

Rosane Carla Montanari Bauab

**Ratos com Insuficiência
Cardíaca Congestiva (ICC)
como modelo experimental
para o estudo da Síndrome
do T₃ baixo.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação “Fisiopatologia em Clínica Médica”, Área de Concentração: Metabolismo e Nutrição da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre.

Botucatu – SP

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Profa. Dra. Célia Regina Nogueira

Orientadora

"...Deus se esconde no instante seguinte ao de cada percepção de sua existência; parece que ELE quer que a sua procura seja incessante e nos faça melhores e mais ativos na busca, sendo, sempre, pessoas ADIANTE e nunca pessoas ANTES..."

Artur da Távola

Este trabalho é dedicado à minha orientadora
Profa. Dra. Célia Regina Nogueira, meu marido
Raul, minha filhinha Carolina, meus pais e minha
sogra.

Agradecimentos Especiais

- *Em primeiro lugar, agradeço muito a Deus que me proporcionou a vida e a saúde. E por todas as maravilhas e bênçãos que tem derramado em minha vida e em minha família e por todas as pessoas maravilhosas que fazem parte da minha história.*
- *A minha querida orientadora Profa. Dra. Célia Regina Nogueira a qual dedico esse trabalho por tudo de bom que ela me proporcionou: sua amizade, competência, dedicação, profissionalismo, bondade, carinho e tudo que ela me fez e ensinou. Ela é a responsável pela execução desse trabalho pela força e confiança depositadas em mim.*
- *A meu amado marido Raul, companheiro, amigo, conselheiro, paciente e modelo para minha vida como pessoa humana e profissional.*
- *A minha querida filhinha Carolina por sua existência maravilhosa, amor e carinho: uma das razões de minha vida.*
- *Aos meus queridos pais Antonio e Célia, que me deram a vida e todo o incentivo. Por todo o carinho, ajuda, dedicação e amor.*
- *A minha querida sogra Mirna por todo a sua ajuda, colaboração e carinho.*
- *A querida amiga Sueli Clara (Laboratório Experimental – UNESP – Botucatu) que além de ser uma grande amiga muito me ajudou em todos os momentos e pela sua grande dedicação e ajuda para a realização desse trabalho.*

Agradecimentos

- *A todos os companheiros do Laboratório Experimental da Clínica Médica (UNESP – Botucatu). Em especial ao Vitor por toda a sua competência e ajuda na execução da técnica desse trabalho.*
- *Ao José Carlos Georgete, do Laboratório Experimental da Clínica Médica (UNESP – Botucatu) por todos os esforços, competência e dedicação à sua profissão em especial por todos os favores que foram prestados em minhas necessidades.*
- *Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Cicogna por toda sua dedicação e competência na colaboração desse trabalho.*
- *Aos amigos do Laboratório de Oncologia da Profa. Dra. Maria Mitzi Bentrani – FM-USP, por toda paciência, dedicação e ajuda para me ensinar, em especial a Dra. Maria Lúcia Hirata Katayama.*
- *A todos os funcionários do departamento de Clínica Médica – UNESP, Botucatu, por todas as ajudas, prontidão e amizade.*
- *A secretária da Pós Graduação Ana Maria Mengue, do Departamento de Clínica Médica – UNESP – Botucatu, por toda a sua amizade, profissionalismo, competência e ajuda em todas as nossas dificuldades e dúvidas.*
- *A Profa. Dra. Ana Valéria Barros de Castro por todas as suas sugestões, apoio e amizade.*

- *Ao Prof. José Celso Soares Vieira que muito me ensinou e ajudou com nossa Língua Portuguesa e por sua amizade.*
- *A querida Profa. Gretje por sua amizade, competência e ajuda com a língua Inglesa.*

Lista de Figuras

- Figura 1.** Deinodinação das iodotironinas e seus derivados..... 7
- Figura 2.** Gel de agarose a 1%, mostrando a integridade do RNA. O RNA total foi isolado do músculo cardíaco de ratos controle (CONT), dos animais submetidos à estenose aórtica que desenvolveram a insuficiência cardíaca congestiva (ICC), e dos ratos que não desenvolveram a insuficiência cardíaca congestiva sendo classificados com estenose aórtica (EAO). O RNA foi isolado pela técnica fenol-clorofórmio descrita anteriormente, e mostra a integridade do material não tendo degradação ou contaminação de DNA..... 30
- Figura 3** Gráfico da média do conteúdo relativo \pm SD do RNAm do TR α_1 medidos em 2 experimentos separados, com 3 amostras diferentes para cada grupo em cada experimento. Controle (C), Estenose Aórtica (EAo) e Insuficiência Cardíaca Congestiva (ICC). O RNA total foi isolado do Ventrículo Esquerdo (VE) e hibridado com sonda do TR α_1 . Os auto-radiogramas foram analisados densitometricamente e o resultado foi normalizado com controle interno (18S)..... 32
- Figura 4** Gráfico do conteúdo relativo \pm SD do RNAm do TGF β_1 medidos em 3 experimentos separados, foram utilizadas 2 amostras de cada grupo para cada experimento. Controle (C), Estenose Aórtica (EAo) e Insuficiência Cardíaca Congestiva (ICC). O RNA total foi extraído do Ventrículo Esquerdo (VE) e submetido ao RT-PCR semiquantitativo para determinar a quantidade de RNAm do TGF β_1 e o resultado foi normalizado pelo controle interno (18S)..... 33

Lista de Tabelas

Tabela 1	Parâmetros clínicos observados durante o sacrifício.....	26
Tabela 2	Parâmetros corporais dos ratos estudados.....	27
Tabela 3	T ₃ reverso obtido da conversão hepática e renal de T ₄	29

Resumo

Em algumas circunstâncias clínicas (má nutrição, infecção insuficiência hepática ou renal, doença sistêmica, infecção com vírus da imunodeficiência (HIV), trauma e pós-operatório), redução da concentração sérica da triiodotironina (T_3), aumento da concentração do T_3 reverso (rT_3), com concentração normal do hormônio estimulante da tireóide (TSH), sem evidências clínicas de hipotireoidismo, denominada síndrome do T_3 baixo.

Além das patologias citadas acima, algumas situações cardiovasculares estão associadas com a síndrome: “Bypass” Cardiopulmonar, Transplante Cardíaco, Insuficiência Cardíaca Congestiva, Infarto do Miocárdio e Terapêutica com Amiodarona.

A literatura têm demonstrado o aumento do rT_3 e diminuição do T_3 com pior prognóstico dos pacientes com insuficiência cardíaca grau III e IV, e esses pacientes apresentam melhora clínica da insuficiência com o tratamento hormonal.

Ao mesmo tempo, a literatura é controversa, em relação a quantidade de hormônios tireoideanos (HT) adequada para tratar a Insuficiência Cardíaca e o melhor tempo de tratamento. Além disso, é discutível se o tratamento seria benéfico ou maléfico para esses pacientes

Torna-se, portanto, importante definirmos um modelo experimental que permitirá estudar a Síndrome do T_3 baixo na insuficiência cardíaca e comprovar se o tratamento hormonal é um benefício ou malefício para esses pacientes .

Através da estenose aórtica realizada pela clipagem da artéria aorta conseguimos provocar Insuficiência Cardíaca em ratos de

laboratório. Os ratos foram avaliados diariamente em relação aos aspectos clínicos (taquipnéia, cianose, edema, pelos arrepiados) e no momento do sacrifício foram analisados os parâmetros anatômicos (derrame pleuro-pericárdico, trombo no átrio esquerdo, aumento do volume de átrios, hipertrofia de ventricular direito e esquerdo, ascite e hepatomegalia). Os animais que apresentavam esses sinais clínicos e anatômicos foram classificados como portadores de insuficiência (ICC) e os que não apresentaram, como portadores de estenose aórtica (EAo).

Analisamos o RT-PCR para o $TGF\beta_1$ e verificamos que esse fator de crescimento é expresso de maneira significativamente maior no ventrículo esquerdo de ratos com EAo e ICC em relação aos ratos controles. Essa análise, associada ao estudo dos parâmetros anatômicos comprovou a presença de hipertrofia ventricular dos ratos com EAo e com ICC.

A análise da concentração do rT_3 e do T_3 gerado da deiodinação hepática e renal mostrou uma elevação e diminuição significativa respectivamente na concentração desses hormônios nos ratos com ICC.

Demonstramos que o $TR\alpha_1$ é expresso em maior magnitude no ventrículo esquerdo de ratos com ICC em relação aos ratos controles e com EAo.

A partir da evidência da presença da Síndrome do T_3 baixo nos ratos com insuficiência cardíaca e do aumento da expressão dos receptores de hormônio tireoideanos nesses ratos definimos um modelo experimental que permitirá estudar a Síndrome do T_3 baixo na Insuficiência Cardíaca.

Palavras-chave: Insuficiência Cardíaca Congestiva; T_3 Reverso; Tireóide; Coração.

Abstract

In some clinical circumstances (bad nutrition, infection, kidney or liver insufficiency, systemic disease, immunodeficiency infection (HIV), trauma and postoperative), reduction of serum concentration of triiodothyronine (T_3), the increase of reverse T_3 concentration (rT_3), with normal concentration of thyroid stimulant hormone (TSH), without clinical evidences of hypothyroidism, called low T_3 syndrome.

Other pathologies like some cardiovascular situations are associated with the syndrome: "Bypass" Cardiopulmonary, Cardiac Transplant, Congestive Cardiac Insufficiency, Myocard Infarct and treatment with amiodarone.

The literature has demonstrated the increase of rT_3 and the diminish of T_3 with worse prognosis for patients with cardiac insufficiency level III and IV, and those patients show clinical improvement of insufficiency with hormonal treatment.

At the same time the literature is controversial in relation to the quantity of Thyroid hormones (TH) ideal to treat the cardiac Insufficiency and the best time for treatment. Besides, it's questionable if the treatment would be beneficial or malefic for those patients.

Consequently it becomes, important to define an experimental model that would permit us to study the Low T_3 Syndrome in the cardiac insufficiency and to certify if the hormonal treatment is a benefit or malefection for those patients.

Through the aortic stenosis made by clip of the aorta we provoke cardiac insufficiency in mice of laboratory. Those mice were evaluated daily in relation to the clinical aspects (tachypnea, edema,

erected hair) and in the moment of sacrificing were analysed the anatomic parameters (pleuro-pericardic stroke, clot in the left atrio, increase of atrio volume, right and left ventricular hipertrofia, ascit and hepatomegalia). Those animals which presented clinical and anatomic signs were classified *as messengers* of congestive cardiac insufficiency, as the holders of CCI and those which didn't demonstrate to be aortic stenosis holders (AoS).

We analised the RT-PCR to the TGF beta 1(TGF β 1) and verified that the growing factor is expressed in manner significantly bigger in left ventriculo mice with AoS and ICC in relation to control mice. That analysis, associated with anatomic parameter studies proved the presence of venticulos hipertrofie in mice with AoS and with ICC .

The analysis of rT₃ and T₃ concentration produced from liver and kidney deiodination showed a significant elevation and diminution, respectively, in the concentration of those hormones in mice with CCI.

We demonstrated that thyroid hormone receptor (TR) alfa 1 is expressed in greater magnitude in left ventricular mice with CCI in relation to the control mice and with AoS.

Upon the evidence of the presence of Low T₃ Syndrome in mice with cardiac insufficiency and the increase of expression of thyroid hormone receptor in mice, we define an experimental model that permits to study the T₃ Syndrome in CI.

Keywords: T₃ reverse; thyroid; congestive cardiac insufficiency; heart.

Introdução

Para entendermos a Síndrome do T₃ baixo, nosso modelo de estudo, é necessária uma breve revisão do mecanismo de ação do hormônio tireoidiano no coração e do metabolismo periférico dos hormônios tireoidianos.

1. Mecanismo de ação do Hormônio Tireoidiano (HT) no coração

Os efeitos biológicos dos hormônios tireoidianos (HT) são desencadeados por meio da sua interação com receptores nucleares que se apresentam em regiões específicas do DNA, o que determina a ativação ou inibição de seus genes-alvo e o controle da síntese de proteínas específicas (Bassett JHD e cols., 2003).

