TFA. After sample application, the columns were washed with 20 ml of 0.1% TFA (Mecawi *et al.* 2013). The adsorbed peptides were eluted with 3 ml of 60% acetonitrile/0.1% TFA into polypropylene tubes. After evaporation, Ang I, Ang II and ANP levels were measured by radioimmunoassay. The specific antibodies for Ang I and Ang II were obtained from Peninsula Laboratories (Ang I, T4166; and Ang II, T4007), and ANP antibody was kindly donated by Jolanta Gutkowska (Hotel Dieu, University of Montreal, QC Canada). The sensitivity of the radioimmunoassay and the coefficients of intra- and interassay variability were, respectively, 1.2 pg ml<sup>-1</sup>, 8.1% and 8.7% for Ang I, 0.39 pg ml<sup>-1</sup>, 6.7% and 8.7% for Ang II and 0.7 pg ml<sup>-1</sup>, 4.9% and 7.8% for ANP.

#### Histological processing and analysis

After the mice were killed by decapitation, the heart was removed, dried with filter paper and weighed. For the purpose of histological analysis, the hearts were sliced transversely at the papillary muscle level of both ventricles, and the tissues were fixed in 20% formalin and dehydrated in increasing concentrations of ethyl alcohol (Vetec Pa) from 70% to absolute. Xylol (Vetec Xileno) was used to clear the tissues, which were then embedded in paraffin (histology paraffin; Pró-Cito®, Porto Alegre, RS, Brazil) that had been melted in an oven at  $60^{\circ}\text{C}$ . The pieces were placed in rectangular molds, embedded in paraffin, and cut into 5  $\mu\text{m}$  sections using a microtome (Luna, 1968). Haematoxylin and Eosin staining was used to assess the diameter of the cardiomyocytes in the histological sections (transverse section at the papillary muscle level) using  $\times 40$  magnification. Images were acquired using a light microscope (Axiovert 100; Zeiss, Göttingen, Germany) coupled to an Olympus digital camera. The images were analysed using ImageJ software (available at <http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) at a resolution of 2272  $\times$  1704 pixels. The cardiomyocyte diameter was calculated as the average of 80–90 cells per heart using five hearts from each group. The cardiomyocytes selected for measurement met two criteria, namely the presence of a central nucleus and an intact cell membrane. The cardiomyocyte diameter was measured on a line between opposite points on the cell membrane crossing over the nucleus, according to Grimm *et al.* (1998).

#### Statistical analysis

The results are expressed as means  $\pm$  SEM. The data were analysed by two-way ANOVA using Graphpad Prism software (version 6; Graphpad Software, Inc., San Diego, CA, USA). The Shapiro–Wilk test was performed to evaluate the normality of distribution of the data; all variables showed a normal distribution. To detect significant differences between groups, ANOVAs were supported by Bonferroni *post hoc* tests only when the overall effects were significant.

## Results

#### Serum triiodothyronine

Figure 2 depicts the serum T<sub>3</sub> levels of the animals of both genders at the end of the 10 day period of T<sub>3</sub> administration. Male mice treated with T<sub>3</sub> exhibited a significant elevation in serum total T<sub>3</sub> level ( $174.8 \pm 11.6$  ng dl<sup>-1</sup>) compared with the corresponding control male mice ( $116.1 \pm 5.13$  ng dl<sup>-1</sup>,  $P < 0.01$ ). Female mice treated with T<sub>3</sub> also exhibited a significant increase in



serum total  $T_3$  level ( $207.3 \pm 47.6 \text{ ng dl}^{-1}$ ) compared with the corresponding female controls ( $102.8 \pm 5.9 \text{ ng dl}^{-1}$ ,  $P < 0.01$ ). Although not statistically different, the overall increase in serum total  $T_3$  level was  $\sim 100\%$  in females and  $50\%$  in males.

#### Effect of increased serum triiodothyronine levels on body and heart weight

As Table 1 shows, the body weights of the mice at the end of the 10 day treatment with  $T_3$  did not differ from those of control animals ( $P > 0.05$ ). Table 1 also shows the absolute and relative (normalized by the tibial length) heart weights of the mice after treatment with  $T_3$ . In both male and female mice treated with  $T_3$ , the absolute and relative weight of the heart was significantly increased compared with the corresponding control animals ( $P < 0.01$ ). Interestingly, the degree of cardiac hypertrophy ( $\Delta$ ) represented by the heart absolute and relative weight was similar in males and females, although females exhibited twofold higher serum  $T_3$  levels than males.

#### Direct assessment of cardiac hypertrophy by histopathology

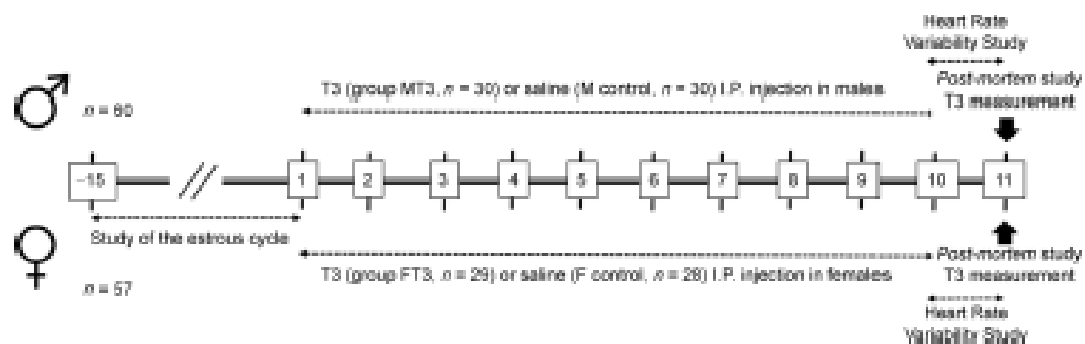
Significant myocardial fibrosis was not found in any of the heart sections on histological examination (data not shown). As shown in Fig. 3, cardiomyocyte diameter increased ( $P < 0.01$ ) in both male and female mice treated with  $T_3$  (MT3 and FT3 groups) compared with the corresponding controls (MT3 versus M control,  $183.8 \pm 6.76$  versus  $118.4 \pm 1.94$  pixels; and FT3 versus

F control,  $169.2 \pm 4.59$  versus  $123.6 \pm 3.89$  pixels). Curiously, in contrast to the results of the indirect assessment of cardiac hypertrophy, the degree of cardiomyocyte hypertrophy was greater in the male mice ( $\sim 73\%$  increase) than in the females ( $42\%$  increase).

