

GUILHERME COTOMACCI

**INFLUÊNCIA DOS HORMÔNIOS TIROIDEANOS NA
PRODUÇÃO DE ADENOSINA NO TECIDO CARDÍACO.
UTILIZAÇÃO DE FRAÇÕES SUBCELULARES COMO
MODELO EXPERIMENTAL.**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Morfofuncionais do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências (Ciências
Morfofuncionais).**

**São Paulo
2006**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

GUILHERME COTOMACCI

**INFLUÊNCIA DOS HORMÔNIOS TIROIDEANOS NA
PRODUÇÃO DE ADENOSINA NO TECIDO CARDÍACO.
UTILIZAÇÃO DE FRAÇÕES SUBCELULARES COMO
MODELO EXPERIMENTAL.**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Morfofuncionais do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências (Ciências
Morfofuncionais.**

**Área de Concentração: Ciências
Morfofuncionais**

**Orientador: Profa. Dra. Maria Luiza
Morais Barreto de Chaves**

**São Paulo
2006**

DEDICATÓRIA

À minha família, especialmente à minha mãe (Marlene) e ao meu pai (João Álvaro) que me apoiaram e me incentivaram a todo o momento. Muito Obrigado!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente minha orientadora Professora Dra Maria Luiza que têm se tornado a cada ano que passa uma grande amiga. Muito obrigado pela oportunidade desde a minha iniciação científica, competência, orientação, profissionalismo, suporte, afeto, convívio e, principalmente, pela confiança depositada! Obrigado também pela sua paciência com a minha persistência e por vezes teimosia.

Ao Professor Sarkis pela brilhante idéia na elaboração do projeto, pela colaboração e co-orientação (pena que não oficial), pelos ensinamentos da Enzimologia, pela experiência, pela confiança e amizade, pelos rápidos e sábios pensamentos além das divertidas conversas. Muito obrigado pela oportunidade da ida a Porto Alegre a qual me fez crescer.

Ao Professor Edson Liberti a quem eu respeito e admiro pela sua simplicidade. Obrigado pelos conselhos e ensinamentos, pelos divertidos momentos vivenciados e ótimas conversas.

Ao Professor Renato pelos excelentes papos, pela convivência e pela tranquilidade.

Ao Professor Richard pela simplicidade, pelas conversas e amizade e pela juventude.

Aos meus pais por me proporcionarem tudo até hoje, pela preocupação, compreensão e companhia. Mãe, obrigado pelo exemplo de carinho, carisma, bondade e amor. Pai, obrigado pelos ensinamentos de responsabilidade, respeito, honestidade e disciplina. Vocês dois são especiais...amo vocês!!! Obrigado aos meus dois irmãos, Flavia e Marcio, pela convivência e divisão do mesmo espaço.

À minha tia Ida pela vivência e pelo exemplo de independência e bondade.

À minha linda namorada, Carol, pelo amor e carinho. Obrigado por estar presente em todos os momentos e principalmente por me incentivar, compreender e ter MUITA paciência. Você é muito especial, te amo!!

Aos amigos do laboratório de Biologia Celular e Anatomia Funcional pela grande amizade e convívio durante estes anos e também pelos momentos alegres. Obrigado pela colaboração de todos (Alexandre, Amanda, Ana Claudia, Erica, Flavio, Gabriela, Gisele, Joelcimar, Junior, Lincoln, Luana, Maria Alicia, Maria Tereza, Ricardo).

Ao Eduardo por ser um irmão! Obrigado por todos esses 6 anos de amizade e cumplicidade, conte sempre comigo.

À Marcela, um exemplo de pessoa. Você é demais! Tenho um carinho muito grande por você.

Ao Alexandre, Flavio e Luciano meus grandes amigos e quase irmãos. Obrigado pela crescente amizade, pelas palavras e atitudes de conforto, incentivo, ajuda e pelas risadas.

Ao meu outro grande amigo, irmão e fiel escudeiro, Ricardo, que me ajudou imensamente neste último ano do Mestrado permitindo a obtenção de muitos resultados. Muito obrigado pela preciosa ajuda, meticulosidade, energia, disposição depositada e pelo companheirismo.

Aos meus grandes amigos de outros laboratórios (Cibele, Fátima, Josemberg, Junior, Leila, Luciane, Mateus, Pedro, Renata, Wiliam, William e etc...) pelo companheirismo e valiosa amizade.

À Professora. Claudimara e seus alunos pela amigável convivência e por inúmeras vezes me fornecerem água Milli-Q.

À oportunidade que tive em conhecer e trabalhar, por um curto período, no Laboratório de Enzimologia do Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS. Um agradecimento especial ao Professor Sarkis e à Professora Ana Battastini pelo acolhimento e à todos os amigos e amigas que lá conheci. Obrigado pela recepção afetuosa, pelo descontraído ambiente de trabalho e por vivenciar o trabalho em equipe. Considero aqui um agradecimento especial à Cristina pela ótima companhia e conselhos não só quando estive em Porto Alegre, mas também quando estive aqui, além também das inúmeras trocas de experiências. Obrigado pela sua grandiosa amizade que têm crescido cada vez mais e pela sua enorme atenção. Agradeço também em especial a Alessandra (Japa) pela hospedagem, pela contribuição nos experimentos e pelos conselhos dados. Muito obrigado pelo estímulo e trocas de idéias. Obrigado pela imensa amizade que foi criada!

A um grande amigo meu (Leonardo) principalmente pela amizade e pelos momentos inusitados e engraçadíssimos que passamos juntos.

Todo o restante dos meus amigos (de infância, do clube, do colégio e da faculdade) que apesar, de certas épocas, mantermos certa distância os considero muito e que me incentivaram nesta caminhada. Agradeço a atenção que vocês têm por mim.

A todos os professores, funcionários e pós-graduandos do Departamento de Anatomia, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Agradeço todos os técnicos de anatomia pela amizade e momentos de descontração.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq pela bolsa concedida e pelo suporte financeiro do projeto.

Enfim, obrigado a todos!

*"O sábio não se exhibe, por isso brilha;
não se faz notar, por isso é notado; não
se elogia, por isso tem mérito; e porque
não está competindo, ninguém no mundo
pode competir com ele."*

(Autor desconhecido)

RESUMO

COTOMACCI, G. Influência dos hormônios tiroideanos na produção de adenosina no tecido cardíaco. Utilização de frações subcelulares como modelo experimental. 2006. 120 f
Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Os nucleotídeos extracelulares de adenina (ATP, ADP e AMP) assim como o nucleosídeo adenosina são importantes moléculas sinalizadoras por desempenharem diversas funções no sistema cardiovascular, em situações fisiológicas e/ou fisiopatológicas como: controle da agregação plaquetária, respostas inflamatórias, crescimento e proliferação celular e controle do tônus vascular. As ectonucleosídeo trifosfato difosfoidrolases (E-NTPDases) juntamente com a ecto-5'-nucleotidase (5'-NT) são ectonucleotidasas capazes de regular a concentração desses nucleotídeos circulantes no meio extracelular por hidrolisar ATP e ADP (E-NTPDases) e AMP (5'-NT) até a formação do produto final adenosina, que tem potente efeito vasodilatador e cárdio-protetor. Os hormônios tiroideanos (HT), tiroxina-T4 e triiodotironina-T3, sabidamente exercem importantes efeitos no sistema cardiovascular como hipertrofia cardíaca e vasodilatação. Dados recentes de nosso laboratório demonstraram a influência do HT na atividade específica (AE) e expressão dessas ectonucleotidasas em culturas primárias de cardiomiócitos de ratos neonatos. A obtenção de frações subcelulares cardíacas para avaliar a produção de adenosina em compartimentos celulares pelas ectoenzimas torna-se um bom modelo experimental devido à peculiaridade deste método. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade ectonucleotidásica nas frações solúvel (FS) e microssomal (FM) de ratos induzidos ao hipertiroidismo e hipotiroidismo experimental. Ratos Wistar machos adultos foram tratados com T4 ou T3 por 14 dias em diferentes doses