Existem dois genes distintos que codificam os receptores para o hormônio tireoidiano (TR) que são os TR α e TR β , que nos humanos, localizam-se nos cromossomos 17 e 3 respectivamente. Cada um destes genes codifica várias proteínas (α 1, α 2, $\Delta\alpha$ 1, $\Delta\alpha$ 2, β 1, β 2, β 3, $\Delta\beta$ 3), que são o resultado do processamento alternativo do RNA mensageiro (*splicing* alternativo) ou da utilização de promotores alternativos (Flamant F. e cols., 2003). Dessa forma, as diferentes isoformas do TR são α 1, α 2, β 1, β 2 e β 3, sendo que somente α 1, β 1, β 2 e β 3 se ligam ao hormônio. As isoformas α 1 e α 2 diferem somente em sua região carboxi-terminal e, por esse motivo, a isoforma α 2 não se liga ao hormônio, enquanto que as isoformas β 1, β 2 e β 3 diferem em sua região amino-terminal (Lazar, MA, 1993). A isoforma TR β 3 foi recentemente descrita em ratos (Williams GR., 2000) e, a partir da comparação das seqüências genômicas destes

animais com os humanos, pode-se prever que esta isoforma está conservada entre as duas espécies (Flamant F., e cols., 2003). A isoforma TR α 2, por não se ligar ao T₃, pode inibir a transcrição mediada por TR β 1 ou TR α 1, provavelmente por competir com a ligação ao elemento responsivo ao hormônio Tireodiano (TRE) e com a formação de heterodímeros com a família de receptores do ácido retinóico (RXR) (Ribeiro RCJ, e cols., 1998).

A expressão dos RNAs mensageiros dos TRs varia com o desenvolvimento e com a diferenciação celular (Lazar MA., 1993). Os RNAs mensageiros do TR α 1, Tr α 2 e TR β 1 são expressos em quase todos os tecidos, ainda que em níveis diferentes. Assim, o Tr α 1 é abundante nos músculos esqueléticos, gordura marrom e no coração, o Tr α 2 é particularmente abundante no cérebro e o TR β 1 é expresso em grande quantidade no fígado, rim e cérebro. Já o TR β 2 é expresso principalmente na glândula pituitária e em outras áreas do cérebro (Lazar MA, 1993 e Hodin RA., e cols., 1989). O TR $\Delta\alpha$ 1 e TR $\Delta\alpha$ 2 são encontrados principalmente no epitélio do intestino delgado, pulmão e durante os estágios precoces do desenvolvimento (Flamant F., e cols., 2003). Em ratos, o TR β 3 é expresso no fígado, rim e pulmão, enquanto que o TR $\Delta\beta$ 3 no músculo esquelético, coração, baço e cérebro (Williams GR., 2000). Essa expressão variada dos TRs pode constituir um mecanismo usado pelo T₃ para a regulação da transcrição de forma seletiva para alguns tecidos (Yen PM., 2001).

Como exemplos de genes alvo do T₃ existe o hormônio de crescimento (GH) (Volpato CB., e cols., 2001 e Samuels HH., 1987), a MHC I e II (cadeia pesada da miosina do tipo I e II) (Fitts RH., e cols., 1980 e Santos RA., e cols., 2001), a α e β MHC (isoforma α e β da cadeia pesada da miosina), a Serca I e II (isoformas I e II da bomba de cálcio do retículo sacorplasmático) (Nunes MT., e cols.,1985 , Rohrer D., e cols.,

1988 e Balkman C., e cols., 1992), o receptor β adrenérgico (Williams LT., e cols.,1977), o NGF (fator de crescimento neuronal) (Smith JW., e cols.,2002), o Hormônio estimulador da tireóide (TSH) (Shypnik MA., 2000), o Hormônio hipotalâmico liberador do TSH (TRH) (Guissouma H.,e cols., 1998), entre outros.

Uma série de eventos resultantes da ação do HT ocorrem rapidamente e não são afetados por inibidores da transcrição e da translação, sugerindo que o HT pode agir de forma não genômica (Bassett JHD e cols., 2003).

Uma das características que distinguem ações genômicas das não-genômicas do HT incluem: (a) a necessidade da presença do receptor nuclear para estabelecimento das ações genômicas, o que não se verifica para o estabelecimento de ações não-genômicas, as quais podem ser evidenciadas, por exemplo, em hemácias, que, como se sabe, são células anucleadas; (b) o tempo de desencadeamento do efeito biológico que, no caso da ação genômica, é suficientemente longo para permitir a ativação da transcrição gênica, e que no caso da ação não-genômica, se verifica de segundos a minutos até 1 hora;(c) os efeitos que são desencadeados preferencialmente pelo T_3 , no caso da ação genômica, enquanto a ações não-genômicas ocorrem tanto por ação do T_3 , T_4 , como também por T_3 reverso (rT_3) e T_2 , iodotironinas estas consideradas biologicamente inativas em termos de ações nucleares dos HT, já que a afinidade dos TRs por elas é praticamente nula; (d) a amplitude do efeito biológico que é extremamente elevada na ação genômica e pequena (em geral menor que uma vez, podendo ser até de várias vezes) na ação não genômica e (e) pouco ou nenhum envolvimento das vias de transdução de sinais na ação genômica, enquanto várias das ações definidas como não-genômicas envolvem as vias relacionadas ao AMPc, Calmodulina, fosfatidilinositol, as quais ativam quinases protéicas específicas (Davis PJ, e cols., 1996).

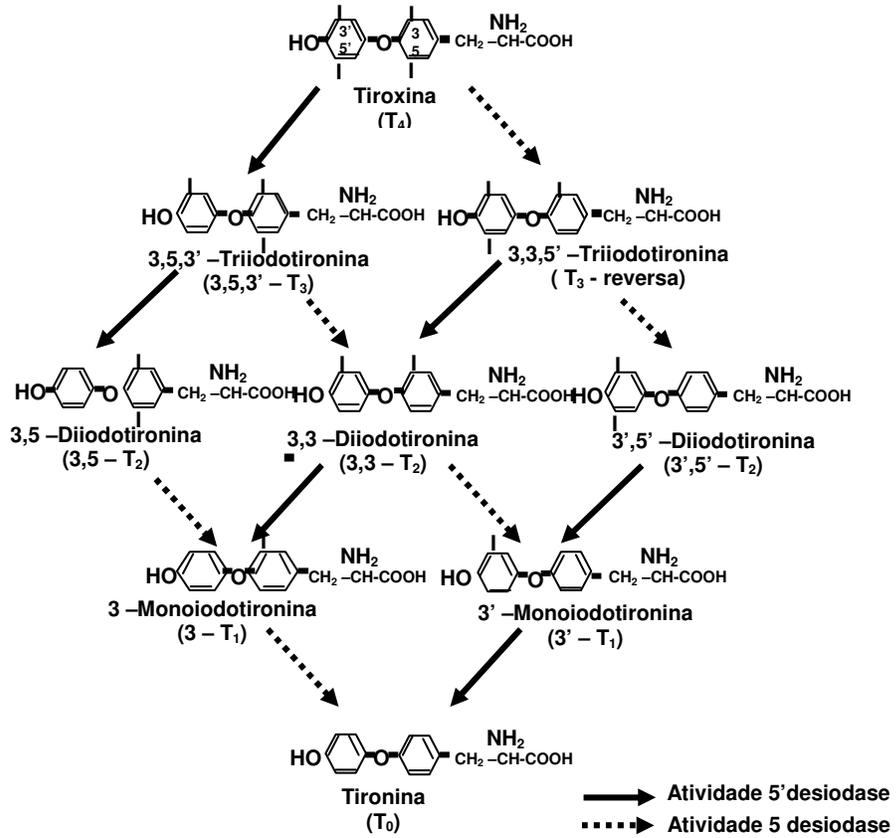
Pouco existe na literatura a respeito da ação do T_3 no coração. Essa ação ocorre por meio de três vias:

- Estimulando a síntese de proteínas específicas para a contratilidade do miocárdio (miosina de cadeia pesada) (Hoth & Egerton, 1979; Chizzonite & Zalk, 1984), e aumentando a expressão da bomba iônica Ca^{++} ATPase (que remove o Ca^{++} do citosol para o retículo endoplasmático durante a diástole) (Rohrer & Dillman, 1988). Estudos em células em cultura sugerem que essa ação do hormônio tireoidiano ocorre rapidamente e por ação não-genômica (Davis & Davis, 2002). O T_3 também aumenta o Ca^{+2} no retículo sarcoplasmático agindo na contratilidade e na atividade arritmica mediada pelo cálcio sugerindo que o T_3 tem uma ação não-genômica positiva inotrópica e um efeito correlacionado a arritmia (Wang YG e cols., 2003) O hipertireoidismo aumenta a expressão da α miosina e diminui a expressão da β miosina (Dillmann, 1990).
- Altera a sensibilidade do coração ao sistema das catecolaminas por aumentar o número de receptores β adrenérgicos (Hammond e cols., 1987; Levey & Klein, 1990; Bilezikian & Loeb, 1983).
- Através de efeitos hemodinâmicos: o T_3 aumenta o consumo de O_2 periférico e aumenta o metabolismo basal que requer aumento do suprimento sanguíneo (em pacientes com hipertireoidismo diminui a resistência arterial periférica e aumenta o tônus venoso levando a um aumento do retorno venoso ao coração) (Kapitola & Vilimovska 1988). Essa ação ocorre, em adultos normais em 3 minutos, sugerindo ser uma ação não-genômica do HT (Wang YG e cols., 2003).

2. Metabolismo Periférico dos Hormônios Tireóideos

Embora a tireóide humana secrete aproximadamente 15 vezes mais moléculas de T_4 que de T_3 , o receptor para hormônio tireóideo tem afinidade 10 a 15 vezes maior pelo T_3 que pelo T_4 . Assim, o hormônio metabolicamente ativo é o T_3 , enquanto o T_4 é considerado apenas um pró-hormônio (Bianco e Kimura, 1999). Duas enzimas diferentes catalisam a conversão de T_4 para T_3 , as iodotironinas desiodase tipo 1 e tipo 2 (D1 e D2). Mais recentemente, identificou-se uma enzima que leva à inativação de T_3 e T_4 , pela desiodação do anel interno, a iodotironina desiodase tipo 3 (D3) (Fig 01). A D1 e a D2 catalisam a desiodação do anel externo das iodotironinas (desiodação 5'), sendo possível distingui-las devido à diferença de sensibilidade ao propiltiouracil (PTU), pois a D1 é inibida por este composto, enquanto a D2 não o é (Bianco, 2002). Esses aminoácidos raros parecem ser importantes para a reação de desiodação, uma vez que a deficiência leva à diminuição da atividade desiodase (Beckett e cols., 1987).

Figura 1. Deinodinação das iodotironinas e seus derivados



Adaptado de Engler & Bulger (1984) e Leonard & Visser (1988)

A isoenzima D1 é responsável pela geração de uma fração significativa do T_3 plasmático. Ela catalisa a 5' desiodação de T_4 gerando T_3 , mas também é capaz de realizar a desiodação do anel interno das iodotironinas (5- desiodação) gerando o rT_3 (Bianco AC e cols.,2002, Leonard & Visser, 1988). A D1 está amplamente distribuída pelo corpo e a sua localização subcelular ainda não está totalmente elucidada, embora se saiba que se trata de uma proteína integral de membranas celulares. A provável localização da D1 é a membrana plasmática, o que facilitaria o acesso do T_4 circulante à enzima, assim como a entrada, no plasma, do T_3 produzido a partir do T_4 (Bianco AC e cols., 2002).

Os hormônios tireóideos são os estimuladores mais potentes da D1, estando bem estabelecido que os hormônios tireóideos aumentam a atividade e/ou o RNAm para D1 em ratos, camundongos e humanos (Bianco AC e cols.,2002). Já na tireóide, a D1 parece ter uma modulação diferenciada, sendo o TSH um importante estimulador da atividade D1 tireóidea.

A atividade D1, principalmente a hepática e a renal, é de grande importância para a geração de T_3 sérico em humanos (Bianco AC e cols., 2002).

Iodotironina Desiodase Tipo 2 (D2)

Esta isoforma catalisa apenas a remoção do iodo do anel externo do hormônio tireóideo.

Assim como a D1, a isoforma tipo 2 também é uma proteína integral de membrana, sendo provável, entretanto, que se trate de uma enzima residente no retículo endoplasmático. Isto poderia explicar por que o T_3 gerado pela D2 a partir do T_4 teria rápido acesso ao núcleo. A

D2 apresenta distribuição tecidual relativamente ampla, embora mais restrita que a de D1 (Bianco AC e cols., 2002).