#### Heart rate variability

Although the heart rate of the animals in the groups treated with  $T_3$  and the corresponding control animals did not exhibit significant differences ( $P > 0.05$ ; MT3 versus M control,  $459.6 \pm 9.47$  versus  $456.2 \pm 12.24$ ; and FT3 versus F control,  $440.7 \pm 10.47$  versus  $437.0 \pm 8.20$ ), Fig. 4 shows that relative to the time domain of HRV, RMSSD exhibited a significant reduction ( $P < 0.05$ ) in the treated male mice ( $166.80 \pm 3.96 \text{ ms}$ ) compared with the corresponding M control ( $187.40 \pm 6.45 \text{ ms}$ ). Curiously, this effect was not observed in females, in which no statistically significant difference in RMSSD was found between the treated and the control animals (FT3,  $188.50 \pm 6.65$  versus F control,  $182.9 \pm 7.24 \text{ ms}$ ,  $P > 0.05$ ).

With regard to the frequency domain of HRV, Fig. 4 shows that decomposition of frequency into its low-frequency oscillatory component (Fig. 4B, LF) did not differ between the treated animals of either sex and their corresponding controls (MT3,  $25,429 \pm 1723 \text{ ms}^2$  versus M control,  $27,320 \pm 1496 \text{ ms}^2$ ; and FT3,  $23,612 \pm 5091 \text{ ms}^2$  versus F control,  $24,060 \pm 2337 \text{ ms}^2$ ). In contrast, decomposition of frequency into its high-frequency oscillatory component (Fig. 4C, HF) showed a reduction ( $P < 0.05$ ) of this parameter in the MT3 group ( $2087 \pm 336 \text{ ms}^2$ ) compared with the corresponding



**Figure 1. Experimental protocol**

Following investigation of the oestrous cycle for 15 days in females, both males and females received  $T_3$  (groups MT3 and FT3) or the same volume of 0.9% saline solution (M control and F control) for 10 days consecutively. At the end of the experiment, electrocardiography was performed in conscious mice, and the corresponding tachograms were used to assess the heart rate variability. The animals were killed the following day. The hearts were harvested to determine relative weight and assess the diameter of the cardiomyocytes. Blood samples were also collected for measurement of serum  $T_3$  levels by a chemiluminescence method.

Table 1. Basal and final body weight, heart weight and relative heart weight in all groups

Parameter	Group			
	M control	MT3	F control	FT3
Basal body weight (g)	42.18 ± 1.08	44.15 ± 1.38	37.03 ± 1.89	38.15 ± 2.00
Final body weight (g)	45.16 ± 1.15	47.28 ± 2.12	39.18 ± 2.54	41.98 ± 1.29
Heart weight (g)	0.19 ± 0.01	0.36 ± 0.01*	0.18 ± 0.001	0.33 ± 0.02*
Relative heart weight (mg cm <sup>-1</sup> )	89.28 ± 1.83	115.0 ± 3.91*	80.51 ± 1.34	106.0 ± 2.41*

Relative heart weight (in milligrams) was normalized by tibial length (in centimetres). Data are means ± SEM; n = 28–30 per group. \*P < 0.01 versus respective control. M: male, MT3: male treated with T<sub>3</sub>, F: female, FT3: female treated with T<sub>3</sub>.

M control (4061 ± 474 ms<sup>2</sup>), while it did not differ among the females (FT3, 3403 ± 571 versus F control, 3510 ± 469 ms<sup>2</sup>, P > 0.05).

Analysis of the LF/HF ratio, which represents the heart sympathetic–vagal balance, indicated different responses between genders, as shown in Fig. 4D. The LF/HF spectral power ratio increased in male mice treated with T<sub>3</sub> compared with male control animals (12.18 ± 0.51 versus 6.73 ± 0.31, respectively, P < 0.05), while no difference in the LF/HF ratio was found between treated and untreated females (FT3, 6.93 ± 0.89 versus F control, 6.85 ± 0.31, P > 0.05).

#### Effects of treatment with triiodothyronine on the cardiac renin–angiotensin system

Cardiac Ang I (Fig. 5A) and Ang II levels (Fig. 5B) increased in treated males (MT3 versus M control: Ang I, 7.73 ± 1.12 versus 4.21 ± 0.35 pg (mg protein)<sup>-1</sup>; and Ang II, 1.37 ± 0.12 versus 0.78 ± 0.05 pg (mg protein)<sup>-1</sup>, P < 0.01) and in treated females (FT3 versus F control: Ang I, 5.50 ± 0.44 versus 3.66 ± 0.42 pg (mg protein)<sup>-1</sup>; and Ang II, 1.06 ± 0.08 versus 0.71 ± 0.05 pg (mg

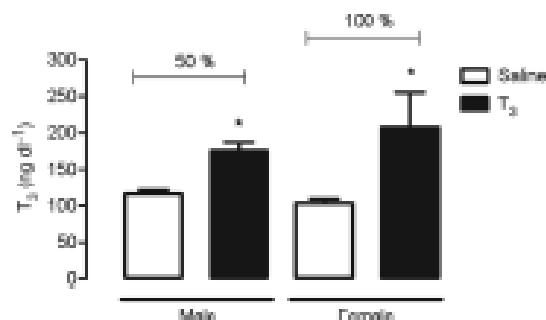


Figure 2. Serum triiodothyronine (T<sub>3</sub>) levels of animals of both genders at the end of the 10 day period of T<sub>3</sub> or saline administration

The overall increase in serum total T<sub>3</sub> level was ~100% in females and ~50% in males. \*treated mice compared with the corresponding control (P < 0.05).

protein)<sup>-1</sup>, P < 0.05). The difference between the treated and the control animals was lower among the females, in which it was ~49% for both Ang I and Ang II; in the males, the observed differences were 84 and 76% for Ang I and Ang II, respectively.

#### Effects of treatment with triiodothyronine on cardiac levels of atrial natriuretic peptide

To determine whether differences in ANP secretion occur in male and female mice subjected to high T<sub>3</sub> levels, measurement of cardiac ANP was used as an indirect indicator. Figure 6 shows that treatment with T<sub>3</sub> reduced the cardiac ANP levels in both males (4.862 ± 0.93 versus 9.335 ± 1.16 pg (mg protein)<sup>-1</sup>, P < 0.05) and females (3.850 ± 0.65 versus 8.90 ± 1.70 pg (mg protein)<sup>-1</sup>, P < 0.05) compared with the corresponding control animals. The decrease in cardiac ANP was similar in both genders but slightly less marked in the females (~57% reduction, compared with 58% reduction in males).