(T4-10, T4-25, T4-50 e T3-10, sendo 10µg, 25µg, 50µg de T4 e 3,5µg de T3/100g de peso corpóreo, respectivamente); ou foram tireoidectomizados e tratados com metimazol (0,05%) e CaCl₂ (4,5mM) adicionados à água de beber ou; ratos hipotiroideos que posteriormente receberam reposição hormonal com injeções diárias de T4 (T4-10) durante 14 dias. A FS e a FM foram obtidas após sucessivas centrifugações. As atividades foram medidas pela liberação de fosfato inorgânico (Pi), utilizando verde de malaquita. Os resultados deste estudo mostraram que a indução ao hiper e hipotiroidismo foram eficazes, sendo confirmadas pela análise dos parâmetros hemodinâmicos (frequência cardíaca e pressão arterial sistólica), razão peso ventricular do coração/peso corpóreo e dosagens séricas hormonais. Com relação à AE dessas enzimas o HT promoveu significativo aumento na hidrólise de ATP (T4-50 e T3-10) e diminuição na hidrólise de AMP (T4-25 e T4-50) apenas na FS. No hipotiroidismo houve aumento significativo da hidrólise de ATP e AMP na FS e ATP, ADP e AMP na FM. Na reposição hormonal a hidrólise de AMP na FS e a de ADP na FM foram revertidas quando comparadas ao grupo hipotiroideo, porém a hidrólise de ATP e ADP na FS foram significativamente superiores aos grupos hipotiroideo e controle. Estes resultados demonstram que as alterações dos níveis de HT no animal influenciam as enzimas envolvidas na degradação de ATP à adenosina e possivelmente afetam as respostas mediadas pelos nucleotídeos de adenina no tecido cardíaco de ratos adultos, além disso, nota-se no hipertiroidismo que os níveis de adenosina no tecido cardíaco encontram-se diminuídos podendo então reduzir o efeito cardioprotetor mediado por este nucleosídeo. Ao contrário, no hipotiroidismo os níveis de adenosina encontram-se aumentados, contribuindo provavelmente para manutenção da função cardíaca que foi prejudicada pela privação de HT.

Palavras-chave: E-NTPDase, Ecto-5'-Nucleotidase, Nucleotídeos Extracelulares de Adenina, Adenosina, Hipertiroidismo, Hipotiroidismo, Tecido Cardíaco, Frações Subcelulares.

ABSTRACT

COTOMACCI, G. Influence of thyroid hormones on the adenosine production in the cardiac tissue evaluated in subcellular fractions. 2006. p. 120. Master Thesis (Morpho-Functional Sciences), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The extracellular adenine nucleotides (ATP, ADP, and AMP) as well as adenosine nucleoside are important molecules with different functions in the cardiovascular system under physiological and/or physiopathological conditions: platelets aggregation's control, inflammatory responses, growth and cellular proliferation and control of vascular tonus. The ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases) and the ecto-5'-nucleotidase (5'-NT) are ectonucleotidases able to regulate the concentration of these nucleotides in the extracellular environment through ATP and ADP hydrolysis (E-NTPDases) and AMP hydrolysis (5'-NT) until adenosine which has a potent vasodilator and cardioprotective effect. Thyroid hormones (HT – T3 and T4) promote important effects on cardiovascular system as cardiac hypertrophy and vasodilatation. Data recently obtained in our laboratory demonstrated in primary culture of neonatal cardiomyocytes the influence of HT in the specific activity (AE) and gene expression of ectonucleotidases. In the present study we investigated in rats the ectonucleotidase activity in soluble (FS) and microsomal (FM) fractions after induction of experimental hyper and hypothyroidism. Adult male Wistar rats were treated with T4 or T3 for 14 days with different doses (T4-10, T4-25, T4-50 and T3-10, being 10µg, 25µg, 50µg of T4 and 3,5µg of T3/100g body weight, respectively). In another group, the animals were thyroidectomized and treated with methimazole (0.05%) and CaCl₂ (4.5mM) added to drinking water for 14 days or also the hypothyroid rats received the hormonal replacement by daily

injections of T4 (T4-10) for 14 days. FS and FM were obtained after successive centrifugations. The enzymatic activities were determined by measuring the release of inorganic phosphate (Pi), using malachite green. Some hemodynamic parameters as heart rate and systolic blood pressure and also the ventricle heart weight/body weight ratio and hormonal serum levels confirmed the efficacy of experimental models. HT promoted in the FS a significant increase on ATP (T4-50 and T3-10) and reduction on AMP (T4-25 and T4-50) hydrolysis. Hypothyroid group showed in the FS a significant increase on ATP and AMP hydrolysis and also on ATP, ADP and AMP hydrolysis in the FM. When was done the hormonal replacement the hydrolysis of AMP in the FS and ADP in the FM was reverted when compared to hypothyroid group. However, ATP and ADP hydrolysis in the FS was significantly higher compared to hypothyroid and control groups. These results demonstrate that alterations of HT levels influence the enzymes involved to degradation from ATP to adenosine. In the hyperthyroidism, the adenosine levels in cardiac tissue were diminished and contrarily increased in the hypothyroidism, perhaps contributing to maintenance of cardiac function under HT privation.

Key words: E-NTPDase, Ecto-5'-Nucleotidase, Extracellular Adenine Nucleotides, Adenosine, Hyperthyroidism, Hypothyroidism, Cardiac Tissue, Subcellular Fractions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Figura representativa das principais enzimas ectonucleotidases, associadas ou não à membrana plasmática.	29
Figura 2 – Esquema representativo da cascata de hidrólise dos nucleotídeos extracelulares e suas ações nos receptores.	36
Figura 3 – Razão Peso Ventricular/Peso Corpóreo dos diferentes grupos experimentais.	61
Figura 4 – Evolução da Frequência Cardíaca (bpm) nos diferentes drupos experimentais.	63
Figura 5 – Evolução da Pressão Arterial Sistólica (mmHg) nos diferentes grupos experimentais.....	63
Figura 6 – Fotomicrografias representativas dos corações de 3 diferentes grupos experimentais estudados.	66
Figura 7 – Padronização do tempo de incubação e concentração de proteína ideais para a avaliação da hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP na Fração Solúvel.	68
Figura 8 – Padronização do tempo de incubação e concentração de proteína ideais para a avaliação da hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP na Fração Microssomal.	71
Figura 9 – Efeito de diferentes graus de Hipertiroidismo (utilizando T4) sobre a hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP nas Frações Solúvel e Microssomal de coração.	74
Figura 10 – Efeito do T3 sobre a hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP nas Frações Solúvel e Microssomal de coração.	76
Figura 11 – Efeito do Hipotiroidismo e da Reposição Hormonal de T4 sobre a hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP nas Frações Solúvel e Microssomal de coração.	80
Figura 12 – Expressão protéica da enzima ecto-5'-nucleotidase nas frações solúvel e microssomal.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Peso inicial (Pi), Peso final (Pf) e ganho de peso ($\Delta = Pf - Pi$) dos animais.	59
Tabela 2 – Dosagens séricas de T3 e T4.	65
Tabela 3 – Razão ATPase/ADPase na Fração Solúvel e Microssomal, baseada na atividade específica (nmol de Pi liberado/min/mg de proteína) dos diferentes grupos estudados.	81

LISTA DE ABREVIATURAS (ordem alfabética)

- 5'-NT – Ecto-5'-Nucleotidase
- ACRs – Regiões Conservadas da Apirase
- ADP – Adenosina 5'-Difosfato
- AE – Atividade Específica
- AMP – Adenosina 5'-Monofosfato
- AMPCP – Adenosina 5'- α , β -Metileno Difosfato
- ATP – Adenosina 5'-Trifosfato
- BSA – Albumina Bovina Sérica
- cDNA – Ácido Desoxirribonucléico complementar
- D1, D2, D3 – 5'-Desiodases do Tipo 1, 2, 3
- DP – Desvio Padrão
- E-NPPs – Ecto-Nucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterases
- E-NTPDases – Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases
- FC – Frequência Cardíaca
- FM – Fração Microsomal
- FS – Fração Solúvel
- GPI – Glicosilfosfatidil-Inositol
- HE – Hemtoxilina-Eosina
- Hipo – Animais Hipotiroideos
- HT – Hormônio Tiroideano
- MAPK – Proteína Quinase Ativadora de Mitógeno
- α -MHC – Alfa-Miosina de Cadeia Pesada