A atividade D2 é modulada em resposta a alterações séricas dos hormônios tireóideos. No hipotireoidismo há aumento da atividade e do RNAm para D2 no cérebro de ratos, enquanto a reposição hormonal leva à redução de ambos. Esta regulação parece ser importante para proteger os tecidos que expressam D2 contra os efeitos deletérios de quantidades insuficientes ou excessivas de T_3 (Bianco AC e cols., 2002). Além da regulação por T_3 , a atividade D2 hipofisária é também regulada por TRH, cujo efeito é estimulatório (Kohrle J e cols., 1991).

A principal contribuição fisiológica da D2 é regular os níveis intracelulares de T_3 nos tecidos onde a deficiência deste hormônio seria mais crítica. Em tecidos que expressam D2, como o sistema nervoso central, o tecido adiposo marrom e a adenohipófise, a atividade desta enzima está aumentada durante o hipotireoidismo e quando há deficiência grave de iodo. Isso leva a um aumento da conversão local de T_4 para T_3 o que pode ser visto como um mecanismo adaptativo destes tecidos em resposta à queda dos níveis circulantes dos hormônios tireóideos (Bianco AC e cols., 2002).

Iodotironina Desiodase Tipo 3 (D3)

A principal via de inativação do T_3 é através da atividade desiodase tipo 3, que remove o átomo de iodo do anel tirosílico da iodotironina. Essa enzima protege os tecidos do excesso de hormônios tireóideos (Bianco AC e cols., 2002).

Sua localização subcelular não está bem definida, mas parece estar associada à fração microssomal. A D3 é insensível à inibição pelo propiltiuracil (PTU) (Bianco AC e cols., 2002).

A atividade da D3 no Sistema Nervoso Central (SNC) aumenta no hipertireoidismo e diminui no hipotireoidismo, com níveis indetectáveis de RNAm para D3 no cérebro de indivíduos hipotireóides (Bianco AC e cols., 2002)

A expressão da D3, em mamíferos, está relacionada ao desenvolvimento, sendo a enzima bastante expressa durante as fases críticas do desenvolvimento do SNC, quando possivelmente teria papel protetor contra danos relacionados à exposição precoce excessiva aos hormônios tireóides (Bianco AC e cols.,2002). No mamífero adulto, a isoforma D3 tem distribuição bastante limitada, estando presente somente em placenta, pele e sistema nervoso central (Croteau W e cols.,1996).

3. Síndrome do T₃ baixo ou Síndrome do Eutireoidiano Doente na Insuficiência Cardíaca Congestiva

Em algumas circunstâncias clínicas (má nutrição, infecção insuficiência hepática ou renal, doença sistêmica, infecção com vírus da imunodeficiência (HIV), trauma e pós-operatório), ocorre redução da concentração sérica da triiodotironina (T₃), aumento da concentração do T₃ reverso (rT₃), com concentração normal do hormônio estimulante da tireóide (TSH), sem evidências clínicas de hipotireoidismo (Chopra IJ, 1982; Chopra IJ e cols.,1983, Panamonta O e cols., 2004). Foi demonstrado também que essa síndrome ocorre com freqüência em pacientes idosos e hospitalizados e está correlacionado a prognóstico pior para esses pacientes (Bossoni S, e cols., 2002).

Existem várias hipóteses para explicar a concentração reduzida de T₃ em pacientes severamente doentes. A primeira hipótese seria que o “stress” de uma doença severa, através de um relativo

hipercortisolismo ou por meio da liberação de fatores como as citocinas e fatores de necrose tumoral levaria à inibição da função do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide, o que levaria a diminuição do TRH e de TSH e conseqüentemente à diminuição da produção do T₄. Uma terceira hipótese seria que a síndrome resulta da diminuição da conversão periférica da tiroxina (T₄) para T₃ devido à redução da enzima 5' deiodinase no fígado (Wartofsky & Burman, 1982, Beigneux AP. e col., 2003, Utiger RD, 1980, Stathatos N & Wattofsky L , 2003).

Além das patologias citadas acima, algumas situações cardiovasculares estão associadas com a síndrome do T₃ baixo: “Bypass” Cardiopulmonar, Transplante Cardíaco, Insuficiência Cardíaca Congestiva, Infarto do Miocárdio e Terapêutica com Amiodarona (Hamilton MA & Stevenson LW.,1996, Friberg L e cols. 2001, Shanoudy HMD e cols. 2001).

Sabe-se que o hormônio tireoidiano (HT) aumenta a frequência cardíaca, contratilidade e consumo de nutrientes e oxigênio, semelhante aos efeitos catecolaminérgicos (Friberg L e cols., 2001). Por outro lado, o HT diminui a resistência vascular periférica e melhora o relaxamento diastólico o que provoca o uso mais eficiente de energia e nutrientes. Apesar de Utiger (1980) considerar a síndrome do T₃ baixo como uma resposta adaptativa de preservar energia e manter a integridade celular durante a doença grave, a literatura ainda considera duvidoso se a síndrome do T₃ reverso constitui uma resposta metabólica para conservar energia ou se a sua presença agrava a condição do paciente (Degens H, e cols., 2003, Stathatos N & Wattofsky L , 2003).

Friberg e cols. (2001) demonstraram que níveis mais elevados de T₃ reverso estavam associados com maior taxa de mortalidade em pacientes que sofreram infarto agudo de miocárdio independente dos fatores de risco: idade, infarto do miocárdio prévio,

angina, insuficiência cardíaca e concentração sérica de creatina.

Foi demonstrado na insuficiência cardíaca que a expressão dos receptores para o hormônio tireoidiano estaria diminuída (Sylvén C. e cols., 1996). Por outro lado, Shaharara S. e cols., (1999) verificaram que o RNAm do TR β 1 está aumentado aproximadamente três vezes e o β 2 está aumentado aproximadamente oito vezes no coração de cachorros com falência cardíaca em relação à concentração desses receptores no coração de cachorros normais. Da mesma forma, D'Amati G e cols. (2001) demonstraram que a expressão das isoformas α 1, α 2 e β 1 do TR estão significativamente aumentados no coração de indivíduos em estágio final da ICC em relação à expressão no coração de indivíduos normais. Entretanto, nenhuma da atividade funcional do receptor foi investigada nesses trabalhos acima mencionados.

O hipotireoidismo induz no miocárdio de roedores uma programação gênica fetal em um padrão semelhante à hipertrofia ou insuficiência cardíaca. Essas observações sugerem que a insuficiência pode refletir no coração como um estado de hipotireoidismo (Kinugawa K e cols., 2001). Portanto, o coração de animais portadores de insuficiência cardíaca expressam genes como quando em estado hipotireóideo mostrando α miosina diminuída e aumento da β miosina, fosfolanbam e fator natriurético (Kinugawa K e cols, 2001; Danzi S. e Klein I., 2002). O tratamento com hormônio tireoidiano aumenta a expressão do RNAm da proteína α miosina (Chang KC, e cols., 1997 e Ojamaa K, e cols., 2000).

Vários pesquisadores têm demonstrado o aumento do rT₃ e diminuição do T₃ com pior prognóstico dos pacientes com insuficiência cardíaca grau III e IV (Hamilton M. e cols. 1990; Klemperer JD e cols.,1996; Morkin E. e cols.,1993), e esses pacientes apresentaram melhora clínica da insuficiência com o tratamento hormonal (Morkin e cols. 1993, Klemperer JD e cols. 1996, Chang KC, e cols., 1997, Klein I &

Hong C., 1986, Moruzzi P, e cols., 1996, Ojamaa K, e cols., 2000, Degens H., e cols., 2002).

Como o desenvolvimento de análogos do hormônio tireoideano, tratamentos alternativos têm sido propostos e um tratamento avaliado foi com o 3'5 – diiodotiropropiona (DTTPA) que tem uma ação inotrópica seletiva com baixa atividade metabólica preconizado para animais com melhora da insuficiência cardíaca (Danzi S., e Klein I., 2002).

Outras estratégias terapêuticas têm sido propostas, mas ainda não estudadas, como o GC1, um agonista do receptor β (Trost SU, e cols., 2000), empregado, portanto, com uma ação preferencial no fígado (onde predomina o TR β) e menor no coração (onde predomina o TR α).

Não existem ainda na literatura trabalhos que demonstrem qual a quantidade de hormônios Tireoideanos adequada para tratar a insuficiência Cardíaca e o melhor tempo de tratamento. Além disso, a literatura discute se o tratamento seria benéfico ou maléfico para esses pacientes (Degens H, e cols., 2003, Stathatos N & Wattofsky L , 2003).

Para responder a essas questões, torna-se importante, portanto, definirmos um modelo experimental que permitirá estudar a Síndrome do T₃ baixo na Insuficiência Cardíaca, visto que os estudos realizados até o momento foram feitos em coração retirado de indivíduos portadores de insuficiência cardíaca (Sylven C. e cols. 1996 e D'Amati G. e cols. 2001) ou de cachorros portadores dessa patologia (Shahrara S. e cols. 1999).

Objetivo

- Estabelecer uma metodologia adequada para estudar a síndrome do T₃ baixo em ratos portadores de insuficiência cardíaca e estudar a expressão dos receptores tireoideanos no músculo cardíaco desses ratos.

Métodos

A. Para provocar insuficiência cardíaca em ratos, através do método de estenose aórtica foi realizado o seguinte experimento:

1. Preparo dos animais

Neste estudo, foram utilizados ratos Wistar machos obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Depois da indução da anestesia com methohexital sódico (Brevital), foi realizada estenose aórtica nos ratos, por meio da colocação de um clipe de aço inoxidável de 0,6 mm de diâmetro interno na aorta ascendente via uma incisão torácica (Schunkerl e cols., 1990; Weinberg e cols. 1994; Schunkert e cols. 1993 e Feldman e cols., 1993). Animais controles, pareados quanto à idade, foram submetidos à toracotomia esquerda sem a colocação do clipe. Todos os ratos foram subseqüentemente alimentados com ração padrão para ratos (Purina) e água *ad libitum*. Cada animal foi inspecionado diariamente a fim de se detectar a presença de taquipnéia. Quando os ratos apresentaram este sintoma, considerou-se que estavam em insuficiência cardíaca e, portanto, em condições de serem estudados. Os animais experimentais e os controles foram sacrificados 21 semanas depois da cirurgia. Os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico intraperitoneal (60 mg/kg), sendo o peso corpóreo anotado, e o tórax rapidamente aberto. Dentro de 20 segundos, o coração foi removido e preservado para posterior análise de RNAm conforme protocolo experimental. No momento do sacrifício, procurou-se identificar sinais indicadores de insuficiência cardíaca, de acordo com os achados prévios de Conrad CH e cols., 1991, derrame pleuro-pericárdico, trombo no átrio esquerdo, aumento do volume de

átrios, hipertrofia de ventricular direito e esquerdo, ascite e hepatomegalia. Os animais que apresentavam esses sinais anatômicos foram classificados como portadores de ICC e os que não apresentaram foram classificados como portadores de estenose aórtica (EAo).

Os seguintes parâmetros físicos dos ratos foram estudados: peso do ventrículo esquerdo em relação ao peso corpóreo (VE/PC), peso do ventrículo direito em relação ao peso corpóreo (VD/PC), peso do átrio em relação ao peso corpóreo (A/PC), peso úmido do fígado em relação ao seu peso seco (U/S) e o U/S do pulmão.

B. Para diagnosticar a Síndrome do T₃ baixo nos animais com insuficiência cardíaca foi realizado o experimento “in vitro” que mostra a conversão periférica de T₄ para T₃ ou rT₃ em fígado e rins:

Análise Laboratorial

A dosagem hormonal do T₃ e do rT₃ foi realizada no soro dos animais controles, dos portadores de EAo e dos portadores de ICC através dos Kits comerciais, por quimioluminescência (DPC MedLab). Foram realizados experimentos para verificar a conversão hepática e renal de T₄ a T₃ e rT₃ “in vitro” (Nunes, M.T. & Bianco, A.C.,1986), para estes experimentos, o fígado e os rins dos ratos foram retirados imediatamente após o sacrifício dos animais, e lavados em tampão fosfato 0,15 M gelado (4^o C), pH 7,35. A seguir, foram secos, pesados e homogeneizados em 2 volumes do mesmo tampão. O homogenato foi filtrado em 4 camadas de gaze e congelados a -10^o C até serem processados. Estes homogenatos representam 0,33g equivalente de tecido por mL de solução.