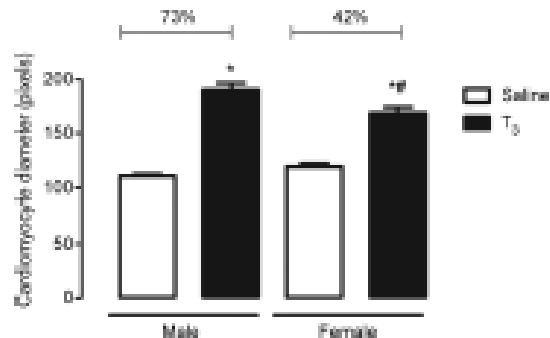


Figure 3. Cardiomyocyte diameter (in pixels) assessed by histopathology

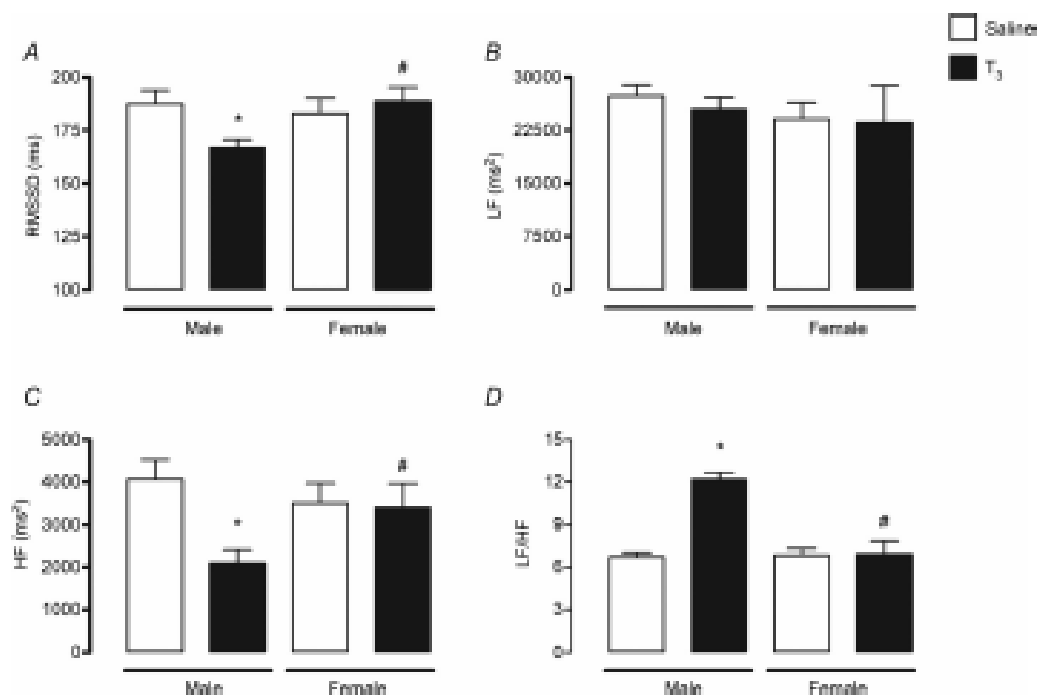
There was an increase in cardiomyocyte diameter in both male and female mice treated with T<sub>3</sub> compared with the corresponding control animals. The degree of cardiomyocyte hypertrophy was greater in the male mice (~73% increase) than in the females (~42% increase). \*treated mice compared with the corresponding control (P < 0.05); #treated female compared with treated male mice (P < 0.05).

## Discussion

One of the main findings of the present study is the identification of sexual dimorphism in the mechanisms involved in the induction of cardiac hypertrophy by  $T_3$  in mice. While treatment of male mice with  $T_3$  altered the sympathetic–vagal balance in a way that favoured sympathetic modulation, the sympathetic–vagal balance was unchanged in treated female mice. When the significant influence of the adrenergic stimulation of the RAS is taken into consideration, one is unavoidably led to infer that the degree of cardiac hypertrophy would be expected to be greater in males due to the additional RAS activation that occurs in male mice concomitant to the direct activation induced by  $T_3$ . In this regard, it is worth observing that in the present study the degree of cardiac hypertrophy assessed in terms of absolute and relative (i.e. normalized by the tibial length) heart weight did not differ between male and female animals treated

with  $T_3$ . However, direct assessment of hypertrophy by measurement of cardiomyocyte transverse diameter in animals subjected to treatment with  $T_3$  showed that cardiac hypertrophy was greater in the males than in the females. We are not able to account for the discrepancy between the results obtained using different methods to assess cardiac hypertrophy, but we might hypothesize that the  $T_3$  regimen used did not suffice for the cell volume increase to be reflected at the macroscopic level, i.e. in heart weight.

With respect to the regimen of administration of thyroid hormone, our results show that  $T_3$  sufficed to increase the serum levels of  $T_3$  and to induce cardiac hypertrophy in both sexes. Curiously, analysis of the difference between treated animals and the corresponding controls ( $\Delta$ ) per sex showed that this difference was greater for females than for males (100 and 50%, respectively). This difference cannot be attributed to the serum  $T_3$  levels at baseline because they were similar in both genders. It might be



**Figure 4.** Heart rate variability (HRV) in the time (RMSSD, A) and frequency domains (B, C and D). The RMSSD (A) exhibited a significant reduction in the treated male mice compared with the corresponding M control (\* $P < 0.05$ ). Although the low-frequency oscillatory component (LF; B) did not differ among the groups, high-frequency oscillatory component (HF; C) showed a reduction (\* $P < 0.05$ ) in the  $T_3$  group compared with the corresponding M control, while it did not differ among the females ( $P > 0.05$ ). The LF/HF spectral potency ratio (D) increased in male mice treated with  $T_3$  compared with male controls, while no difference was found between treated and untreated females ( $P > 0.05$ ). #treated female compared with treated male mice ( $P < 0.05$ ).

postulated that type 1 deiodinases, which participate in the clearance of thyroid hormones in males, might be more efficacious in the deiodination of the tyrosyl inner ring and thus promote a more effective clearance of T<sub>3</sub> in male animals (Santini *et al.* 1994; Marassi *et al.* 2007).

There was no significant difference in the body weight of the animals given T<sub>3</sub> for 10 days and that of the corresponding control animals, although the T<sub>3</sub> levels of the females were twice as high as the baseline and those of the males were 50% higher than baseline at the end of treatment. Given that weight loss is a classic and well-described sign of thyroid hormone excess (Basset *et al.* 2000), the regimen of T<sub>3</sub> administration used in the present study may not have induced metabolic changes sufficient to cause weight loss. Our data agree with the findings reported by Ferreira *et al.* (2007), which indicate that changes in the body weight of mice with thyroid dysfunction are associated with longer duration of disease. In a study by Freitas (2011), animals treated with thyroxine for 35 days exhibited body mass reduction. Therefore, the length of induction seems to play an important role in the induction of weight loss by thyroid hormones; treatment with T<sub>3</sub> for 10 days, as in the present study, might not suffice to cause changes in the body weight of the animals.