PAS – Pressão Arterial Sistólica

P1 – Receptor Purinérgico do Tipo 1

P2 – Receptor Purinérgico do Tipo 2

P2X – Receptor Purinérgico Metabotrópico do Tipo 2

P2Y – Receptor Purinérgico Ionotrópico do Tipo 2

PBS – Solução Tampão Fosfato

Pi – Fosfato Inorgânico

PKC – Proteína Quinase C

PLA₂ – Fosfolipase A₂

PLD – Fosfolipase D

RNA_m – RNA mensageiro

RT-PCR – Transcrição Reversa - Reação em Cadeia de Polimerase

SERCA – Cálcio-ATPase de Retículo Sarcoplasmático

T3 – Hormônio Tiroideano, Triiodotironina

T4 – Hormônio Tiroideano, Tiroxina

TAFs – Receptor de Hormônio Tiroideano Associado a Fatores Transcricionais

TCA – Ácido Tricloroacético

TRs – Receptores Nucleares de Hormônio Tiroideano

UDP – Uridina Difosfato

UTP – Uridina Trifosfato

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	21
1.1 – Ectonucleotidasas	22
1.1.1 - Ectonucleosídeo Trifosfato Difosfoidrolases (E-NTPDases).....	23
- <i>Enzimas associadas à membrana plasmática</i>	25
- <i>Enzimas associadas ao meio intracelular</i>	26
1.1.2 - Ecto-5'-Nucleotidase (5'-NT).....	27
1.2 – Ações Biológicas dos Nucleotídeos Extracelulares de Adenina (ATP, ADP e AMP) e da Adenosina	30
1.3 – Tecido Cardíaco	37
1.4 – Hormônio Tiroideano (HT)	38
2 – OBJETIVOS	43
3 – MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1 – Animais.....	46
3.2 – Protocolos Experimentais	47
3.2.1 - Indução ao Hipertiroidismo	47
3.2.2 - Indução ao Hipotiroidismo	48
3.2.3 - Hipotiroidismo com Reposição Hormonal.....	48
3.3 – Avaliação do Peso Ventricular Cardíaco, do Peso Corporal, do Consumo de Água e de Ração	49
3.4 – Avaliação dos Parâmetros Hemodinâmicos	49
3.5 – Dosagens Séricas dos Hormônios Tiroideanos.....	50
3.6 – Análise Histológica do Coração.....	50
3.7 – Avaliação da Hidrólise dos Nucleotídeos nas Frações Subcelulares Cardíacas.....	52
3.7.1 - Preparação das Frações Subcelulares.....	52
3.7.2 - Ensaio da Atividade Enzimática das Ectonucleotidasas, avaliada com base na Hidrólise de ATP, ADP e AMP.....	53
3.8 – Análise da Expressão Protéica	55
3.9 – Análise Estatística dos Resultados	57
4 – RESULTADOS	58
4.1 – Avaliação do Peso Corpóreo, Consumo Total de Água e Ração dos Animais	59
4.2 – Análise da Razão Peso Ventricular (Ventrículos Direito e Esquerdo)/Peso Corpóreo nos Diferentes Grupos Estudados	60
4.3 – Avaliação da Frequência Cardíaca e da Pressão Arterial Sistólica.....	61

4.4 – Dosagens Séricas.....	64
4.5 – Análise Histológica do Coração.....	65
4.6 – Análise da Atividade Enzimática nas Frações Subcelulares (Solúvel e Microssomal) 66	
4.6.1 – Padronização das Condições Ideais.....	66
4.6.1.1 - Quanto à Fração Solúvel (FS): Hidrólise de ATP, ADP e AMP	66
4.6.1.2 - Quanto à Fração Microssomal (FM): Hidrólise de ATP, ADP e AMP.....	69
4.6.2 – Efeito do Hipertiroidismo (utilizando T4) nas Atividades Ectonucleotídicas das Frações Solúvel e Microssomal	72
4.6.3 – Efeito do Hipertiroidismo (utilizando T3) nas Atividades Ectonucleotídicas das Frações Solúvel e Microssomal	74
4.6.4 – Efeito do Hipotiroidismo e da Reposição Hormonal de T4-10 sobre as Atividades Ectonucleotídicas das Frações Solúvel e Microssomal.....	77
4.6.5 – Razão de Hidrólise ATP:ADP nas Frações Solúvel e Microssomal	80
4.7 – Análise da Expressão Protéica da Enzima Ecto-5'-Nucleotidase nas Frações Solúvel e Microssomal – <u>Resultados Preliminares</u>	82
5 – DISCUSSÃO	84
5.1 – Modelo de Hiper e Hipotiroidismo Experimental.....	86
5.2 – Presença das Ectonucleotidases nas Frações Subcelulares.....	88
5.3 – Hormônio Tiroideano e Ectonucleotidases.....	90
6 – CONCLUSÕES.....	99
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – Ectonucleotidases

Ectonucleotidases correspondem a um conjunto de enzimas que se encontram ancoradas à membrana plasmática por um ou dois domínios transmembranares e com capacidade de hidrolisar nucleotídeos extracelulares, uma vez que apresentam seu sítio catalítico voltado para o meio externo da célula. Assim, essas enzimas agem em substratos específicos como nucleotídeos das bases púricas (adenina e guanina) ou pirimídicas (timina, uracila e citosina), solúveis no meio extracelular, tendo como produto dessa hidrólise os respectivos nucleosídeos, os quais desempenharão uma série de funções em diversos tecidos. Até o momento uma série de enzimas que fazem parte da sofisticada cascata de hidrólise de nucleotídeos extracelulares já foi descrita. Dentre elas incluem-se as pertencentes à família das E-NTPDases (ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases), a família das E-NPPs (ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases, PDEases), a ectofosfatase alcalina e a ecto-ATP:AMP fosfotransferase (adenilatoquinase e mioquinase), sendo que todas estas podem hidrolisar, por exemplo, nucleotídeos de adenina (ATP e ADP), levando à formação de AMP e liberando fosfato inorgânico. O AMP, por ação de uma ecto-5'-nucleotidase (5'-NT) ou ectofosfatase alcalina, pode ser transformado no nucleosídeo final, a adenosina, liberando um grupo fosfato. Existe ainda um outro grupo de enzimas (ectonucleosídeos difosfoquinases), responsável pela interconversão de nucleosídeos di e trifosfatados (ZIMMERMANN, 2001).

Embora esteja muito bem estabelecida a quebra de nucleotídeos extracelulares por ectonucleotidases associadas à membrana das células, estudos recentes indicam que formas solúveis dessas enzimas (conhecidas como exonucleotidases) podem ser liberadas para o meio extracelular, e estas também terão uma grande importância na hidrólise e, conseqüentemente, na regulação da concentração dos níveis fisiológicos desses nucleotídeos (YEGUTKIN *et al.*, 2000). Além disso, essas nucleotidases solúveis estão sendo muito utilizadas como ferramentas farmacológicas visando certa proteção tecidual.

Dentre as ectonucleotidasas anteriormente citadas, duas delas merecem destaque: família das E-NTPDases e a ecto-5'-nucleotidase.

1.1.1 - Ectonucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases (E-NTPDases)

Basicamente, as enzimas que fazem parte dessa família são as ecto-apirases e ecto-ATPases. Recentemente uma nova nomenclatura proposta por ZIMMERMANN (2001) passou a ser utilizada para descrever estas enzimas, unificando todas as denominações já existentes e facilitando o seu maior entendimento. No entanto, ainda hoje, em alguns trabalhos atuais os pesquisadores da área se referem a elas fazendo uso da nomenclatura antiga, o que por vezes torna a descrição das enzimas um pouco confusa.