Por ocasião do processamento, adicionou-se em tubo de

vidro de 10x75 mm:

- a- 400 μ L de homogenato, que representa aproximadamente 0,13 g de tecido
- b- 100 μ L de solução contendo 50 μ g de T_4 /mL
- c- 500 μ L de tampão fosfato 0,15 M, pH 7,35.

O tubo foi agitado no “vortex”, e incubado por 120 minutos a 37^o C. Após esse período, a reação foi interrompida adicionando-se volumes de etanol a 95%.

O processamento do padrão foi realizado de maneira idêntica à descrita, exceto que a adição do homogenato ocorreu ao término da incubação, imediatamente antes da adição do etanol.

O T_3 contido nesses tubos representa:

- a- O T_3 contido no homogenato
- b- O T_3 contido na solução de T_4 utilizada
- c- O T_3 gerado espontaneamente durante o período de incubação

A concentração total do T_3 do padrão foi subtraída da concentração de T_3 das amostras.

A dosagem do T_3 e do rT_3 foi realizada como descrito acima.

C. Para analisar a expressão do TGF β 1 para validar a presença de hipertrofia do miocárdio e verificar a expressão do receptor de T₃ no músculo cardíaco (Northern-Blotting) realizou-se os seguintes experimentos:

Isolamento de RNA total (Maniatis e cols.,1989)

Ao tecido de músculo cardíaco previamente homogeneizado em Polytron acrescentou-se uma solução de denaturante D (iso-tiocianato de guanidina 4 M, citrato de sódio 25 mM pH 7,0 sarcosyl 0,5%, B-mercaptoetanol 0,1 M). Acrescentou-se acetato de sódio 2 M pH 4,0, fenol saturado com Tris-HCl 0,01 M pH 5,0 - 6,0 e clorofórmio isoamílico (49:1). A cada acréscimo de solução, o tubo foi agitado por inversão. A suspensão final foi agitada vigorosamente por 10 segundos e deixada em banho de gelo por 15 minutos. Após este tempo, o tubo foi centrifugado por 20 minutos a 10.000 rpm a 4^oC, em uma centrífuga refrigerada Sorvall RC2-B, rotor SS-34.

O RNA presente na fase aquosa foi transferido para um novo tubo, precipitado com 2 mL de álcool iso-propílico e deixado por 1 hora a -20 ^oC.

A seguir, o tubo foi centrifugado por 20 minutos a 10.000 rpm a 4^o C, o RNA precipitado foi dissolvido em 300 μ L de solução D e transferido para um tubo cônico de plástico "Eppendorf" Brinkmann. Acrescentou-se 1 volume de álcool iso-propílico e o material permaneceu por uma noite a -20 ^oC.

O tubo foi centrifugado por 20 minutos a 10.000 rpm a 4^oC

e o precipitado obtido foi lavado com etanol 75% e sedimentado novamente por 20 minutos a 10.000 rpm a 4 °C.

O precipitado foi seco o suficiente para eliminar o resíduo de etanol e ressuspenso em 50 µL de H₂O MilliQ autoclavada.

A concentração de RNA foi determinada por leitura espectrofotométrica a 260 nm. Esta leitura nos permitiu o cálculo da concentração de ácido nucléico da amostra. Uma unidade de densidade óptica (D.O.) corresponde a aproximadamente 40 µg/mL de RNA de fita simples e a relação entre as leituras a 260 e 280 nm (D.O. 260/D.O. 280) permite estimar a pureza do ácido nucléico. Esta relação, para uma preparação pura de RNA deverá ser maior que 1,8.

Gel analítico de agarose para RNA

0,25 mg de agarose foram dissolvidos por aquecimento em 25 mL de tampão fosfato 10 mM pH 7,0, resfriados a 50 °C e despejados sobre uma cuba de eletroforese (5,0 cm x 7,7 cm). A espessura do gel foi de aproximadamente 5 mm. A preparação permaneceu à temperatura ambiente por 45 minutos.

Durante este intervalo, a amostra foi preparada. Uma concentração de 3 µg de RNA total foi ajustada para 5 µL em H₂O MilliQ. Acrescentaram-se 10µL de tampão da amostra (750 µL de formamida deionizada, 150 µL de tampão MOPS 10 x 240 µl de formaldeído, 100 µL de H₂O MilliQ, 100 µL de glicerol, 80 de µL azul de bromofenol (10 % peso/volume)) e se aqueceu a 65 °C por 15 minutos. A seguir, foi colocado 1 µL de brometo de etídio 1,0 mg/mL e o material agitado.

Antes da aplicação da amostra, o pente foi retirado e o poço formado lavado com o tampão MOPS. A eletroforese foi realizada a 30 mA constantes, com agitação do tampão à temperatura ambiente por 4 a 5 horas.

Em seguida à eletroforese, o RNA foi visualizado diretamente sobre o *UV/White Darkroom –UVP Laboratory Products*, no comprimento de onda de 254 nm e fotografado.

O corante brometo de etídeo, presente na amostra, permitiu a fluorescência do RNA no momento da exposição do gel à radiação ultravioleta.

Foi usado como padrão de comparação de peso molecular o DNA digerido com a enzima de restrição Hind III.

A eletroforese foi realizada na corrente constante de 40 mA por aproximadamente 45 minutos, sob agitação do tampão fosfato 10 mM pH 7,0, para manutenção do pH.

O gel foi colocado sobre o *UV/White Darkroom –UVP Laboratory Products* permitindo que o RNA fosse visualizado e fotografado, com filme de revelação instantânea 677 da Polaroid. O DNA digerido com a enzima de restrição Hind III foi usado como padrão de comparação de peso molecular.

Tratamento do RNA com DNase

Feita a análise do RNA no gel analítico, a preparação contendo DNA foi tratada com 1,0 µL de DNase 0,1 mg/mL para cada 10

µg de RNA, na presença de MgCl₂ 10 mM e a incubação foi feita por 15 minutos. A seguir, o RNA foi precipitado com 2,5 volumes de etanol absoluto gelado.

A preparação purificada de RNA foi usada para Northern-Blot.

Northern- blotting

Eletroforese em gel de agarose

Um grama de agarose foi dissolvido por aquecimento em 97 mL de tampão MOPS [ácido 3-(N-morpholino)propanesulfônico] 0,02 M; acetato de sódio 0,005 M; EDTA 0,001 M pH 7,0 e resfriado a 50 °C. Acrescentaram-se 5,1 ml de formaldeído 37% e agitou-se levemente. Esta solução foi despejada em um sistema de eletroforese horizontal sub-marina. Esta preparação permaneceu à temperatura ambiente por 1 hora.

Durante este intervalo, a amostra foi preparada. Uma concentração de 20 µg de RNA total foi ajustada para 10µL em H₂O MilliQ. Acrescentaram-se 25 µL de tampão da amostra (750 µL de formamida deionizada, 150 µL de tampão MOPS 10 x 240 µl de formaldeído, 100 µL de H₂O MilliQ, 100 µL de glicerol, 80 de µL azul de bromofenol (10 % peso/volume)) e se aqueceu a 65 °C por 15 minutos. A seguir, foi colocado 1 µL de brometo de etídio 1,0 mg/mL e o material agitado.

Antes da aplicação da amostra, o pente foi retirado e o poço formado lavado com o tampão MOPS. A eletroforese foi realizada a 30 mA constantes, com agitação do tampão à temperatura ambiente por 4

a 5 horas.

Em seguida à eletroforese, o RNA foi visualizado diretamente sobre o *UV/White Darkroom –UVP Laboratory Products*, no comprimento de onda de 254 nm e fotografado.

O corante brometo de etídeo, presente na amostra, permitiu a fluorescência do RNA no momento da exposição do gel à radiação ultravioleta.

Foi usado como padrão de comparação de peso molecular o DNA digerido com a enzima de restrição Hind III.

Transferência de Northern-Blotting

O gel foi lavado em H₂O MilliQ autoclavada por 15 minutos em agitação leve e posteriormente lavado em solução SSC 2X por 15 minutos e repetida essa última lavagem

A membrana (*Hybond N- Amersham Pharmacia Biotech*) após ser cortada no tamanho exato ao gel foi lavada em H₂O MilliQ autoclavada por 15 minutos em agitação leve e em seguida lavada em solução SSC 5X por pelo menos 15 minutos e deixada nessa solução até o uso para a transferência.

Montado o equipamento de transferência (Genopirator Pump AE 6680P – ATTO) foi iniciada a transferência com a seguinte sequência: 15 minutos com solução SSC 5X trocado a solução por mais 15 minutos com a mesma concentração da solução SSC. Foi feita mais duas trocas com solução SSC 2X por 15 minutos cada. Após a transferência o gel foi descartado e membrana lavada em solução SSC

2X rapidamente e posteriormente deixado em temperatura ambiente para a secagem até o dia seguinte. Após a secagem o RNA foi fixado em radiação ultravioleta (luz UV) por 3 minutos cada lado e feita a marcação das bandas 18 e 28 S e iniciou-se o protocolo de marcação da sonda.

Marcação da sonda

Aproximadamente 10 ng da sonda cDNA para receptor o hormônio tireoidiano α e o 18S foram marcadas com ^{32}P dCTP utilizando-se kit RADPRIME (AMERSHAM).

Hidridização

As membranas de Northern-Blot foram colocadas em garrafas específica do equipamento de hibridização (*HB-1000 Hybridizer – UVP Laboratoty Produits*) em solução de pré-hibridização (6x SSC, 10 x Denhardt's, 1% SDS, 100 (g/mL de DNA de esperma de salmão denaturado e H₂O MilliQ) em um volume suficiente para manter a membrana mergulhada. Esta preparação permaneceu uma noite em banho a 42 °C

A solução de pré-hibridização foi substituída pela solução de hibridização (6 x SSC, 1% SDS, 100 µg/mL de esperma de salmão denaturado em 50% de formamida por 5 minutos, 5% dextran sulfato e H₂O). A seguir, foi adicionada a sonda radioativa e deixada em banho a 42 °C, por 20 a 24 horas.

Após este tempo, a membrana foi retirada da garrafa e processada sob agitação conforme o protocolo:

1. Duas lavagens seguidas de 10 minutos cada uma, com solução 2 x SSC + 0,1% SDS, à temperatura ambiente.
2. Uma lavagem de 10 minutos com solução 0,1 x SSC + 0,1% SDS;
3. Duas lavagens seguidas de 30 minutos com solução 0,1 x SSC + 0,1% a 50⁰C.
4. Duas lavagens seguidas de 15 minutos com solução 0,1 x SSC à temperatura ambiente.

Após as etapas de lavagem, as membranas foram fixadas em suporte e submetidas a um auto-radiograma, usando-se chassis, um par de intensificadores de imagem e filme Kodak X-OMAT, AR, Sigma.

O chassis foi deixado por um período pré-determinado de aproximadamente 10 dias em “freezer” à temperatura de -70 ⁰C.

O filme foi revelado e analisado através de densitometria das bandas obtidas.

Recuperação da membrana

Para o sucesso na remoção da sonda, não se deixou a membrana secar após a hibridização e a lavagem.

Após hibridização, a membrana foi mergulhada em solução de SDS 0,1% a 96 ⁰C e deixada em repouso até atingir a temperatura ambiente.

O excesso de líquido foi escorrido e a membrana colocada dentro de um saco plástico; adicionou-se em seguida a solução de pré-hibridização. O saco plástico foi lacrado e deixado por uma noite em banho a 42 °C até o momento do uso.