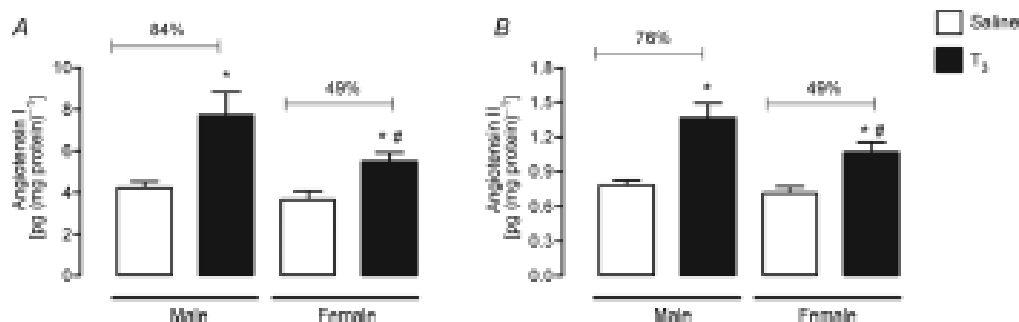
No changes were found in the heart rates of animals of either sex after treatment with T<sub>3</sub>. Therefore, the regimen of T<sub>3</sub> administration used in the present study might have sufficed to induce selective trophic stimulation, directly or indirectly, e.g. increasing the number of  $\beta$ -adrenergic receptors on cell membranes (Basso *et al.* 1991), the sodium current density (Huang *et al.* 1999) or potassium channel gene expression (Wickenden *et al.* 1997) of the heart, but not to induce metabolic and haemodynamic changes, which are likely to contribute indirectly to the production of cardiac hypertrophy. It is known that cardiac hypertrophy secondary to thyroid hormone excess is

mediated by a series of mechanisms, including myocardial overload due to direct hormone action on the heart in addition to indirect metabolic and haemodynamic changes mediated by neuroendocrine systems involving the participation of the SNS and the RAS (Klein, 1990; Polikar *et al.* 1993; Kobori *et al.* 1997; Silva & Bianco, 2008).

Given that serum T<sub>3</sub> levels were higher in the female mice in this study, it would be expected that cardiac hypertrophy would be greater in females than in males. However, this was not the case; in both animals of genders treated with T<sub>3</sub>, relative heart weight was increased compared with the corresponding control animals. In addition, although females exhibited a twofold increase in serum T<sub>3</sub> levels compared with males, their degree of cardiac hypertrophy was lower when assessment was based on cardiomyocyte transverse diameter. These results suggest that in spite of the greater susceptibility of females to elevation of plasma T<sub>3</sub> levels compared with males, the development of cardiac hypertrophy is not proportional to the amount of circulating hormone in females due to an unknown mechanism.

One limitation of this study relates to the fact that we do not know whether all the hearts were fixed in the same conditions, in a relaxed or contracted state. Moreover, formalin fixation itself may affect the size of cardiomyocytes. Otherwise, the indirect assessment of cardiac hypertrophy, e.g. relative heart weight, revealed no difference between males and females treated with T<sub>3</sub>, which still supports the hypothesis that females are less sensitive to their higher T<sub>3</sub> concentrations compared with the males.

Seeking a mechanism that might at least partly explain that phenomenon, we assessed the cardiac autonomic response and some components of the cardiac RAS, which is directly involved in the production of thyroid hormone-induced hypertrophy. Based on the results, we



**Figure 5.** Cardiac angiotensin I (Ang I; A) and angiotensin II (Ang II) levels (B). Both Ang I and Ang II increased in T<sub>3</sub>-treated males and females (\**P* < 0.05). However, the difference between the treated and the control animals was less among the females (–49% for both Ang I and Ang II) compared with the males (–84 and 76% for Ang I and Ang II, respectively). \*treated female compared with treated male mice (*P* < 0.05).

conclude that changes in autonomic control of the heart and changes in cardiac RAS activation in response to increased  $T_3$  levels might at least partly account for the observed difference in the degree of cardiac hypertrophy between genders. An increase in sympathetic modulation might increase the activation of  $\beta$ -adrenergic receptors, thus elevating intracellular cyclic AMP levels and, in turn, activating protein kinase A, which catalyses the phosphorylation of membrane proteins, resulting in increased calcium flow into the cell (Walthkat, 2002). This hypothesis was confirmed by the finding of a positive sympathetic–vagal balance in the male mice; the increase in sympathetic modulation could be identified in the HRV. It is known that the lower the HRV, the greater the sympathetic modulation of the heart (Kleiger *et al.* 1987; Bigger *et al.* 1992; Souza *et al.* 2007; Kaminski *et al.* 2012). Nevertheless, the opposite is stated for the spectral LF/HF ratio, which was higher in males due to an increase in the LF oscillatory component resulting from the greater sympathetic contribution (Chen *et al.* 2006; Karthik *et al.* 2009). Concerning vagal activity in the male mice, the HF oscillatory component was lower in the group treated with  $T_3$  than in the corresponding control animals, indicating the occurrence of weaker parasympathetic modulation. Given that parasympathetic activity is cardioprotective (Hull *et al.* 1993; Schwartz, 1998; Iouven *et al.* 2005; Souza *et al.* 2007; Schwartz & De Ferrari, 2009), several authors suggest that its opposite, i.e. a predominance of sympathetic activity, increases the propensity to cardiovascular disease, such as myocardial infarction (Vanoli *et al.* 1991; Malliani *et al.* 1994; Guzzetti, 2001).

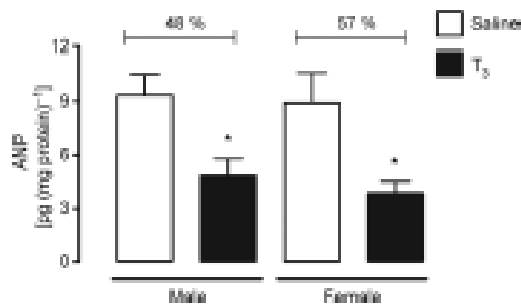
Curiously, the administration of  $T_3$  did not change the LF/HF ratio in the group of treated females. In the study by Safa-Tisseront *et al.* (1998), vagal activity was increased and sympathetic activity inhibited after administration

of excess thyroid hormone in female rats. However, a limitation of the present study was the HRV study, because the frequency bands in mouse heart rate spectra are not well established in the literature. Muscarinic and/or  $\beta$ -adrenergic receptor blockade should be useful in the future to strengthen our data.