Há exatamente 62 anos, MEYERHOF (1945) sugeriu o termo apirase (ATP-difosfohidrolase ou EC 3.6.1.5) para as enzimas que agem hidrolisando tanto o ATP quanto o ADP, rompendo, respectivamente, a ligação de 2 ou 1 grupo fosfato até à formação do produto final, o nucleotídeo monofosfato. No entanto, SARKIS *et al.* (1995) é que realmente demonstraram protocolos de caracterização dessas enzimas evidenciando que estas hidrolisam de fato diferentes nucleotídeos, não apresentando substratos específicos, podendo estes ser di ou trifosfatos. Já as ecto-ATPases (EC 3.6.1.15) hidrolisam especificamente nucleotídeos trifosfatos (KOMOSZYNSKI & WOJTCZAK, 1996). A presença da atividade dessas apirases em diferentes organismos já foi muito bem estabelecida, tendo sido demonstrada em plantas, em invertebrados, em vários tecidos e células de mamíferos como aorta bovina, células endoteliais e musculares, plaquetas de rato e de humano (FRASSETTO *et al.*, 1993; PILLA *et al.*, 1996), em membranas sinápticas de cérebro de ratos (BATTASTINI *et al.*, 1995), em sarcolema cardíaco de rato (OLIVEIRA *et al.*, 1997), entre outros.

Em 1996, WANG & GUIDOTTI, com o auxílio de técnicas de biologia molecular, em combinação com técnicas clássicas já existentes (histologia e citologia), identificaram, no

mesmo tipo celular, a expressão de uma proteína de superfície celular de linfócitos, a CD39, com semelhanças quanto à atividade das ecto-apirases. Esta associação foi comprovada após a realização de ensaios utilizando a transfecção do cDNA da proteína CD39 em células COS-7, os quais resultaram no aumento da atividade da ecto-apirase. A partir daí, portanto, essas enzimas passaram a ser também denominadas como CD39 (ecto-apirase) e C39L1 (ecto-ATPase) (WANG & GUIDOTTI, 1996; CHADWICK & FRISCHAUF, 1997).

De acordo com a nomenclatura atual (ZIMMERMANN, 2001) todas essas enzimas recebem a denominação de NTPDases. As NTPDases são então caracterizadas por hidrolisar uma variedade de nucleosídeos purínicos e pirimidínicos, sendo di ou trifosfatados, podendo fazer parte os nucleotídeos de adenina, guanina, citosina e uracila. A especificidade das diferentes NTPDases por determinados nucleotídeos revela importantes características, e a partir destas são feitas associações relacionadas à sua localização tecidual e principalmente às respectivas implicações funcionais.

Dentre as principais características das ectoenzimas da família E-NTPDases podem ser citadas: a) todos os membros da família possuem na sequência de aminoácidos cinco regiões altamente conservadas (ACRs – apyrase conserved regions), o que provavelmente é de extrema relevância para a atividade catalítica sobre a hidrólise dos nucleotídeos; b) subunidade catalítica altamente glicosilada; c) dependência de cátions divalentes (especialmente Ca^{2+} ou Mg^{2+}); d) agem em pH alcalino; e) são insensíveis a inibidores típicos de ATPases intracelulares como tipo P (ouabaína e vanadato), F (azida) V (N-etilmaleimida - NEM) ou fosfatase alcalina; f) possuem alto “turn-over” e; g) habilidade para hidrolisar uma variedade de nucleotídeos purínicos e pirimidínicos di ou trifosfatados, como já citado anteriormente (PLESNER, 1995; ZIMMERMANN, 1996; ZIMMERMANN, 1999). Embora sejam considerados insensíveis aos inibidores típicos de ATPases, recentemente ESCALADA *et al.* (2004), em estudo com órgão elétrico de peixes da espécie *Torpedo marmorata* ou

Torpedo torpedo, descreveram um novo e potente inibidor de E-NTPDase denominado gadolínio (Gd^{3+}). Este lantanídeo inibe competitivamente a atividade ATPásica, e de forma não-competitiva a atividade ADPásica e parece ser um inibidor promissor para os estudos futuros que envolvem este tipo de abordagem.

A família das E-NTPDases apresenta atualmente 8 membros já identificados, sendo denominados de NTPDase 1 a NTPDase 8 (conforme revisão de ZIMMERMANN, 2001; SHI *et al.*, 2001; BIGONNESSE, 2004; ROBSON *et al.*, 2006) e estes membros, de acordo com a sua localização celular, podem ser encontrados ancorados à membrana plasmática ou então presentes no meio intracelular.

- Enzimas associadas à membrana plasmática:

A NTPDase 1, a NTPDase 2, e a NTPDase 3 são enzimas que possuem 2 domínios transmembranares com pequenas seqüências intracelulares em ambas as porções (N-terminal e C-terminal) da proteína e com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular. Ao contrário da parte intracelular, essas enzimas apresentam um extenso “arco” extracelular contendo as regiões altamente conservadas da apirase, na metade N-terminal. O peso molecular dessas enzimas glicosiladas é da ordem de 70 a 80kDa (GODING, 2000). Essas enzimas podem existir na forma de complexos homo-oligômeros ou até de dímeros ou tetrâmeros, de forma que esses complexos oligoméricos revelam um aumento da atividade catalítica (LEWIS *et al.*, 1998).

Apesar de todas essas semelhanças, cada uma dessas enzimas apresenta características específicas com relação à especificidade ao substrato e para isso essas enzimas têm sido diferenciadas pela razão de hidrólise ATPase/ADPase. Dessa forma, a **NTPDase 1** (CD39 ou ecto-apirase ou ecto-ATP difosfohidrolase) hidrolisa igualmente bem ATP e ADP, com razão de hidrólise de 1:1; a **NTPDase 2** (CD39L1 ou ecto-ATPase) com grande preferência pelo

ATP, com razão de hidrólise até 30:1; e a **NTPDase 3** (CD39L3 ou HB6), que hidrolisa preferencialmente três vezes mais nucleotídeos trifosfatos em relação aos difosfatos, com razão de hidrólise 3:1 (ZIMMERMANN, 1999; ZIMMERMANN, 2001).

Uma última enzima pertencente à família das E-NTPDases associadas à membrana foi recentemente clonada em camundongo e caracterizada por BIGONNESSE *et al.* (2004). A **NTPDase 8** apresenta porções com alta homologia com as NTPDases 1, 2 e 3, e pouca homologia com as intracelulares. Também apresenta dois domínios transmembranares próximos às porções N-terminal e C-terminal, alto nível de glicosilação e sítio catalítico voltado para o meio extracelular. A diferença é que a razão de hidrólise ATPase/ADPase nesta enzima é de 2:1.

Apesar da diferenciação das E-NTPDases de membrana serem baseadas na razão de hidrólise ATP:ADP, conforme proposto por ZIMMERMANN (2001), recentemente, ROBSON *et al.* (2006), propuseram uma diferenciação não tão arbitrária, baseada nas propriedades catalíticas (como velocidade de reação) dessas enzimas frente aos nucleotídeos trifosfatos e difosfatos. Desta forma, embora ainda existam muitos trabalhos que associem o tipo de NTPDase envolvida à razão de hidrólise, cada vez mais outros parâmetros têm sido buscados na tentativa de precisar a(s) específica(s) ecto-enzima(s) associada(s) a determinado processo biológico.

- Enzimas associadas ao meio intracelular:

As NTPDases 4, 5, 6 e 7 são enzimas que estão presentes em organelas intracelulares, podendo estar acopladas ao aparelho de Golgi, retículo endoplasmático ou vacúolos lisossomais, e com seu sítio catalítico voltado para a luz dessas organelas. A **NTPDase 4**

(UDPase) apresenta estrutura muito similar às já citadas NTPDases 1, 2 e 3, no entanto com localização completamente diferente, podendo estar acoplada ao aparelho de Golgi e ao vacúolo autofágico lisossomal (WANG & GUIDOTTI, 1998; BIEDERBICK *et al.*, 1999), com alta atividade para o substrato UDP. A **NTPDase 7** (LALP1) também está localizada em vesículas lisossomais, hidrolisando preferencialmente nucleotídeos de uracila, guanina e citosina trifosfatos, respectivamente (SHI *et al.*, 2001).

A **NTPDases 5** (CD39L4) e a **NTPDase 6** (CD39L2) estão presentes no retículo endoplasmático e aparelho de Golgi, no entanto, elas também podem ser encontradas associadas à membrana plasmática por um único domínio transmembranar (porção amino-terminal), uma vez que perderam a porção carboxi-terminal durante o processo evolutivo. Este fato permite que estas enzimas possam ser clivadas por enzimas proteolíticas e liberadas para o meio extracelular, tornando-se proteínas ativas na forma solúvel (MULERO *et al.*, 1999; BRAUN *et al.*, 2000). Estas enzimas hidrolisam preferencialmente nucleotídeos difosfatos aos trifosfatos.