RT-PCR para o TGFβ₁ (Transcriptase Reversa)

◆ TGFβ₁:

O TGFβ₁ foi expresso através do RT-PCR (Kit Gene Specific Relative – Ambion) semiquantitativo. Fizemos o cDNA a partir do RNA total dos ratos controle, estenose aórtica(EAO) e insuficiência cardíaca congênita (ICC) com 2,5µg de RNA total amplificados em 10 mM de dNTPs, 50 µM de random primers em um total de 16 µL completados com água MilliQ autoclavada. A reação foi minifugada e aquecida por 3 minutos a 85°C. Posteriormente, acrescentou-se a esta reação tampão de PCR (100mM tris-Cl pH 8,3; 500mM KCl, 15mM MgCl₂) e 100 U de transcriptase reversa (M-MuLV RT – Gibco). A reação foi novamente minifugada e incubada a 42°C por uma hora. Com o cDNA (DNA complementar) obtido na reação anterior realizamos o PCR para o gene do TGFβ₁. A 1µL de cDNA acrescentaram-se 5µL de tampão de PCR (100mM tris-Cl pH8,3; 500mM KCl, 15mM MgCl₂) e mais 4µL de dNTPs (10mM), 5µL de Taq DNA polimerase e 4µL dos “primers” para o TGFβ₁ (5µM de cada) e completou-se a reação com água MilliQ autoclavada para 55µL. A reação foi minifugada e colocada no termociclador: 30 segundos a 94°C, 42°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos; esses ciclos foram repetidos por 33 vezes. Do 15º ciclo até o 33º retirou-se um tubo em tempos sucessivos para escolha do melhor ciclo de reação. Feito gel de agarose a 0,1%, e para normalização com o 18S (Kit Gene Specific Relative – Ambion) colocou-se 1µL da reação

anterior (PCR- TGF β_1) e acrescentaram-se 5 μ L de tampão de PCR, 4 μ L de dNTPs (10mM), 0,27 μ L de Taq DNA polimerase e completou-se água MilliQ autoclavada para 35 μ L. A esse coquetel foi acrescentaram-se 4 μ L do gen específico do TGF β_1 e 4 μ L de 18S, minifugado e colocado na termociclador (Mastercycle Gradiente - Eppendorf) utilizando o mesmo programa anteriormente descrito para o TGF β_1 . Posteriormente foi feito gel de 0,1% de agarose e feita análise densitométrica dos resultados do PCR para TGF β_1 e o normalizado com 18S.

Análise Estatística

Todos os dados foram expressos em média aritmética e desvio padrão, juntamente com o número total de experimentos.

Para as variáveis peso, ventrículo esquerdo/ peso corpóreo (VE/PC), fígado peso úmido/seco (U/S) e pulmão (U/S) e dosagens hormonais utilizou-se na comparação dos grupos a análise de variância seguida do método de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls.

Para as variáveis ventrículo direito/peso corpóreo (VD/PC) e átrio/peso corpóreo (A/PC), que não tinham distribuição normal e não apresentavam homogeneidade de variâncias, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do método de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls.

O nível de significância utilizado foi de 5%.

Resultados

Foi realizada estenose aórtica em 35 ratos, tendo sido excluídos 2 por apresentarem sinais de infecção e 7 não sobreviveram a 21 semanas. Desses 26 ratos, 7 desenvolveram insuficiência cardíaca congestiva (ICC) e 9 não apresentaram a doença, apresentando apenas hipertrofia cardíaca (EAo). Para o controle, 9 animais pareados quanto à idade foram submetidos à abertura do tórax à esquerda sem a colocação do clipe na aorta e foram sacrificados após 21 dias, sendo os mesmos parâmetros clínicos de insuficiência cardíaca avaliados.

Como descrito em materiais e métodos, os parâmetros clínicos foram avaliados diariamente e todos os 16 ratos, que foram submetidos a estenose aórtica, apresentaram taquipnéia após as 21 semanas. Apenas 3 apresentaram o parâmetro de pelo arrepiado e um apresentou edema (Tab 1).

Os dados anátomo-patológicos observados no momento do sacrifício foram: presença de trombo em átrio esquerdo em 5, aumento de volume de átrios em 7, hipertrofia de ventrículo direito em 5 e hipertrofia do ventrículo esquerdo em 10, derrame pleural em 7, ascite em 3 e hepatomegalia em 5 (Tab 1).

Tabela 1. Parâmetros clínicos observados durante o sacrifício.

Ratos	Estado	Peso	Taquipneia	Pelos arrepiados	Edema	Derrame Pleural	Ascite	Hepato-megalia	Trombo AE	Aumento Átrios	Hipertrofia VD	Hipertrofia VE
24	CONT	518	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	CONT	461	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	CONT	566	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	CONT	603	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	CONT	588	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	CONT	528	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	CONT	575	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	CONT	630	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
01	EAo	462	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+
03	EAo	432	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
06	EAo	473	++	-	-	-	-	-	-	+	+	+
13	EAo	556	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
17	EAo	502	++	-	-	-	-	-	-	+	-	+
22	EAo	542	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	EAo	557	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	EAo	553	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	EAo	529	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
42	EAo	498	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	ICC	522	+++	+	-	+	+	+	-	+	+	+
18	ICC 4	566	++++	+	++++	++	++	++	++	+	+	+
37	ICC	484	+++	-	-	++	-	-	++	+	-	++
39	ICC	487	++/++++	-	-	+++	-	-	+	++++	++	+++
40	ICC	364	++/++++	+	-	++++	+	+	++	++++	-	-
41	ICC	335	++	-	-	+	-	-	-	-	++	++
44	ICC	401	++++	-	-	+	-	++	++	+++	+++	+++

A tabela resume os principais parâmetros clínicos observados durante a cirurgia de cada animal e a classificação em portador de Insuficiência Cardíaca Congestiva (ICC) e Estenose Aórtica (EAo). As observações foram feitas pelo mesmo pesquisador e os parâmetros foram classificados em cruzes (+ a ++++), conforme o grau observado. O símbolo – representa ausência de sinal. AE: átrio esquerdo; VD: ventrículo direito; VE: ventrículo esquerdo.

Os ratos também foram avaliados com medidas objetivas das câmaras cardíacas e esses parâmetros corporais encontram-se na Tab 2.

Tabela 2. Parâmetros corporais dos ratos estudados.

	Controles n=9	EAO n=9	ICC n=7
PC (g)	560 (b) ± 52	505 (ab) ± 46	451 (a) ± 85
VE/PC (mg/g)	1,84 (a) ± 0,34	2,73 (b) ± 0,13	3,46 (c) ± 0,99
VD/PC (mg/g)	0,49 (a) ± 0,05	0,54 (a) ± 0,05	1,08 (b) ± 0,23
A/PC (mg/g)	0,21 (a) ± 0,03	0,35 (ab) ± 0,04	0,94 (b) ± 0,25
Fígado (U/S)	3,2 (a) ± 0,02	3,2 (a) ± 0,09	3,43 (b) ± 0,03
Pulmão (U/S)	4,7 (a) ± 0,12	4,87 (a) ± 0,52	5,55 (a) ± 0,02

Valores expressos em média e desvio padrão

A análise estatística foi verificada para cada parâmetro comparando os ratos controle em relação aos ratos com EAO e em relação aos ratos com ICC. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) e médias seguidas de letra diferente diferem estatisticamente ($p < 0,05$). PC (peso corporal), VE/PC (peso do ventrículo esquerdo em relação ao peso corporal), VD/PC (peso do ventrículo direito em relação ao peso corporal), A/PC (peso do átrio em relação ao peso corporal), U/S (peso úmido em relação ao peso seco).

Em relação ao peso corporal em gramas, podemos observar que os ratos com ICC apresentam peso estatisticamente menor em comparação aos ratos com EAO e ratos normais, mostrando a perda de peso dos ratos com ICC. No que se refere ao peso do ventrículo esquerdo em mg, em relação ao peso do rato, observamos que foi estatisticamente maior nos ratos com EAO e com ICC em relação aos ratos controles, o que comprova a hipertrofia cardíaca dos ratos com EAO e com ICC. Nos ratos com EAO, este foi o único parâmetro estatisticamente diferente dos controles e como clinicamente esses ratos não apresentavam taquipnéia, ascite e derrame pleural, eles foram classificados como portadores de estenose aórtica com hipertrofia cardíaca, mas sem ICC. Quanto ao peso do ventrículo direito em mg, em relação ao peso do rato em gramas e ao peso dos átrios em mg, em

relação ao peso do rato em gramas, os dois parâmetros foram estatisticamente maiores nos ratos com ICC em relação aos ratos com EAo e em relação aos ratos controles. Analisamos também o peso úmido do fígado em relação ao seu peso seco e encontramos um valor estatisticamente maior nos ratos com ICC em relação aos ratos com EAo e em relação aos ratos controles, o que mostra a congestão hepática dos ratos com ICC. Quanto ao peso úmido do pulmão em relação ao seu peso seco, verificamos que não houve diferença estatística entre os ratos controles, EAo e ICC.

Dosagem Hormonal

Com o intuito de verificar a síndrome do T_3 reverso nos ratos portadores de insuficiência cardíaca, realizamos o experimento de deiodinação hepática e renal.

O T_3 Reverso foi obtido da deiodinação hepática e renal de T_4 para rT_3 . Como podemos observar na tabela 3, os ratos com ICC apresentaram a concentração de T_3 reverso e T_3 estatisticamente maior e menor, respectivamente, em relação aos controles operados com 21 semanas e com EAo.

Tabela 3. T₃ e T₃ reverso obtido da conversão hepática e renal de T₄.

		Hepática	Renal
T ₃ Reverso	Controle 21 semanas	0,59 (a) ± 0,10	0,44 (a) ± 0,01
	Eao	0,50 (a) ± 0,03	0,49 (a) ± 0,02
	ICC	0,84 (b) ± 0,39	0,81 (b) ± 0,26
T ₃	Controle 21 semanas	85,0 (a) ± 2,18	89,5 (a) ± 25,4
	Eao	76,2 (a) ± 7,4	90,8 (a) ± 18,7
	ICC	41,0 (b) ± 7,9	29,4 (b) ± 6,5

Valores expressos em média ± desvio padrão do T₃ e T₃ reverso gerado no homogenato hepático e renal a partir de 50 µg de T₄ por mL e expressos em µg T₄/g equivalente/hora. Concentração normal de 0,36 a 0,70 µg T₄/equivalente/hora. Para a análise estatística, foi realizada a análise de variância seguida do teste de comparações múltiplas Student Newman-Keuls. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) e médias seguidas de letra diferente diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Isolamos o RNA do átrio, ventricular direito, e ventrículo esquerdo dos ratos controles com estenose aórtica e dos ratos com ICC e que apresentavam a síndrome do T₃ baixo (Fig. 2).

Isolamento do RNA

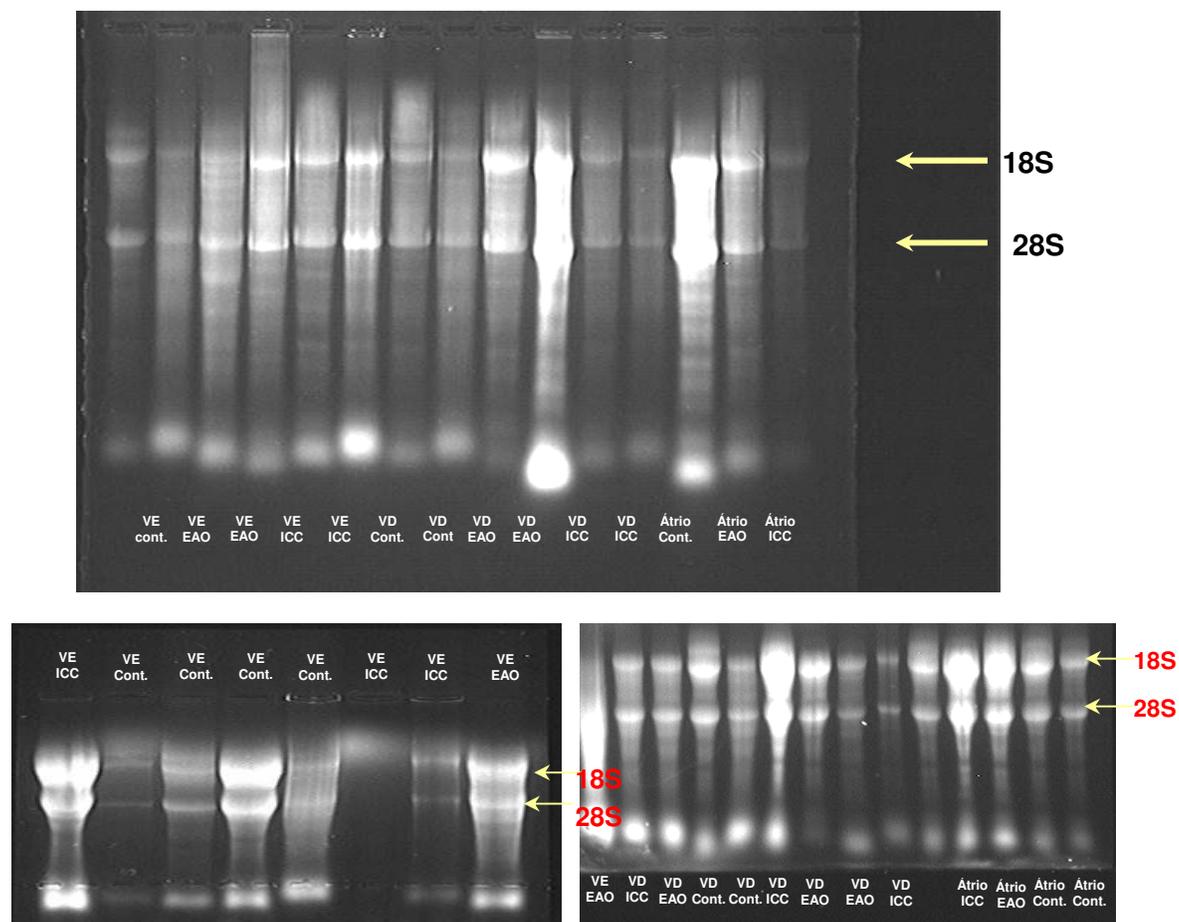


Figura 2. Gel de agarose a 1%, mostrando a integridade do RNA. O RNA total foi isolado do músculo cardíaco de ratos controle (CONT), dos animais submetidos à estenose aórtica que desenvolveram a insuficiência cardíaca congestiva (ICC), e dos ratos que não desenvolveram a insuficiência cardíaca congestiva sendo classificados com estenose aórtica (EAo). O RNA foi isolado pela técnica fenol-clorofórmio descrita anteriormente, e mostra a integridade do material não tendo degradação ou contaminação de DNA.