In a study conducted in the 1980s, McCabe *et al.* (1981) found that rats exhibited a significant reduction in vagal activity following ovariectomy. Those findings suggest that the gonadal hormones, and oestrogen in particular, might exert a significant modulatory action on parasympathetic activity affecting the heart. In our study, the lack of changes in cardiac autonomic balance in the female mice might have been due to an action of the gonadal hormones on cardiac vagal activity, counterbalancing the stimulatory action of  $T_3$  on the sympathetic component. The stimulatory activity of thyroid hormones on the gonadal hormones, and oestrogen in particular, has been well described in the literature (Chen & Walfish, 1978; Harris *et al.* 1979; Lisb a *et al.* 1997; Lima *et al.* 2006). Future studies using ovariectomy and hormone replacement might serve to test that hypothesis.

The present study also sought to assess putative sex differences in the activation of the cardiac RAS, which may represent the most relevant system mediating the production of cardiac hypertrophy (Marchant *et al.* 1993; Sernia *et al.* 1993; Kobori *et al.* 1997; Carneiro-Ramos *et al.* 2010; Diniz *et al.* 2010). Some studies found increased angiotensinogen synthesis and secretion and higher plasma renin activity in animals with thyrotoxicosis compared with healthy control animals (Hong-Brown & Deschepper, 1992; Marchant *et al.* 1993; Sernia *et al.* 1993). In addition, hyperthyroidism induces elevation of Ang I, Ang II and angiotensin-converting enzyme levels (Marchant *et al.* 1993; Carneiro-Ramos *et al.* 2010). In a study by Kobori *et al.* (1999), significant mediation of the cardiac RAS in the production of cardiac hypertrophy was identified based on the fact that excess thyroid hormone increased the expression of renin mRNA independently of sympathetic activation. In our study, cardiac Ang I and Ang II levels were significantly increased in male mice treated with  $T_3$ . Those findings agree with the findings of Kobori *et al.* (1999), who reported increased cardiac Ang II levels similar to the levels found in our study.

Another hypothesis that might be put forward to account for the observed sex difference in the level of cardiac RAS activation is related to the modulatory action of the gonadal hormones on the RAS. Brosnihan *et al.* (1999) showed that oestrogen reduces the activity of angiotensin-converting enzyme and Ang II levels in rats. Other studies have also demonstrated an inhibitory effect of oestrogen on several RAS components (Schunkert *et al.* 1997; Nickenig *et al.* 1998; Nogawa *et al.* 2001; Yoshida *et al.* 2011). Thus, differences in the cardiac sympathetic–vagal balance and the modulatory effect



**Figure 6.** Cardiac levels of atrial natriuretic peptide (ANP). Treatment with  $T_3$  reduced the cardiac ANP levels in both males and females compared with the corresponding control animals ( $*P < 0.05$ ). The decrease in cardiac ANP was similar in the two sexes but was slightly less marked in the females (~57% reduction, compared with 58% reduction in males).

of female gonadal hormones on the RAS might partly account for the differences in cardiac RAS activation found in the present study.

Finally, sex differences in the mechanisms that regulate the genetic expression of angiotensin precursor, i.e. angiotensinogen, in the model used in the present study cannot be ruled out. Another limitation of our study was that only Ang I and Ang II levels were measured, while the levels of mRNA for angiotensinogen were not assessed. Studies investigating the various RAS components by means of RT-PCR, as well as measurement of cardiac renin and angiotensin-converting enzyme activity, might improve our understanding of sex differences in local RAS regulatory mechanisms.

The data obtained in this study regarding ANP levels agree with the results of previous studies, which found reductions in ANP levels in the hearts of rats and rabbits in response to increased levels of thyroid hormones (Kohno *et al.* 1986; Yegin *et al.* 1997). Reduction of cardiac ANP in response to excess thyroid hormone was shown to exhibit an inverse correlation with plasma ANP levels, suggesting that this peptide is depleted at its production/storage sites (Yegin *et al.* 1997). It is very likely that this occurred in the present study, because the ANP levels were higher in the control groups than in the T<sub>3</sub>-treated animals of both genders. Increased plasma ANP levels associated with increased angiotensin-converting enzyme were found in experimental models and in clinical trials with humans exhibiting high levels of thyroid hormones (Shigematsu *et al.* 1989; Wong *et al.* 1989; Luchner *et al.* 2002). Those findings agree with our results indicating increased Ang I and Ang II levels and reduced cardiac ANP in animals of both genders. As a matter of fact, there are studies that lend support to the hypothesis that ANP exerts negative modulation of the RAS (Cheung & Kumana, 1998). Therefore, although cardiac ANP levels did not exhibit a significant difference between male and female mice treated with T<sub>3</sub> (FT3 versus MT3), the reduction in cardiac ANP was slightly greater in females than in males (57 versus 48%); this might partly account for the less pronounced RAS response in the former compared with the latter. Atrial natriuretic peptide could be considered a heart failure marker because it is synthesized in cardiomyocytes in response to increases in the local distension of the atrial walls; this response represents a cardiocardiac reflex that also involves oxytocin secretion by the neurohypophysis (Cármio *et al.* 1997; Antunes-Rodrigues *et al.* 2004).

Studies using other markers, as well as functional heart assessment by means of echocardiography and Doppler or haemodynamic assessment by means of ventricular catheterization, are absolutely necessary for the further investigation of sexual dimorphism in cardiovascular function using the present model. Therefore, we might conclude that ventricular hypertrophy induced by increased serum T<sub>3</sub> was greater among the male mice in

this study than among the females due to an increase in sympathetic modulation and additional recruitment of the cardiac RAS. Those findings lead one to believe that the male mice in this study were not yet adapted or that they lack cardioprotective mechanisms present in females and thus exhibit greater susceptibility to fatal cardiac events in the long term due to increased sympathetic activity in the heart.

To conclude, the present study presents original data that contribute to a better understanding of sexual dimorphism in thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy. Future studies are needed to confirm some of the hypotheses put forward herein and to lend support to the development of sex-specific therapies for cardiac hypertrophy.