1.1.2 - Ecto-5'-Nucleotidase (5'-NT)

Uma vez hidrolisados os nucleotídeos de adenina (ATP ou ADP) pelas enzimas descritas anteriormente, o produto final ou AMP é hidrolisado e sofre a ação de uma única enzima, a ecto-5'-nucleotidase (CD73 ou EC 3.1.3.5), até a formação do nucleosídeo de adenosina. Trata-se de uma enzima ancorada na membrana plasmática por glicosilfosfatidilinositol (GPI) e encontrada na maioria dos tecidos. É também conhecida como CD73 (proteína de superfície de linfócitos) por representar um marcador de maturação de linfócitos B e T e adesão celular (AIRAS *et al.*, 1997). Esta enzima apresenta massa molecular de 62 a 74 kDa e pode ocorrer na forma de dímeros (KNOFEL & STRATER, 1999). Ao contrário das NTPDases sua atividade enzimática não depende de cátions divalentes, mas pode ser

aumentada pela adição de concentrações milimolares de Mg^{2+} em pH alcalino (ZIMMERMANN, 1992). Pode ser inibida pelo análogo do nucleotídeo, adenosina 5'- (α , β -metileno) difosfato (AMPCP), segundo NAITO & LOWENSTEIN (1985). Como citado anteriormente, esta enzima catalisa o passo final da degradação de nucleotídeos pelas ectonucleotidases, sendo provavelmente a maior responsável pela formação de nucleosídeo extracelular (adenosina) proveniente de AMP, com conseqüente ativação dos receptores purinérgicos (P1) específicos de adenosina (ZIMMERMANN, 2001).

No coração, BOWDITCH *et al.* (1985) demonstraram que cardiomiócitos de rato hidrolisam ATP, ADP e AMP extracelularmente e, posteriormente, MEGHJI *et al.* (1992) mostraram que estas células apresentam intensa atividade da 5'-NT, resultando em um acúmulo significativo de adenosina no meio extracelular. ZINCHUK *et al.* (1999 e 2002) confirmaram esses achados em coração de rato, através da combinação das técnicas bioquímicas e histocitoquímicas, identificando e caracterizando a presença de uma ecto-ATPase.

Diante da caracterização das ectonucleotidases, a Figura 1 ilustra a localização das enzimas das famílias das E-NTPDases, E-NPPs, Fosfatase Alcalina e Ecto-5'-Nucleotidase, bem como o sítio de ancoragem na membrana, no caso das associadas à membrana plasmática.

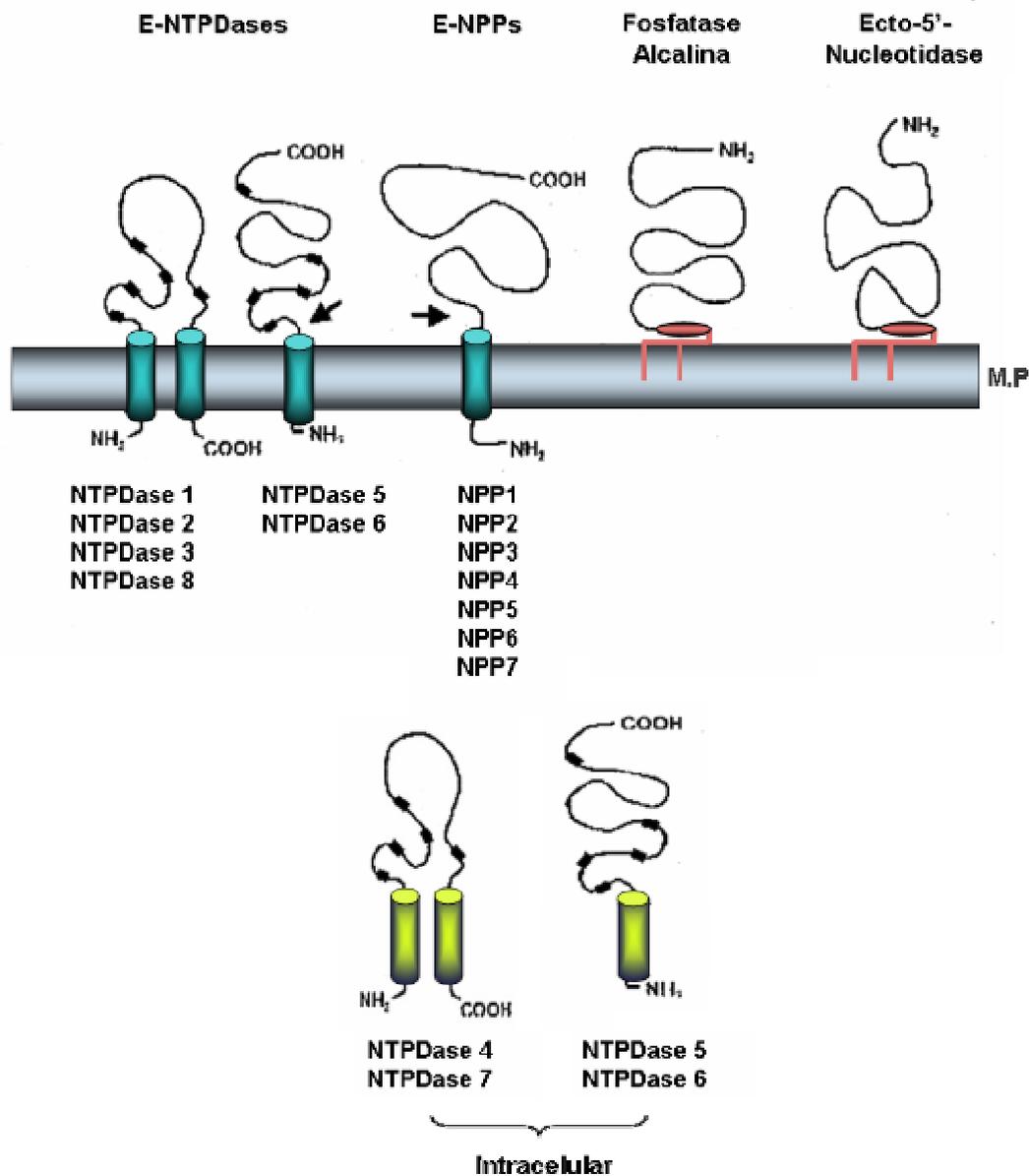


Figura 1 – Figura representativa das principais ectonucleotidasas. As NTPDases 1, 2, 3 e 8 (ancoradas por dois domínios transmembranares – N-terminal e C-terminal); as NPPs 1-7 (ancoradas por um único domínio transmembranar – N-terminal); a Fosfatase Alcalina (ancorada por glicosilfosfatidilinositol – GPI) e a 5'-Nucleotidase (ancorada por GPI) são enzimas típicas de membrana e diferenciam-se pela ancoragem na membrana plasmática (M.P) e também pela preferência ao substrato. NTPDases 4 e 7 estão presentes exclusivamente no meio intracelular. NTPDases 5 e 6 podem estar ancoradas à membrana plasmática (pela porção N-terminal) ou também estar presentes intracelularmente. As setas representam regiões onde ocorre a clivagem, próximo à porção N-terminal, liberando a forma solúvel ativa destas proteínas (NTPDase 5 e 6; NPPs) Os retângulos em negrito representam as cinco regiões conservadas das apirases. Figura retirada e modificada de ZIMMERMANN (2001) e atualizada a partir de STEFAN *et al.* (2005) e ROBSON *et al.* (2006).

Em resumo, como foi descrito até aqui, os processos bioquímicos envolvidos na desfosforilação dos nucleotídeos de adenosina pela via das ectonucleotidases, gerando como produto final a adenosina, estão bem estabelecidos. Resta agora uma análise do papel funcional destes nucleotídeos e nucleosídeos formados pela hidrólise mediada por essas várias enzimas nos diferentes órgãos e sistemas, sob condições fisiológicas e/ou patológicas.