VD: Ventrículo Direito; VE: Ventrículo Esquerdo; ICC: Insuficiência Cardíaca Congestiva; EAo: Estenose Aórtica

Northern-Blotting – TR α 1

Com o RNA total obtido do músculo cardíaco dos animais controles, dos animais submetidos à estenose aórtica que desenvolveram e que não desenvolveram ICC (Fig. 2), realizamos o northern-blotting para o TR α 1 em duas membranas diferentes e normalizamos os resultados hibridando essas membranas com o 18 S. A Figura 3 mostra a análise densitométrica do TR α 1. Observamos que os ratos com ICC apresentaram uma expressão significativamente mais elevada de TR α 1 no VE, em comparação aos ratos controles e com EAo. A expressão do TR α 1 foi 1,5 vezes maior nos ratos com ICC em relação aos controles e 2,5 vezes maior em relação aos ratos com EAo e a expressão do TR α 1 foi estatisticamente significativa em relação ao controle e à EAo.

Análise densitométrica do TR α_1 normalizado com 18S

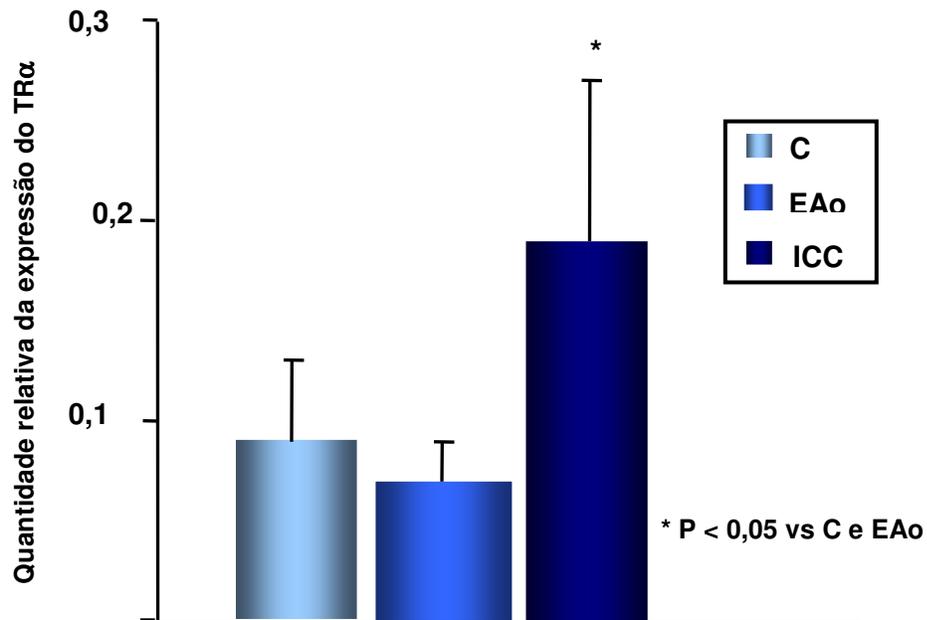


Figura 3. Gráfico da média do conteúdo relativo \pm SD do RNAm do TR α_1 medidos em 2 experimentos separados, com 3 amostras diferentes para cada grupo em cada experimento. Controle (C), Estenose Aórtica (EAo) e Insuficiência Cardíaca Congestiva (ICC). O RNA total foi isolado do Ventrículo Esquerdo (VE) e hibridado com sonda do TR α_1 . Os auto-radiogramas foram analisados densitometricamente e o resultado foi normalizado com controle interno (18S).

* $p < 0,005$ vs. C e EAo.

Nosso próximo passo foi realizar um RT-PCR para o TGF β_1 específico para ratos (Kit Gene Specific Relative - Ambion). A análise densitométrica (fig. 4) mostrou que a expressão do TGF β_1 está aumentada significativamente no VE de ratos com estenose aórtica e com insuficiência cardíaca congestiva em relação ao VE dos ratos controles.

Análise densitométrica do PCR para o TGF β_1

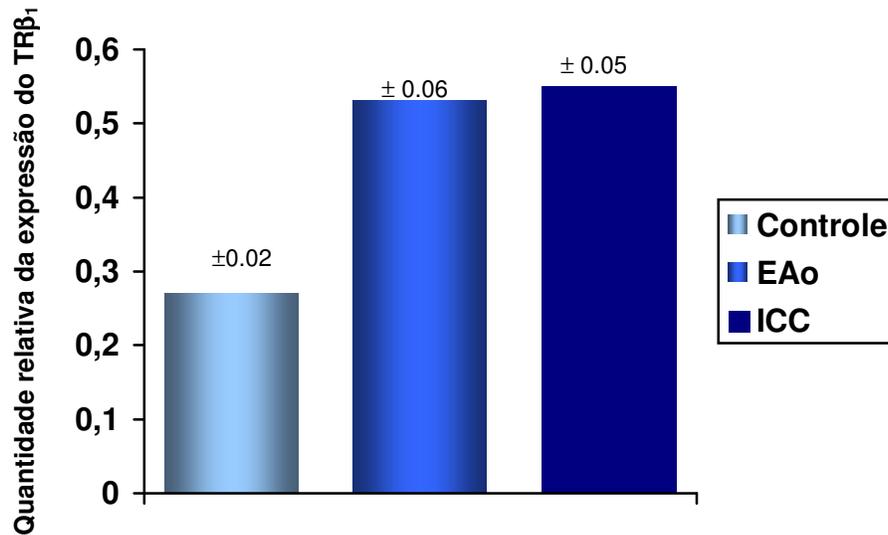


Figura 4. Gráfico do conteúdo relativo \pm SD do RNAm do TGF β_1 medidos em 3 experimentos separados, foram utilizadas 2 amostras de cada grupo para cada experimento. Controle (C), Estenose Aórtica (EAo) e Insuficiência Cardíaca Congestiva (ICC). O RNA total foi extraído do Ventrículo Esquerdo (VE) e submetido ao RT-PCR semiquantitativo para determinar a quantidade de RNAm do TGF β_1 e o resultado foi normalizado pelo controle interno (18S).

* $p < 0,005$ vs. C.

Discussão

Através da estenose aórtica realizada pela clipagem da artéria aorta, conseguimos provocar Insuficiência Cardíaca em ratos de laboratório, como mostramos na Tabela 1. O peso do ventrículo esquerdo em mg em relação ao peso dos ratos, foi estatisticamente maior nos ratos com EAo e com ICC em relação aos ratos-controles (tab 2), o que comprova a hipertrofia cardíaca dos ratos com EAo e com ICC. Como os ratos com EAo não apresentavam sinais clínicos de ICC, separamos, portanto, os ratos portadores apenas de hipertrofia do ventrículo esquerdo, mas sem ICC dos ratos com ICC. Esses ratos foram denominados de portadores de estenose aórtica (EAo) (tab 2). Paralelamente, os ratos com ICC apresentaram o peso do ventrículo direito em mg em relação ao peso dos ratos em gramas e o peso dos átrios em mg em relação ao peso dos ratos em gramas estatisticamente maiores, quando comparados aos ratos com EAo e aos ratos controles (tab 2). Analisamos também o peso úmido do fígado em relação ao seu peso seco e encontramos um valor estatisticamente maior nos ratos com ICC em relação aos ratos com EAo e em relação aos ratos controles (tab 2), o que mostra a congestão hepática dos ratos com ICC. Através do RT-PCR para o $TGF\beta_1$, verificamos que esse fator de crescimento é expresso de maneira significativamente maior nas câmaras cardíacas de ratos com EAo e ICC em relação aos ratos controles (Fig. 4).

A falência cardíaca é caracterizada por prejuízo da função do músculo cardíaco e aumento da fibrose intersticial. Estudos sugerem que a perda da proteína contrátil do coração pode contribuir para o prejuízo da função que é observada nos músculos cardíacos do coração humano (Pagani ED e cols., 1998), ocorrendo significativa diminuição da expressão da α miosina de cadeia pesada (α MHC), sem mudança significativa do nível do mRNA da β miosina (β MHC) (Boluyt MO e cols,

1994), ocorre aumento da expressão do fator de crescimento TGF β (Boluyt MO e cols., 1994), que aumenta a expressão de fibronectina e colágeno, os quais são incorporados na matrix extracelular (Ignatz & Massague, 1986). “In vitro” vários fatores de crescimento causam hipertrofia de miócitos e estímulos que induzem a hipertrofia de miócitos (agonistas α_1 adrenérgicos, angiotensina, e estímulos mecânicos) induzem a expressão do mRNA de fatores de crescimento em células miocárdicas, sugerindo que esses fatores de crescimento têm uma ação parácrina e autócrina em mediar a hipertrofia dos miócitos (Calderone A e cols. 1995). Em relação a esses fatores de crescimento, estudos demonstram que na hipertrofia cardíaca a expressão do fator de crescimento TGF β_1 está aumentada (Villarreal, F & Dillmann, WH.1992) e que o gene TGF β_1 estimula a hipertrofia do miocárdio normalmente observada na ICC (Villarreal, F & Dillmann, WH.1992, Calderone A e cols., 1995). Os nossos resultados da expressão do TGF β_1 vêm ao encontro aos resultados evidenciados na tabela 1, onde verificamos hipertrofia do VE nos ratos com EAo e com ICC.

Desta forma, a estenose aórtica mostrou-se um excelente modelo experimental para provocar ICC em ratos.