## References

- Antunes-Rodrigues J, de Castro M, Elias LL, Valença MM & McCann SM (2004). Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev* **84**, 169–208.
- Anbert AE, Ramaekers D, Beckers F, Braem R, Deneef C, Van de Werf F & Ector H (1999). The analysis of heart rate variability in unrestrained rats. Validation of method and results. *Comput Methods Programs Biomed* **60**, 197–213.
- Barrett-Connor E & Bush TL (1991). Estrogen and coronary heart disease in women. *JAMA* **265**, 1861–1867.
- Basset A, Blanc J & Elghozi JL (2000). Contribution of the renin-angiotensin system to blood pressure variability in hyperthyroid rats. *Arch Mal Coeur Vais* **93**, 905–910.
- Basso A, Piantanelli L, Rossolini G, Piloni S, Vitali C & Masera N (1991). Role of triiodothyronine in down-regulation and recovery of lymphocyte  $\beta$ -adrenoceptors in thyroidectomized patients. *J Clin Endocrinol Metab* **73**, 1340–1344.
- Bigger JT Jr, Fleiss JL, Steinman RC, Bolnitzky LM, Kleiger RE & Rottman JN (1992). Frequency domain measures of heart period variability and mortality after myocardial infarction. *Circulation* **85**, 164–171.
- Brooks WW & Conrad CH (2009). Isoproterenol-induced myocardial injury and diastolic dysfunction in mice: structural and functional correlates. *Comp Med* **59**, 339–343.
- Brosnihan KB, Senanayake PS, Li P & Ferrario CM (1999). Bi-directional actions of estrogen on the renin-angiotensin system. *Braz J Med Biol Res* **32**, 373–381.
- Carneiro-Ramos MS, Diniz GP, Nadeu AP, Almeida J, Vieira RL, Santos RA & Barreto-Chaves ML (2010). Blockage of angiotensin II type 2 receptor prevents thyroxine-mediated cardiac hypertrophy by blocking Akt activation. *Basic Res Cardiol* **105**, 325–335.
- Cármio EC, Jankowski M, Mnkaddam-Daheer S, Gorska I, Antunes-Rodrigues J & Gutkowska J (1997). Elevated levels of natriuretic peptides in lungs of hamsters with genetic cardiomyopathy. *Regul Pept* **70**, 67–73.
- Carvalho-Blanco SD, Kim BW, Zhang JX, Harnsey JW, Ribeiro RS, Gerben B, Blanco AC, Mende U & Larsen PR (2004). Chronic cardiac-specific thyrotoxicosis increases myocardial  $\beta$ -adrenergic responsiveness. *Mol Endocrinol* **18**, 1840–1849.

- Chen HJ & Walfish PG (1978). Effects of age and ovarian function on the pituitary-thyroid system in female rats. *J Endocrinol* **78**, 225–232.
- Chen JL, Chiu HW, Tseng YJ & Chu WC (2006). Hyperthyroidism is characterized by both increased sympathetic and decreased vagal modulation of heart rate: evidence from spectral analysis of heart rate variability. *Clin Endocrinol (Oxf)* **64**, 611–616.
- Cheng BM & Knmama CR (1998). Natriuretic peptides—relevance in cardiovascular disease. *JAMA* **280**, 1983–1984.
- Ching GW, Franklyn JA, Stallard TJ, Daykin J, Sheppard MC & Gammage MD (1996). Cardiac hypertrophy as a result of long-term thyroxine therapy and thyrotoxicosis. *Heart* **75**, 363–368.
- Cohen J, Aronsteyn JM & Rosenfeld MG (1966). Determinants of thyroxine-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circ Res* **18**, 388–397.
- Cotlolombe P, Dussault JH & Walker P (1977). Catecholamine metabolism in thyroid disease. II. Norepinephrine secretion rate in hyperthyroidism and hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* **44**, 1185–1189.
- Diniz GP, Carneiro-Ramos MS & Barreto-Chaves ML (2009). Angiotensin type 1 receptor mediates thyroid hormone-induced cardiomyocyte hypertrophy through the Akt/GSK-3 $\beta$ /mTOR signaling pathway. *Basic Res Cardiol* **104**, 653–667.
- Diniz GP, Carneiro-Ramos MS & Barreto-Chaves ML (2010). Thyroid hormone increases TGF- $\beta$ 1 in cardiomyocytes cultured independently of angiotensin II type 1 and type 2 receptors. *Int J Endocrinol* **2010**, 384890.
- Eder M (1982). Assessment of sympathetic nervous function in humans from noradrenaline plasma kinetics. *Clin Sci (Lond)* **62**, 247–254.
- Farah VM, Joaquim LF & Morris M (2006). Stress cardiovascular/autonomic interactions in mice. *Physiol Behav* **89**, 569–575.
- Fazan R Jr, de Oliveira M, da Silva VJ, Joaquim LF, Montano N, Porta A, Chapleau MW & Salgado HC (2005). Frequency-dependent baroreflex modulation of blood pressure and heart rate variability in conscious mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**, H1968–H1975.
- Ferreira E, Silva A, Serakides R, Gomes A & Cassali G (2007). Model of induction of thyroid dysfunctions in adult female mice. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecia* **59**, 1245–1249.
- Fisman EZ, Timenbaum A & Pines A (2002). Systemic hypertension in postmenopausal women: a clinical approach. *Curr Hypertens Rep* **4**, 464–470.
- Freitas-FSS (2011). Investigation of cardiovascular and microcirculatory changes in a model of experimental hyperthyroidism. MSc thesis. Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- Grimm D, Cameron D, Griese DP, Riegger GA & Kromer EP (1998). Differential effects of growth hormone on cardiomyocyte and extracellular matrix protein remodeling following experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res* **40**, 297–306.
- Guzzetti S (2001). Heart rate variability. *Ital Heart J Suppl* **2**, 450–454.
- Harris AR, Vagenakis AG & Braverman LE (1979). Sex-related differences in outer ring monodeiodination of thyroxine and 3,3',5'-triiodothyronine by rat liver homogenates. *Endocrinology* **104**, 645–652.
- Hayashi T, Palmito JM, Ignarro LJ & Chaudhuri G (1992). Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 11259–11263.
- Hong-Brown LQ & Descheppe CF (1992). Effects of thyroid hormones on angiotensinogen gene expression in rat liver, brain, and cultured cells. *Endocrinology* **130**, 1231–1237.
- Huang CJ, Geller HM, Green WL & Cradock W (1999). Acute effects of thyroid hormone analogs on sodium currents in neonatal rat myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **31**, 881–893.
- Hull SS Jr, Vanoli E, Adamson PB, De Ferrari GM, Foreman RD & Schwartz PJ (1995). Do increases in markers of vagal activity imply protection from sudden death? The case of scopolamine. *Circulation* **91**, 2516–2519.
- Ishii K, Kneahara M, Tsubone H & Sugano S (1996). Autonomic nervous function in mice and voles (*Microtus arvalis*): investigation by power spectral analysis of heart rate variability. *Lab Anim* **30**, 359–364.
- Joaquim LF, Farah VM, Bernatova I, Fazan R Jr, Grubbs R & Morris M (2004). Enhanced heart rate variability and baroreflex index after stress and cholinesterase inhibition in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**, H251–H257.
- Jouven X, Empana JP, Schwartz PJ, Desnos M, Courbon D & Ducimetiere P (2005). Heart-rate profile during exercise as a predictor of sudden death. *N Engl J Med* **352**, 1951–1958.
- Kahaly GJ & Dillmann WH (2005). Thyroid hormone action in the heart. *Endocr Rev* **26**, 704–728.
- Kaminski GW, Makowski K, Michalkiewicz D, Kowal J, Ruchala M, Szczepanek E & Gielera G (2012). The influence of subclinical hyperthyroidism on blood pressure, heart rate variability and incidence of arrhythmia. *Thyroid* **22**, 454–460.
- Kannel WB, Hjortland MC, McNamara PM & Gordon T (1976). Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. *Ann Intern Med* **85**, 447–452.
- Karthik S, Pal GK, Nanda N, Hamide A, Bobby Z, Arundharaj D & Pal P (2009). Sympathovagal imbalance in thyroid dysfunctions in females: correlation with thyroid profile, heart rate and blood pressure. *Indian J Physiol Pharmacol* **53**, 243–252.
- Kleiger RE, Miller JP, Bigger JT Jr & Moss AJ (1987). Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* **59**, 256–262.
- Klein I (1988). Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: time course of development and inhibition by propranolol. *Endocrinology* **123**, 203–210.
- Klein I (1990). Thyroid hormone and the cardiovascular system. *Am J Med* **88**, 631–637.
- Klein I & Ojamaa K (1998). Thyrotoxicosis and the heart. *Endocrinol Metab Clin North Am* **27**, 51–62.
- Klein I & Ojamaa K (2001). Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N Engl J Med* **344**, 501–509.