1.2 – Ações Biológicas dos Nucleotídeos Extracelulares de Adenina (ATP, ADP e AMP) e da Adenosina

O ATP citoplasmático, na maioria das células, encontra-se em concentrações acima de 5mM, chegando até 10mM em células musculares (VASSORT, 2001), sendo que quantidades significativas podem ser liberadas sem nenhuma perda morfofuncional da célula. Portanto, as concentrações de ATP ou ADP extracelulares podem alcançar níveis biologicamente ativos, ou seja, concentrações nanomolares ou micromolares. Sem dúvida, essas concentrações de nucleotídeos irão ter diferentes papéis funcionais, dependendo do tipo celular em questão. O mecanismo pelo qual o ATP é transportado através da membrana celular ainda não é totalmente claro, uma vez que a permeabilidade da membrana ao ATP é muito baixa e o tamanho da molécula de ATP é considerável. Porém, diversos pesquisadores da área têm descrito mecanismos fisiológicos e/ou fisiopatológicos através dos quais o ATP é liberado para o meio extracelular, dentre eles tem-se o estresse mecânico (BODIN *et al.*, 1991; UOZUMI *et al.*, 1998), a morte celular (WATERHOUSE, 2003), o volume celular alterado (SABIROV *et al.*, 2001), condições de hipóxia ou isquemia (BORST & SCHRADER, 1991; KUZMIN *et al.*, 1998; NINOMIYA *et al.*, 2002) e o aumento de fluxo sanguíneo (VIALS & BURNSTOCK, 1996). Em relação ao sistema cardiovascular, alguns tipos celulares liberam

ATP para o meio extracelular como, por exemplo, plaquetas ativadas, eritrócitos, células musculares lisas, miócitos isquêmicos e células endoteliais durante hipóxia e estresse mecânico e químico (BODIN *et al.*, 1991; VASSORT, 2001). Ainda, o ATP pode ser liberado de vesículas de terminações nervosas simpáticas, juntamente com a noradrenalina (KENNEDY, 1996).

A via das ectonucleotidases parece ser a principal via que contribui para a formação e manutenção dos níveis de adenosina extracelular (SEBASTIÃO *et al.*, 1999). Além disso, a adenosina pode ainda ser reutilizada no processo de síntese dos nucleotídeos das bases púricas gerando mais ATP ao ser recaptada para o interior da célula por transportadores de nucleosídeos (YEGUTKIN *et al.*, 2001).

Sendo assim, a concentração local destes nucleotídeos dependerá da quantidade liberada pelas células, do efeito de diluição no espaço extracelular e da capacidade das enzimas em degradá-los, especialmente as ectonucleotidases presentes nas próprias células ou em células adjacentes (GORDON, 1986). BORST & SCHRADER (1991), utilizando o sistema de coração isolado, Langendorff, encontraram em coronárias concentrações basais de ATP próximas de 1nM, o que reflete a rápida degradação do ATP em adenosina durante a passagem neste leito vascular. Ao ser liberado para o meio extracelular o ATP e/ou ADP podem desempenhar diversas funções, como por exemplo: adesão celular (PLESNER, 1995), agregação plaquetária e respostas vasomotoras (RONGEN *et al.*, 1997), liberação de fatores relaxantes do endotélio, defesa imune, apoptose, crescimento e proliferação celular, controle do transporte de água e íons no epitélio, dentre outros (NOVAK, 2003). Essas ações mediadas pelos nucleotídeos extracelulares são realizadas através da interação dessas moléculas com os vários membros de receptores do tipo purinérgico – P2. Estes são receptores de membrana e podem ser divididos em 2 tipos: os do tipo ionotrópicos, P2X, com 2 domínios transmembranares e com grande “alça” extracelular, relacionados à formação de canais para

passagem de íons e, os do tipo metabotrópicos, P2Y, que atravessam 7 vezes a membrana das células e estão acoplados à proteína G. Até o momento já foram caracterizados e clonados 7 subtipos de receptores do tipo P2X (P2X₁₋₇) (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998) e 8 subtipos de receptores do tipo P2Y (P2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13 e 14}) (DI VIRGILIO & SOLINI, 2002; ABBRACCHIO *et al.*, 2003) sendo os dois tipos (P2X e P2Y) amplamente distribuídos nos diversos tecidos. No coração, o RNAm para estes dois tipos de receptores já foi identificado (VASSORT, 2001; WEBB *et al.*, 1996). A ação fisiológica da sinalização purinérgica (via receptores P2X, P2Y e P1) foi recentemente revisada por BURNSTOCK (2006).

Os nucleotídeos de adenina, além de exercerem seus efeitos extracelulares, podem ser rapidamente hidrolisados pelo complexo sistema das ectonucleotidasas (E-NTPDases, ecto-5'-nucleotidase e formas solúveis dessas enzimas), convertendo ATP em adenosina, que por sua vez pode se ligar especificamente a receptores purinérgicos do tipo P1 (A1, A2a, A2b e A3), também com 7 domínios transmembranares e acoplados à proteína G (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998).

Uma vez os receptores do tipo P2X sendo ativados (por concentrações micromolares de ATP), abrem-se canais de cátions não seletivos, o que irá desencadear diferentes mecanismos de sinalização intracelular. É provável que as ações citotóxicas do ATP, quando em altas concentrações, da ordem de mM, sejam mediadas especificamente pelo subtipo P2X₇ (DI VIRGILIO, 1995).

Quanto aos receptores metabotrópicos P2Y, uns são ativados principalmente por nucleotídeos de adenina (ATP ou ADP), outros por nucleotídeos de uracila (UTP ou UDP) e outros por ambos. Quando ativados, os P2Y desencadeiam as vias de sinalização relacionadas à via da fosfolipase C (incluindo PKC), da fosfolipase A₂ (PLA₂), da fosfolipase D (PLD) e proteínas quinases ativadoras de mitógenos (MAPK) (VASSORT, 2001; NOVAK, 2003).

No coração, as ações do ATP renderam uma série de estudos. Inicialmente foram observados efeitos inotrópicos negativos (redução da força de contração), sendo esses efeitos atribuídos à ativação do receptor A1 de adenosina, depois do ATP sofrer hidrólise, e não à molécula de ATP propriamente dita (OLSSON & PEARSON, 1990). Porém, estudos posteriores mostraram efeitos inotrópicos positivos do ATP, os quais possivelmente mediados pelo receptor P2X (FROLDI *et al.*, 1997). Ainda, FROLDI *et al.* (1994) demonstraram em átrio esquerdo de ratos um efeito duplo do ATP, observando primeiro o efeito positivo e depois o negativo. De forma similar, o ATP também pode ter efeitos cronotrópicos (frequência cardíaca) positivos e negativos (relacionados com a degradação do ATP em adenosina), sendo que em doses baixas o ATP causa taquicardia e em altas doses leva à diminuição da frequência cardíaca e a um bloqueio da condução do nodo atrioventricular, podendo levar à arritmia cardíaca (VASSORT, 2001).

Em células musculares lisas o ATP age via receptores P2X que, por estarem associados a canais de cátions (principalmente canais seletivos a Ca^{2+}), provocam, quando ativados, uma corrente de íons para o interior da célula, despolarizando-a e promovendo a sua contração (KENNEDY & LEFF, 1995). Esta associação com canais de Ca^{2+} levou alguns pesquisadores a acreditar que os receptores P2X estivessem confinados a células excitáveis, mediando ações vasoconstritoras (KENNEDY & LEFF, 1995; NOVAK, 2003). Neste sentido, RONGEN *et al.* (1997) sugeriram que o ATP agia via P2X nas células musculares lisas para induzir vasoconstrição, enquanto que nas células endoteliais a estimulação via P2Y promovia a liberação de fatores relaxantes do endotélio (como, por exemplo, óxido nítrico) causando vasodilatação. Esse duplo efeito do ATP pode ter importância fisiopatológica por induzir espasmos no vaso nos locais onde a função endotelial encontra-se prejudicada, havendo a formação de trombos. Esses achados foram ainda confirmados por BUCKWALTER *et al.* (2004), os quais mostraram que a vasoconstrição do músculo

esquelético submetido ao exercício físico foi mediada pelo receptor P2X. Recentemente LIU *et al.* (2004) demonstraram ainda que o ATP age nos dois receptores purinérgicos (P2Y e P2X), facilitando a vasodilatação em artérias mesentéricas de ratos e que as ectonucleotidases intensificam este efeito pela degradação de ATP na superfície das células endoteliais.