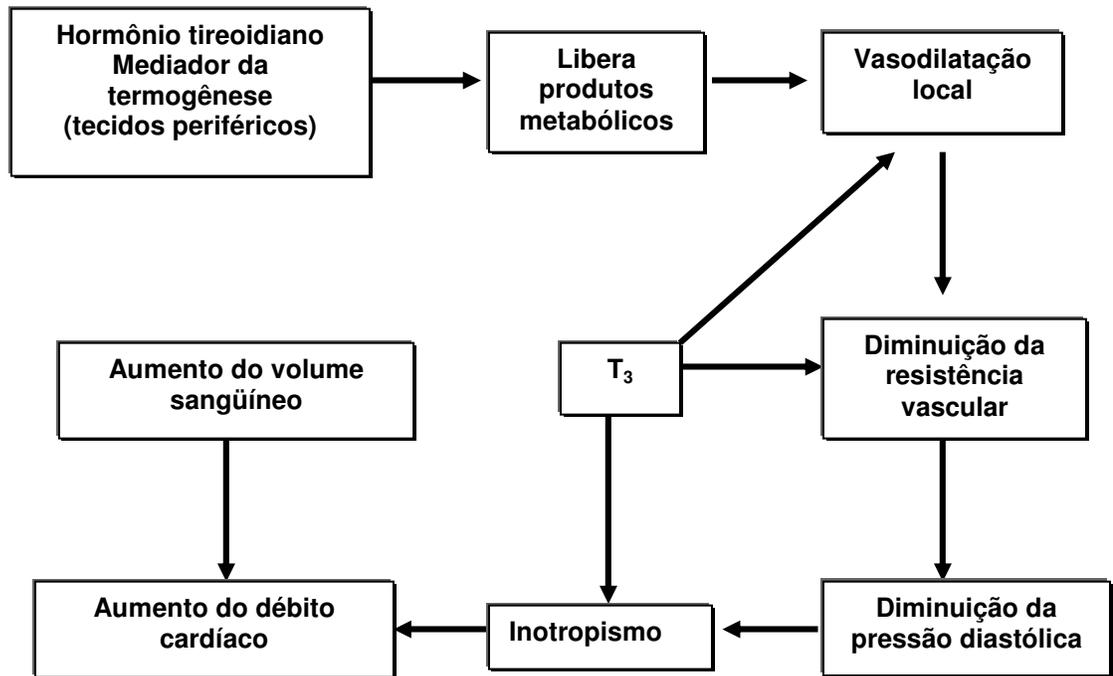
A insuficiência cardíaca é um estado fisiopatológico que está associado com a síndrome do T₃ baixo, correlacionando-se o aumento do rT₃ e diminuição do T₃ com pior prognóstico dos pacientes com insuficiência cardíaca grau III e IV (Hamilton M. e cols., 1990; Klemperer JD e cols.,1996; Morkin E. e cols.,1993).

O nosso modelo experimental nos permitiu investigar a Síndrome do T₃ baixo nos ratos com ICC. A análise da concentração do rT₃ e T₃ gerado da deiodinação hepática e renal (Tab. 3) mostrou uma elevação e diminuição significativa, respectivamente, na concentração desse hormônio nos ratos com ICC. Isso evidencia que nesses ratos está ocorrendo uma inibição da 5' - deiodinase, a enzima que converte T₄ para T₃ e provoca um catabolismo do T₃ reverso, como evidenciamos na

Tabela 3. Essa enzima está localizada nos microsomas do fígado e do rim (Hamilton M. 1993). Desta forma, comprovamos a presença da Síndrome do T₃ baixo nos ratos portadores de ICC. Esses resultados estão em concordância com os nossos trabalhos clínicos (Miano FAG e cols., 2001) e com os de Hamilton M e cols. (1990), que mostraram uma correlação entre o grau de insuficiência cardíaca e a síndrome do T₃ baixo, portanto, a presença da síndrome como um fator prognóstico dos pacientes.

Após o estudo de Hamilton M e cols. (1993), alguns autores discutem se a Síndrome do T₃ baixo seria um mecanismo poupador de energia para o miocárdio, portanto, um mecanismo adaptativo do organismo (Gomberg-Maitland e cols., 1998) ou se o tratamento hormonal com o T₃ traria benefícios para esses pacientes (Utiger RD, 1995 e Brent GA. E Hershman JM, e cols., 1986). Sabe-se que o hormônio tireoideano (HT) aumenta a frequência cardíaca, contratilidade e consumo de nutrientes e oxigênio, semelhante aos efeitos catecolaminérgicos (Friberg L e cols., 2001). Por outro lado, o HT diminui a resistência vascular periférica e melhora o relaxamento diastólico o que provoca o uso mais eficiente de energia e nutrientes. Apesar de Utiger RD, 1980 considerar a síndrome do T₃ baixo como uma resposta adaptativa de preservar energia e manter a integridade celular durante a doença grave, a literatura ainda considera duvidoso se a síndrome do T₃ reverso constitui uma resposta metabólica para conservar energia ou se a sua presença agrava a condição do paciente (Degens H, e cols., 2003, Stathatos N & Wattofsky L, 2003).

A administração de T₃ para pacientes hipotiroideos reduz a resistência vascular periférica (Morkin E e cols., 1993). Pacientes com Insuficiência Cardíaca têm baixo débito cardíaco e elevada resistência periférica e a administração de triiodotironina para esses pacientes revertem esses sinais (vide desenho).



Um modelo pelo qual o hormônio tireoidiano realiza mudanças no consumo de oxigênio tecidual e termogênese, que pode levar a alterações na hemodinâmica cardiovascular.

Hamilton M e cols. (1998) estudaram pacientes com Insuficiência Cardíaca Congestiva graus III e IV que receberam T_3 intravenoso na dose de 0,15 a 2,7 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ em dose única ou através de infusão contínua por 6 horas. Essa dose representa aproximadamente 2 a 3 vezes o total de T_3 ministrado a pacientes hipotiróideos. Nenhum dos pacientes apresentaram alterações do ritmo cardíaco, nem sinais de isquemia miocárdica ou alterações na taxa de metabolismo. No entanto, um aumento significativo do débito cardíaco foi observado 2 horas após o tratamento em 85% dos pacientes que receberam as maiores doses de T_3 e em 45% de todos os pacientes que receberam T_3 .

Klemperer JD e cols. (1996), também demonstraram resultados semelhantes para pacientes de alto risco que foram submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio. Nesse estudo, os

pacientes que receberam T_3 apresentaram um aumento no débito cardíaco e diminuição na resistência vascular sistêmica no pós-operatório imediato em comparação ao grupo placebo.

Moruzzi P e cols. (1996), em concordância aos autores anteriores, demonstraram melhora no desempenho cardíaco em pacientes com cardiomiopatia dilatada graus II, III e IV tratados com 100 μ g de L-tiroxina por dia, durante 3 meses.

Por outro lado, ainda é obscura na literatura, a existência de benefícios a longo prazo com hormônios tireoidianos para pacientes que possuam Insuficiência Cardíaca Congestiva (Degens H. e cols., 2002) Conhecer melhor a concentração dos receptores do hormônio tireoideano ajudaria a responder esta questão.

Como relatamos na introdução, em oposição aos resultados de Sylvén C e cols., em 1996 que demonstraram que a expressão dos receptores para o hormônio tireoideano está diminuída na insuficiência cardíaca, recentemente Shaharara S e cols., (1999) verificaram que o mRNA TR β 1 está aumentado aproximadamente três vezes e o β 2 está aumentado aproximadamente oito vezes no coração de cachorros com falência cardíaca em relação à concentração desses receptores no coração de cachorros normais.

Da mesma forma que Shaharara S e cols. (1999), demonstramos que o TR α 1 é expresso em maior magnitude no ventrículo esquerdo de ratos com insuficiência cardíaca congestiva (ICC) em relação aos ratos-controles e com EAo (Fig. 2) e comprovamos que esses ratos com ICC eram portadores da síndrome do T_3 baixo (tabela 3).

Poderíamos explicar o aumento dos receptores para o hormônio tireoideano observado nas câmaras cardíacas dos animais com ICC, por um mecanismo de “*up regulation*” dos receptores que seria ocasionado pela presença da síndrome do T_3 baixo e poderíamos especular que esses hormônios estariam ávidos para ligar ao hormônio e

melhorar o inotropismo cardíaco. Para responder a essa hipótese, deveríamos tratar esses animais e verificar se ocorre melhora dos sintomas da ICC e se o tratamento aumenta a expressão de proteínas contráteis, como a α miosina, que comprovadamente está diminuída na ICC (Kinugawa K e cols. 2001).

Apesar dos grandes conhecimentos obtidos na fisiopatologia e tratamento da insuficiência cardíaca nos últimos anos, a morbidade e mortalidade cardiovascular ainda são bastante elevadas entre pacientes com insuficiência cardíaca (Packer M e cols., 1987). Os trabalhos que demonstram melhora clínica dos pacientes com ICC com o tratamento de hormônio tireoidiano, ainda são em número pequeno.

A partir da evidência da presença da Síndrome do T_3 baixo no modelo experimental de ratos com insuficiência cardíaca e do aumento da expressão dos receptores de hormônio tireoidianos nesses ratos, poderemos utilizar esse modelo para verificar os benefícios do tratamento com T_3 na Insuficiência Cardíaca e verificar por quanto tempo esse tratamento pode ser utilizado.

Conclusões

- Provocamos a ICC nos ratos, através do método da estenose aórtica e comprovamos a hipertrofia cardíaca nas câmaras cardíacas desses ratos, mostrando ser esse um bom modelo experimental para estudar a ICC.
- Diagnosticamos a síndrome do T₃ baixo nestes animais.
- Verificamos que a expressão do receptor de T₃ (TR α 1) está significativamente aumentada nas câmaras cardíacas dos ratos portadores de ICC e da síndrome do T₃ baixo.

Referências Bibliográficas

Balkman C, Ojamaa K, Klein I. Time course of the *in vivo* effects of thyroid hormones on cardiac gene expression. *Endocrinology* 1992; 130: 2001-6.

Bassett JHD, Hrvey CB, Williams GR. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Mol. And Cel Endocrinol* 2003; 213:1-11.

Beckett GJ, Beddows SE, Morrice PC, Nicol F, Arthur JR. Inhibition of hepatic deiodination of thyroxine is caused by selenium deficiency in rata. *Biochem J* 1987; 248:443-7.

Beigneux AP, Moser AH, Shigenaga JK, Grunfeld C, Feingold KR. Sick euthyroid syndrome is associated with decreased TR expression and DNA binding in mouse liver. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 284: E228-36.

Bianco AC, Kimura ET. Fisiologia da glândula Tireóide. In Aires, MM (editor) *Fisiologia*. Guanabara Koogan AS, Rio de Janeiro, 1999; 69 .812-28.

Bianco AC, Salvatore D, GeribenB, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecullar biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrine Reviews* 2002; 23(1): 38-89.

* Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas. Requisitos uniformes para originais submetidos a revistas biomédicas. *J Pediatr* 1997; 213-24.

Bilezikian JP, Loeb JN. The influence of hyperthyroidism and hypothyroidism on alpha and beta adrenergic receptor systems and adrenergic responsiveness. *Endocr Rev* 1983; 4: 378-96.

Boluyt MO, O'Neill L, Meredith AL, Berig OHL, Brooks WW, Conrad CH, Crow MT, Lakatta EG. Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure. *Circ Res* 1994; 75: 23-32.

Bossoni S, Cossi S, Marengoni A, De Martinis M, Calabrese P, Leonardi R, Guistina A, Romanelli G, Grassi V. Low T₃ syndrome and outcome in elderly hospitalized geriatric patients. *J Endocrinol Invest* 2002; 25: suppl n° 10):73-4.

Brent GA, Hershman JM. Thyroxine therapy in patients with severe nonthyroidal illness and low serum thyroxine concentration. *J Clin Endocrinol* 1986; 63: 1-8.

Calderone A, Takahashi N, Issa NJ, Thaik CM, Colucci WS. Pressure and volume induced left ventricular hypertrophies are associated with cistinet myocyte phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNA. *Circulation* 1995; 92(9): 2385-90.

Chang KC, Figueiredo VM, Schreur JH, Karuja K, Weinwe MW, Simpson PC, Camacho SA. Thyroid hormone improves function and Ca²⁺ handling in pressure overload hypertrophy. Association with increased sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ - ATPase and α -myosin heavy chain in rat hearts. *J Clin Invest* 1997; 100: 1742-9.

Chizzonite RA, Zalk R. Regulation of myosin isoenzyme composition in fetal and neonatal rat ventricle by endogenous thyroid hormones. *J Biol Chem* 1984; 259: 12628-32.

Chopra I.J. Euthyroid sick syndrome: abnormalities in circulating thyroid hormone and thyroid hormone physiology in nonthyroid illness. *Med Grand Rounds* 1982; 1:201-12.

Chopra IJ, Hershman JM, Padridge WM, Nicòloff JT. Thyroid function in non thyroidal illnesses. *Ann Intern Med* 1983; 98: 946-57.

Conrad CH, Brooks WW, Robinson KG, Bing OHL. Impaired myocardial function in spontaneously hypertensive rats heart failure. *Am J Physiol* 1991; 260: H136-45.

Croteau W, Davey JC, Galton VA, St Germain DL. Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase. A selenoprotein differentially expressed and regulated in human and rat brain and other tissues. *J Clin Invest.* 1996; 15;98(2):405-17.

D'Amati G, Di Gioia CRT, Mentuccia D, Pistilli D, Proietti-Pannunzi L, Miraldi F, Gallo P, Celi FS. Increased expression of thyroid hormone receptor isoforms in end-stage human congestive heart failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(5) 2080-4.