- Kobori H, Ichihara A, Miyashita Y, Hayashi M & Saruta T (1999). Local renin-angiotensin system contributes to hyperthyroidism-induced cardiac hypertrophy. *J Endocrinol* 160, 43–47.
- Kobori H, Ichihara A, Suzuki H, Takenaka T, Miyashita Y, Hayashi M & Saruta T (1997). Role of the renin-angiotensin system in cardiac hypertrophy induced in rats by hyperthyroidism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 273, H593–H599.
- Kobino M, Takaori K, Matsuzura T, Muraikawa K, Kanayama Y & Takeda T (1986). Atrial natriuretic polypeptide in atria and plasma in experimental hyperthyroidism and hypothyroidism. *Biochem Biophys Res Commun* 134, 178–183.
- Lima LP, Barros IA, Lisboa PC, Arango RL, Silva AC, Rosenthal D, Ferreira AC & Carvalho DP (2006). Estrogen effects on thyroid iodide uptake and thyroperoxidase activity in normal and ovariectomized rats. *Seminars* 71, 653–659.
- Lisboa PC, Cariry FH, Moreira RM & Passos-Moura CC (1997). Effects of estradiol benzoate on 5'-iodothyronine deiodinase activities in female rat anterior pituitary gland, liver and thyroid gland. *Braz J Med Biol Res* 30, 1479–1484.
- Long JA & Evans HM (1922). *The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena*, Vol. 6. University of California Press, California.
- Luchner A, Brockel U, Mitscholl M, Hense HW, Doring A, Riegger GA & Schunkert H (2002). Gender-specific differences of cardiac remodeling in subjects with left ventricular dysfunction: a population-based study. *Cardiovasc Res* 53, 720–727.
- Luna LG (1968). *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*, Vol. 121. McGraw-Hill, New York.
- McCabe PM, Forgas SW & Carter CS (1981). Heart period variability during estrogen exposure and withdrawal in female rats. *Physiol Behav* 26, 535–538.
- Malliani A, Lombardi F, Pagani M & Cerutti S (1994). Power spectral analysis of cardiovascular variability in patients at risk for sudden cardiac death. *J Cardiovasc Electrophysiol* 5, 274–286.
- Marassi MP, Fortunato RS, da Silva AC, Pereira VS, Carvalho DP, Rosenthal D & da Costa VM (2007). Sexual dimorphism in thyroid function and type 1 iodothyronine deiodinase activity in pre-pubertal and adult rats. *J Endocrinol* 192, 121–130.
- Marchant C, Brown L & Sernia C (1993). Renin-angiotensin system in thyroid dysfunction in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 22, 449–455.
- Mecawi AS, Vilhena-Franco T, Fonseca FV, Reis LC, Elias LL & Antunes-Rodrigues J (2013). The role of angiotensin II on sodium appetite after a low-sodium diet. *J Neuroendocrinol* 25, 281–291.
- Mendelsohn ME & Karas RH (2005). Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science* 308, 1583–1587.
- Merlane H, Onagazzal AM, Anbart L, Wietrzyn M & Krenz W (2007). Estrous cycle effects on behavior of C57BL/6J and BALB/cByJ female mice: implications for phenotyping strategies. *Genes Brain Behav* 6, 192–200.
- Mirzoli L, Fedele L, Benetti M, Bolla GB, Radaelli A, Perlini S & Ferrari AU (2002). Preservation of the baroreceptor heart rate reflex by chemical sympathectomy in experimental heart failure. *Circulation* 106, 866–872.
- Nickenig G, Baumer AT, Grohe C, Kahlert S, Stroblow K, Rosenkranz S, Stabilein A, Beckers F, Smits JF, Daemen MJ, Vetter H & Böhm M (1998). Estrogen modulates AT<sub>1</sub> receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation* 97, 2197–2201.
- Nogawa N, Sumino H, Ichikawa S, Kamakura H, Takayama Y, Nakamura T, Kanda T, Mizumura H & Kurobayashi M (2001). Effect of long-term hormone replacement therapy on angiotensin-converting enzyme activity and bradykinin in postmenopausal women with essential hypertension and normotensive postmenopausal women. *Menopause* 8, 210–215.
- Ottien JV, Fitch CD, Wheatley JB & Fischer VW (1986). Thyrotoxic myopathy in mice: accentuation by a creatine transport inhibitor. *Metabolism* 35, 481–484.
- Pantos C, Palits I, Monrouzis I, Moraitis P, Theis S, Karamanolis E, Monrouzis C, Karagorgiotas H & Cokkinos DV (2005). Blockade of angiotensin II type 1 receptor diminishes cardiac hypertrophy, but does not abolish thyroxine-induced preconditioning. *Horm Metab Res* 37, 500–504.
- Paul M, Poyan Mehr A & Krenz R (2006). Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 86, 747–803.
- Pereira-Junior PF, Chaves EA, Costa-e-Sousa RH, Masada MC, Campos de Carvalho AC & Nascimento JHM (2006). Cardiac autonomic dysfunction in rats chronically treated with anabolic steroid. *Eur J Appl Physiol* 96, 487–494.
- Polikar R, Burger AG, Scherzer U & Nicod P (1993). The thyroid and the heart. *Circulation* 87, 1435–1441.
- Safa-Tisserant V, Ponchon P, Lande D & Elghorzi JL (1998). Contribution of the autonomic nervous system to blood pressure and heart rate variability changes in early experimental hyperthyroidism. *Eur J Pharmacol* 352, 247–255.
- Sakabe D, Catal A, Neves V, Oliveira L, Silva de Sá M, Azevedo G, Gallo (junior) L, Martins L & Silva E (2004). Analysis of heart autonomic modulation during resting conditions in middle-aged men and postmenopausal women. *Braz J Phys Ther (Imp)* 8, 89–95.
- Santini F, Hard RE, Lee B & Chopra IJ (1994). Sex-related differences in iodothyronine metabolism in the rat: evidence for differential regulation among various tissues. *Metabolism* 43, 793–797.
- Schunkert H, Danser AH, Hense HW, Derks FH, Kruztiger S & Riegger GA (1997). Effects of estrogen replacement therapy on the renin-angiotensin system in postmenopausal women. *Circulation* 95, 39–45.
- Schwartz PJ (1998). The autonomic nervous system and sudden death. *Eur Heart J* 19(Suppl F), F72–F80.
- Schwartz PJ & De Ferrari GM (2009). Vagal stimulation for heart failure: background and first in-man study. *Heart Rhythm* 6, S76–S81.
- Sernia C, Marchant C, Brown L & Hoey A (1993). Cardiac angiotensin receptors in experimental hyperthyroidism in dogs. *Cardiovasc Res* 27, 423–428.