Em paralelo às funções já descritas do ATP no sistema cardiovascular, merece destaque o grande papel da molécula de ADP como indutora da agregação plaquetária. O AMP, por sua vez, apresenta papel antagônico, tratando-se de um agente anti-agregador plaquetário e de extrema importância como substrato para formação da adenosina.

Com relação aos receptores de adenosina, estes apresentam uma grande contribuição nos efeitos protetores contra isquemia e hipóxia no miocárdio (LIANG & JACOBSON, 1998; ZHAO *et al.*, 2000). O efeito vasodilatador provocado pela adenosina está tradicionalmente relacionado à ativação do receptor A2b. Como exemplo de ações provocadas pelos diversos tipos de receptores, quando ligados à adenosina, temos que: - o receptor A1 antagoniza a abertura de canais de Ca^{2+} e atenua a estimulação adrenoceptora, tem efeitos protetores no cardiomiócito, além de inibir a liberação de catecolaminas; - o receptor A2a medeia ações vasodilatadoras, inibe agregação plaquetária e inibe a produção de citocinas; - o receptor A2b também medeia ações vasodilatadoras além de inibir o crescimento e função de células mesenquimais como fibroblastos, além de estimular a proliferação de células endoteliais e; - o receptor A3 tem efeitos protetores no cardiomiócito (VILLARREAL *et al.*, 2003). Todos esses receptores ativam a via da PKC e MAPK.

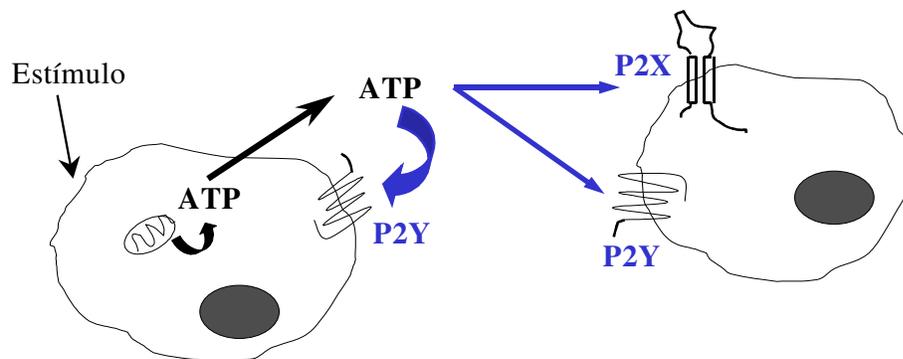
Ao contrário dos outros receptores de adenosina, o receptor A3 pode mediar um efeito bifásico, tornando-o um receptor atípico, onde em concentrações nanomolares resulta na

proteção celular, enquanto que em concentrações micromolares leva à indução de morte celular ou apoptose (JACOBSON *et al.*, 1999).

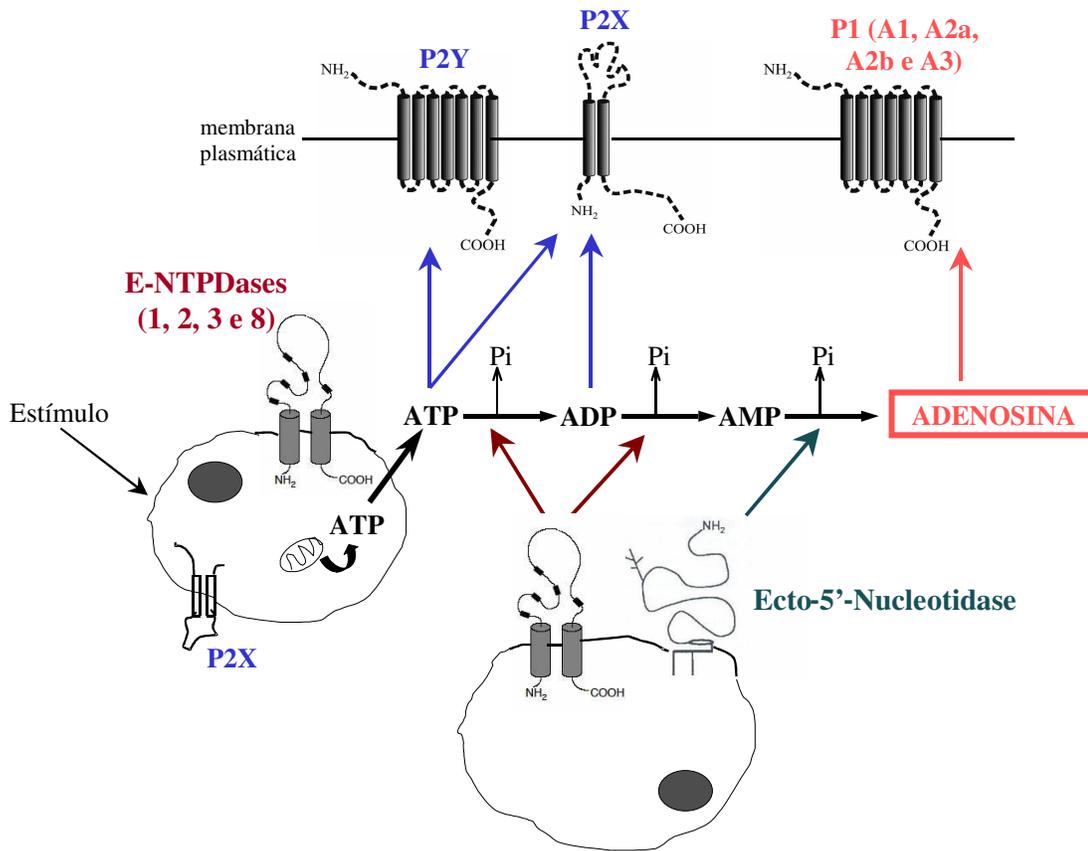
RONGEN *et al.* (1997) mostraram que a formação de adenosina é aumentada durante o processo de isquemia, causando vasodilatação via ações dependentes e independentes do endotélio, além de inibir a liberação de noradrenalina dos nervos simpáticos e ter importante efeito anti-arrítmico (MARSHALL, 2000). Em virtude das ações descritas até o momento, a adenosina tem tido na clínica uma importante aplicação terapêutica no tratamento de isquemia e outras disfunções circulatórias. No entanto, quando em altas concentrações, a adenosina pode também levar a efeitos antagônicos, com ação pró-arrítmica, podendo originar a pausa ou o bloqueio do nodo sino-atrial e átrio-ventricular (MUBAGWA & FLAMENG, 2001).

Diante do exposto, a Figura 2 (A, B e C), a seguir, ilustra um esquema representativo das diferentes vias envolvidas na cascata de hidrólise dos nucleotídeos, até à formação da adenosina, bem como dos receptores responsáveis pelas ações fisiológicas deflagradas pelos mesmos.

A



B



C

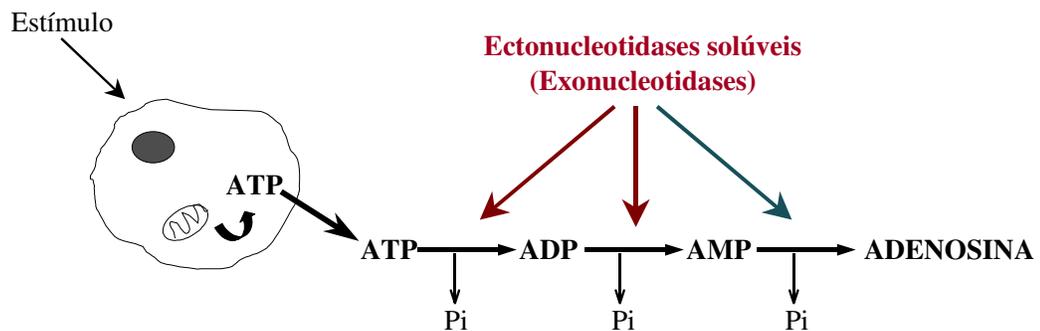


Figura 2 – Esquema representativo da cascata de hidrólise dos nucleotídeos extracelulares e suas ações nos receptores. A – Interação do ATP em receptores purinérgicos do tipo P2X e P2Y, ação parácrina e autócrina do ATP nos receptores. B – Ação das ectonucleotidasas (E-NTPDases 1, 2, 3 e 8, e Ecto-5'-Nucleotidase) nos nucleotídeos extracelulares (ATP, ADP e AMP) até a formação do nucleosídeo adenosina e, interação dos nucleotídeos/nucleosídeo formados com seus respectivos receptores (P2X, P2Y, A1, A2a, A2b e A3). C – Hidrólise dos nucleotídeos extracelulares até a formação de adenosina por ação de ectonucleotidasas solúveis.