Danzi S, Klein I. Thyroid hormone-regulated cardiac gene expression and cardiovascular disease. *Thyroid* 2002; 12(6): 467-72.

Davis PJ, Davis FB. Nongenomic actions of thyroid hormone on the heart. Thyroid. 2002;12(6):459-66.

Davis PJ, Davis FB. Non-genomic actions of thyroid hormone. Thyroid 1996; 6: 497-504.

Degens H, Gilde AJ, Lindhout M, Willemsen PHM, Van Der Vusse GJ, Van Bilsen M. Functional and metabolic adaptation of the heart to prolonged thyroid hormone treatment. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003; 284: H108-15.

Dillmann WH. Biochemical basis of thyroid hormone action in the heart. Am J Med 1990; 188: 626-30.

Engler D, Burger AG. The deiodination of the iodothyronines and of their derivatives in man. Endocr Rev 1984; 5(2): 151-84.

Feldman AM, Weinberg EO, Ray PE, Lorell BH. Selective changes in cardiac gene expression during compensated hypertrophy and the transition to cardiac decompensation in rats with chronic aortic banding. Circ Res 1993; 73: 184-92.

Fitts RH, Winder WW, Brooke MH, Kaiser KK, Holloszy JO. Contractile, biochemical and histochemical properties of thyrotoxic rat soleus muscle. Am J Physiol 1980; 238: C15-20.

Flamant F, Samarut J. Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. *Trends Endocrinol Metab* 2003; 14: 85-90.

Friberg L, Drvota V, Bjelak AH, Eggertsen G, Ahnve S. Association between increased levels of reserve triiodothyronine and mortality after acute myocardial infarction. *Am J Med* 2001, 111: 699-703.

Gomberg-Maitland M, Frishman WH. Thyroid hormone and cardiovascular disease. *Am. Heart J* 1998; 135: 187-96.

Guissouma H, Ghorbel MT, Seugnet I, Owatas T, Demeneix BA. Physiological regulation of hypothalamic TRH transcription *in vivo* is T3 receptor isoform specific. *Faseb J* 1998; 12: 1755-64.

Hamilton M. Prevalence and clinical implications of abnormal thyroid hormone metabolism in advanced heart failure. *Ann Thorac Surg* 1993; 56 (suppl): S48-53.

Hamilton MA, Stevenson LW, Fonarow GC, Steimle A, Goldhaber JI, Child JS, Chopra IJ, Moriguchi JD, Hage, A. Safety and hemodynamic effects of intravenous triiodothyronine in advanced congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1998; 81: 443-7.

Hamilton MA, Stevenson LW, Luu M, Walden JA. Altered thyroid hormone metabolism in advanced heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1990; 16(1):91-5.

Hammond HK, White FC, Buxton ILO, Saltzstein P, Bruton LL, Longhurst JC. Increased myocardial beta-receptors and adrenergic responses in hyperthyroid pigs. *Am J Physiol* 1987; 252:H283-90.

Hodin RA, Lazar MA, Wintman BI, Darling DS, Koenig RJ, Larsen PR, et al. Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science* 1989; 244: 76-9.

Hoth JFY, Egerton LJ. Action of triiodothyronine on the synthesis of rat ventricular myosin isoenzyme. *FEBS Lett* 1979; 101: 143-8.

Ignotz RA, Massague J. Transforming growth factor-B stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 1986; 261: 4337-45.

Kapitola J, Vilimovska D. Inhibition of the early circulatory effects of triiodothyronine in rats by propranolol. *Physiol Biochem* 1988; 30: 347-51.

Kinugawa K, Minobe WA, Wood WM, Ridgway EC, Baxter JD, Ribeiro RCJ, Tawadrows MF, Lowes BA, Long CS, Bristou MR. Signaling pathways responsible for fetal gene induction in the failing human heart. *Circul* 2001; 103: 1089-94.

Klein I, Hong C. Effects of thyroid hormone on cardiac size and myosin content of the heterotopically transplanted rat heart. *J Clin Invest* 1986; 77: 1694-8.

Klemperer JD, OJamaa K, Klein I. Thyroid hormone therapy in cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 1996; 38(4): 329-36.

Kohrle J., Hesch RD, Leonard JL. Intracellular pathways of iodothyronine metabolism. In Braverman LE, Utiger RD., eds. The Thyroid- A fundamental and clinical text 6 th ed, Philadelphia, 1991: 144:89.

Lazar MA. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocrin Rev* 1993; 14: 184-93.

Leonard JL, Visser TJ. Biochemistry of deiodination. In: Hennemann G ed. *Thyroid Hormone Metabolism*. 8th ed. Dekker, New York. 1988: 189-230.

Levey GS, Klein I. Catecholamine thyroid hormone interaction and the cardiovascular manifestations of hyperthyroidism. *Am J Med* 1990; 88: 642-6.

Lin HY, Zhang S, West BL, Tang HY, Passaretti T, Davis FB, et al. Identification of the putative MAP kinase docking site in the thyroid hormone receptor beta 1 DNA-binding domain: functional consequences of mutations at the docking sete. *Biochemistry* 2003; 42: 7571-9.

Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; Sambrook, J.. *Molecular cloning: a laboratory manual*; 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.

Miano FAG, Augusto M, Mendonça MBF, Silva TCR, Monteiro SC, Salatti C, Matai O, Figueiredo NB, Cicogna ac, Okoshi K, Castro AVB, Nogueira CR. Síndrome do T3 baixo (ST3) como valor prognóstico para pacientes com insuficiência cardíaca congestiva acompanhados ambulatorialmente. *Arq. Bras. Endocrino. Metab.*, 2001, 45(2), S228.

Morkin E, Pennock GD, Raya TE, Bahl JJ, Goldman S. Studies on the use of thyroid hormone and a thyroid hormone analogue in the treatment of congestive heart failure. *Ann Thorac Surg*, 1993; 56(1 Suppl):S54-60.

Moruzzi P, Doria E, Agostoni PG. Medium-term effectiveness of L-thyroxine treatment in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Med* 1996; 101: 461-7.

Nunes MT and Bianco AC. Extrathyroidal conversion of thyroxine to 3,5,3' – triiodothyronine in cold-acclimated thyroxine – maintained thyroidectomized rats. *Braz J Med Biol Res* 1986; 19: 311-8.

Nunes MT, Bianco AC, Megala A, Agostini B, Hasselback W. Thyroxine induced transformation in sarcoplasmic reticulum of rabbit soleus and psoas muscles. *A Natuforsch* 1985; 40c: 726-34.

Ojamaa K, Kenessey A, Shenoy R, Klein I. Thyroid hormone metabolism and cardiac gene expression after acute myocardial infarction in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metabol* 2000; 279: E1319-24.

Packer M, Lee WH, Kessler, PD, Gottlieb SS, Bernstein JL, Kukin ML. Role of neurohormonal mechanisms in determining survival in patients with severe chronic heart failure. *Circulation* 1987; 75(suppl 4): IV80-92.

Pagani ED, Alousi AA, Grant AM, Ulder TM, Dziuban, SWJr, Allen PD. Changes in myofibrillar content and Mg-ATPase activity in ventricular tissues from patients with heart failure caused by coronary artery disease, cardiomyopathy, or mitral valve insufficiency. *Circ Red.* 1998; 63: 380-5.

Panamonta O, Kosalaraksa P, Thinkhamrop B, Kirdpon W, Ingchanin C, Lumbiganon P. Endocrine function in thai children infected with human immunodeficiency virus. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2004; 17: 33-40.

Ribeiro RCJ, Apriletti JW, Wagner RL, West BL, Feng W, Huber R, et al. Mechanisms of thyroid hormone action: Insights from X-ray crystallographic and functional studies. *Recent Prog Horm Res* 1998; 53: 351-94.

Rohrer D, Dillman WH. Thyroid hormone markedly increases the mRNA coding for sarcoplasmic reticulum Ca^{+2} -ATPase in the rat heart. *J Biol Chem* 1988, 263:6941-4.

Samuels HH. As-acting elements of the rat growth hormone gene, which mediate basal and regulated expression by thyroid hormone. *J Biol Chem* 1987; 262: 6873-82.

Santos RA, Glannocco G, Nunes MT. Thyroid hormone stimulates myoglobin expression in soleus and extensorum digitalis longus muscles of rats: Concomitant alterations in the activities of krebs cycle oxidative enzymes. *Thyroid* 2001; 11: 545-50.

Schunkert H, Dzau VJ, Tang SS, Hirsch AT, Apstein CS, Lorell BH. Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. *J Clin Invest.* 1990; 86(6):1913-20.

Schunkert H, Jackson B, Tang SS, Schoen FJ, Smits JF, Apstein CS, Lorell BH. Distribution and functional significance of cardiac angiotensin converting enzyme in hypertrophied rat hearts. *Circulation*. 1993; 87(4):1328-39.

Shahrara S, Tidholm A, Druota V, Häggstöm J, Sylvén C. Upregulation of thyroid hormone receptor β 1 and β 2 messenger RNA in the myocardium of dogs with dilated cardiomyopathy or chronic valvular disease. *Am J Vet Res* 1999; 60(7): 848-51.

Shanoudy H, Soliman A, Moe S, Hadian D, Veldhuis JD, Iranmanish A, Russell DC. Early manifestation of "sick euthyroid" syndrome in patients with compensated chronic heart failure. *J Card Fail* 2001; 7(2): 146-52.

Shyprnik MA. Thyroid hormone suppression of pituitary hormone gene expression. *Rev. Endocr Metab Disord* 2000; 1: 35-42.

Smith JW, Evans AT, Costall B, Smythe JW. Thyroid hormones, brain function and cognition: a brief review. *Neurosci Biobehav Rev*. 2002 Jan;26(1):45-60.

St Gemain DL, Galton VA. The deiodinase family of selenoprotein. *Thyroid* 1997, 7(4) 655-68. Review.

Stathatos N, Wartofsky L. The euthyroid sick syndrome: Is there a physiologic rationale for thyroid hormone treatment? *J Endocrinol Invest* 2003; 26: 1174-9.

Sylven C; Jansson E; Sotonyi P; Waagstein F; Barkhem T; Bronnegard M. Cardiac nuclear hormone receptor mRNA in heart failure in man. *Life Sci* 1996; 59(22):1917-22.

Trost SU, Swanson E, Gloss B, Wang-Iverson DB, Zhang H, Volodarsky T, Grover G, Baxter JD, Chiellini G, Scanlan TS, Dillmann WH. The thyroid hormone receptor- β -selective agonist GC-1 differentially affects plasma lipids and cardiac activity. *Endocrinology* 2000; 141: 3057-64.

Utiger RD. Decreased extra thyroidal triiodothyronine production in nonthyroidal illnesses. benefit or harm? *Am J Med* 1980; 69: 807-10.

Utiger RD. Altered thyroid functional in nonthyroidal illness and surgery. To treat or not treat? *N Engl J Med* 1995; 333(23): 1562-3.

Villarreal F, Dillamann WH. Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF β ₁, fibronectin, and collagen. *Am J Physiol* 1992; 262: H1861-6.

Volpato CB, Nunes MT. Functional evidence for the presence of type II 5'-deiodinase in somatotropes and its adaptative role in hypothyroidism. *Neuroendocrinology* 2001; 4: 220-6.

Wang YG, Dedkova EN, Fiening JP, Ojamaa K, Blatter LA, Lipsius SL. Acute exposure to thyroid hormone increases Na⁺ current and intracellular Ca²⁺ in cat atrial myocytes. *J Physiol.* 2003; 15; :491-9.

Wartofsky I, Burman KD. Alterations in thyroid function in patients with systemic illness. The "euthyroid sick syndrome". *Endocr Rev* 1982; 3:164-217.

Weinberg EO, Schoen FJ, George D, Kagaya Y, Douglas PS, Litwin SE, Schunkert H, Benedict CR, Lorell BH. Angiotensin-converting enzyme inhibition prolongs survival and modifies the transition to heart failure in rats with pressure overload hypertrophy due to ascending aortic stenosis. *Circulation*. 1994 ;90(3):1410-22.

Williams LT, Lefkowitz RJ. Thyroid hormone regulation of β -adrenergic receptor number. *J Biol Chem* 1977; 252: 2787-9.

Williams GR. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 8329-42.

Yen PM. Physiological and molecular basic of thyroid hormone action. *Physiol Rev* 2001; 81: 1097-142.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)