- Shigematsu S, Iwasaki T, Akawa T, Ishihara M, Shinoda T, Yamada T, Sato A & Takemura Y (1989). Plasma atrial natriuretic peptide, plasma renin activity and aldosterone during treatment of hyperthyroidism due to Graves' disease. *Horm Metab Res* 21, 514–518.
- Silva JE & Bianco SD (2008). Thyroid–adrenergic interactions: physiological and clinical implications. *Thyroid* 18, 157–165.
- Silva-Antonioli MM, Fortes ZB, Carvalho MH, Scivoletto R & Nigro D (2000). Sexual dimorphism in the response of thoracic aorta from SHR to losartan. *Gen Pharmacol* 34, 329–335.
- Silva-Antonioli MM, Tostes RC, Fernandes L, Fior-Chadi DR, Akamine EH, Carvalho MH, Fortes ZB & Nigro D (2004). A lower ratio of AT<sub>1</sub>/AT<sub>2</sub> receptors of angiotensin II is found in female than in male spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 62, 587–593.
- Sjaastad I, Sejersted OM, Hebekk A & Bjornarheim R (2000). Echocardiographic criteria for detection of postinfarction congestive heart failure in rats. *J Appl Physiol* 89, 1445–1454.
- Souza SB, Flaes K, Paulini J, Mostarda C, Rodrigues B, Souza LE, Irigoyen MC & De Angelis K (2007). Role of exercise training in cardiovascular autonomic dysfunction and mortality in diabetic ovariectomized rats. *Hypertension* 50, 786–791.
- Staffineth JS & Morrison ND (1968). Heart size in thyrotoxicosis. *Postgrad Med J* 44, 885–890.
- van Dijk-Otters M, Vos IH, Cornelissen PW, de Bruijn A & Everts ME (2010). Thyroid hormone-induced cardiac mechano growth factor expression depends on heating activity. *Endocrinology* 151, 830–838.
- Vanoli E, De Ferrari GM, Stramba-Badiale M, Hull SS Jr, Foreman RD & Schwartz PJ (1991). Vagal stimulation and prevention of sudden death in conscious dogs with a healed myocardial infarction. *Circ Res* 68, 1471–1481.
- Wallukat G (2002). The  $\beta$ -adrenergic receptors. *Herz* 27, 683–690.
- Wang B, Ouyang J & Xia Z (2006). Effects of triiodo-thyronine on angiotensin-induced cardiomyocyte hypertrophy: reversal of increased  $\beta$ -myosin heavy chain gene expression. *Can J Physiol Pharmacol* 84, 935–941.
- Wickenden AD, Kaprielian R, Parker TG, Jones OT & Backs PH (1997). Effects of development and thyroid hormone on K<sup>+</sup> currents and K<sup>+</sup> channel gene expression in rat ventricle. *J Physiol* 504, 271–286.
- Winberg N, Haegholm A, Christensen HR, Bang LE, Mikkelsen KL, Nielsen PE, Svendsen TL, Kampmann JP, Madsen NH & Bentzen MW (1995). 24-h ambulatory blood pressure in 352 normal Danish subjects, related to age and gender. *Am J Hypertens* 8, 978–986.
- Wong NL, Huang D, Gao NS, Wong EF & Hu DC (1989). Effects of thyroid status on atrial natriuretic peptide release from isolated rat atria. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 256, E64–E67.
- Xiao P, Gao C, Fan J, Du H, Long Y & Yin Y (2011). Blockade of angiotensin II improves hyperthyroid induced abnormal atrial electrophysiological properties. *Regul Pept* 169, 31–38.
- Yegor E, Yigitoglu R, Ari Z, Calik I, Akcay F & Suzak H (1997). Serum angiotensin-converting enzyme and plasma atrial natriuretic peptide levels in hyperthyroid and hypothyroid rabbits. *Jpn Heart J* 38, 273–279.
- Yoshida H, Rosano G, Shimizu M, Mochizuki S & Yoshimura M (2011). Gender differences in the effects of angiotensin receptor blockers on cardiovascular disease. *Curr Pharm Des* 17, 1090–1094.

### Additional Information

#### Conflict of Interest

None declared.

#### Author contributions

All authors contributed extensively to the work presented in this paper. E.L.O., A.C.M.S. and M.F.M. designed the study and interpreted the data; E.L.O. and A.L.B.S. administered the experiment and wrote the manuscript; E.L.O. and J.A.R. jointly conceived the study; M.F.S., A.S.M., A.L.B.S. and R.L.M. conducted all experiments, collected and analyzed all data; E.L.O. and J.A.R. provided reagents and mice.

#### Funding

The authors thank the National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)) and the Research Support Foundation of the State of Rio de Janeiro (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)) for funding the present study. Graduate student Mariana França was supported by a grant from the Federal Agency for the Support and Evaluation of Graduate Education (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)) during the present study.