1.3 – Tecido Cardíaco

O coração é um órgão muscular que contrai ritmicamente e tem como função a propulsão do sangue. Esta força propulsora é de extrema importância para que as trocas de gases, nutrientes, hormônios, resíduos metabólicos e anticorpos possam atingir todas as células do nosso organismo. Desta forma, ficam asseguradas e preservadas todas as funções vitais do indivíduo. Morfologicamente, o coração é dividido em dois átrios e dois ventrículos, sendo sua parede constituída basicamente por três partes: a mais externa ou epicárdio (lâmina visceral do pericárdio seroso), a intermediária, ou miocárdio propriamente dito, e a mais interna ou endocárdio.

As células mais freqüentemente encontradas no tecido cardíaco são os fibroblastos (principais células do tecido conjuntivo e as responsáveis pela produção e degradação de colágeno e elastina). Os fibroblastos correspondem a $2/3$ das células cardíacas, apesar de em termos de volume celular, não serem tão significativas como os cardiomiócitos, os quais representam o $1/3$ restante (WEBER & BRILLA, 1991). Estas últimas são células musculares auto-excitáveis, e, portanto, capazes de gerar potenciais de ação, com características de automaticidade. Além destas, que correspondem às principais, outros tipos celulares são também encontrados no tecido cardíaco, como macrófagos e mastócitos, que constituem o sistema de defesa do coração, além de células endoteliais e musculares lisas dos vasos que se apresentam em número desprezível.

Sob alguns estímulos, os cardiomiócitos podem vir a sofrer intenso aumento de tamanho (hipertrofia), enquanto que os fibroblastos podem se dividir continuamente (hiperplasia), podendo caracterizar um aumento do coração ou uma hipertrofia cardíaca. Um dos fatores que pode levar à hipertrofia cardíaca é a sobrecarga de volume e/ou de pressão imposta ao coração. Entretanto, uma dissociação entre a elevação da pressão arterial e o aumento da massa miocárdica já foi demonstrada inúmeras vezes em animais e humanos com

hipertrofia cardíaca hipertensiva (SASAYAMA *et al.*, 1976). Neste sentido, esta dissociação sugere a existência de outros estímulos, que não somente a pressão arterial, responsáveis pelo desenvolvimento e regressão da hipertrofia cardíaca. Durante as últimas décadas, muitos estímulos hormonais e neurais têm sido relacionados ao crescimento do músculo cardíaco, incluindo agonistas beta e alfa-adrenérgicos, o sistema renina-angiotensina, representado pela angiotensina II e os hormônios tiroideanos.

1.4 – Hormônio Tiroideano (HT)

A glândula tireóide é responsável pela produção de **tiroxina** (tetraiodotironina ou **T4**) e de **triiodotironina** (**T3**), os quais promovem uma variedade de efeitos regulando o desenvolvimento, crescimento e o metabolismo do organismo em geral. O hormônio T4 é o mais abundante, constituindo 93% do hormônio tiroideano circulante, embora o T3 atue mais rapidamente e seja mais potente. Assim, o pró-hormônio T4 (como habitualmente conhecido) é convertido em T3 nos tecidos, pela ação das enzimas 5'-desiodases que são determinantes para as concentrações de T3 encontradas nos tecidos (KÖHRLE, 2000). Existem 3 isoformas de desiodases: a do tipo 1 (D1), a do tipo 2 (D2) e a do tipo 3 (D3), sendo que suas atividades estão diretamente susceptíveis a alterações hormonais. Acredita-se que a D1 tenha papel principal na manutenção dos níveis circulantes de T3, enquanto que a D2 apresente um importante papel na produção local de T3, regulando a sua concentração no meio intracelular (BIANCO *et al.*, 2002). Embora muitos tecidos dependam do T3 proveniente da circulação, a conversão local de T4 para T3 em tecidos que expressam a D2, é uma importante fonte intracelular do hormônio em sua forma ativa. De maneira geral, as desiodases são pouco

expressas no coração (WAGNER *et al.*, 2003), sendo a D2 a preferencialmente encontrada nesse órgão (WAGNER *et al.*, 2003; BIANCO *et al.*, 2002).

As ações do hormônio tiroideano são primariamente resultado da sua interação com receptores nucleares de T3 – os TRs – que podem ser de 2 tipos: os TR α (TR α 1 e TR α 2) e os TR β (TR β 1, TR β 2 e TR β 3), sendo que o TR α 1 corresponde à isoforma predominantemente encontrada no coração (cerca de 70%) e por isso a maior responsável pelas alterações provocadas pelo hormônio neste tecido (HARVEY & WILLIAMS, 2002). Embora a ação clássica do T3 ocorra após a ligação aos receptores nucleares, recentemente foram descritas ações que independem da chegada do hormônio ao núcleo da célula, ditas, portanto, não-genômicas (DAVIS & DAVIS, 2002). Estas foram identificadas após a observação de efeitos muito rápidos, da ordem de 10 a 15 minutos, promovidos pelos hormônios tiroideanos, os quais não poderiam ser explicados por alterações transcricionais e/ou traducionais, já que estas demandam períodos bem mais longos.

No sistema cardiovascular, os hormônios tiroideanos desencadeiam uma série de efeitos, tanto pela sua ação diretamente no miocárdio, como indiretamente, pela interação com o sistema nervoso simpático ou demais sistemas humorais, promovendo mudanças na função cardíaca em virtude de alterações dos parâmetros hemodinâmicos (BASSET *et al.*, 2001; HU *et al.*, 2003). Entre os principais efeitos hemodinâmicos promovidos pelo HT no sistema cardiovascular tem-se a diminuição da resistência vascular periférica, como resposta ao relaxamento induzido pelo hormônio em células musculares lisas, além do aumento da frequência cardíaca (taquicardia), do aumento da força de contração e do débito cardíaco (KLEIN & OJAMAA, 2001).

Como exemplo dos efeitos dos HT diretamente sobre as células musculares cardíacas, tem-se que vários genes cardíacos são responsivos à ação dos HT, resultando, na maioria das vezes, em aumento transcricional e paralelo aumento da síntese de proteínas estruturais,

transportadoras e outras. Assim, o T3 age diretamente no gene da miosina de cadeia pesada (α -MHC), uma proteína responsável pelo aumento da velocidade de contração nos músculos esquelético e cardíaco; no gene da Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático (SERCA), importante por mobilizar cálcio no interior da célula; no gene da fosfolambam, o qual regula a SERCA, entre muitos outros (DILLMANN, 2002).

Além das clássicas ações dos hormônios tiroideanos já citadas anteriormente, a hidrólise de nucleotídeos de adenina pelas ecto-enzimas também sofre uma grande influência deste hormônio, em condições de elevação ou diminuição de seus níveis (hiper ou hipotiroidismo). Neste sentido, alguns trabalhos de nosso grupo têm mostrado que os hormônios tiroideanos (T3 e T4) podem influenciar diretamente a atividade enzimática e/ou a expressão gênica destas ectonucleotidases em diferentes modelos experimentais. Neste sentido, MATOS *et al.* (2002) demonstraram o efeito inibitório *in vitro* do T3 e do T4 nas atividades ADPásica e ATPásica em sinaptossomas de rato, sem que houvesse alteração, no entanto, na atividade AMPásica. Por outro lado, WINK *et al.* (2003) demonstraram uma maior atividade da 5'-NT em culturas de células de glioma de rato (C6), em adição ao aumento do RNAm dessa enzima, mostrando que o HT modula a expressão gênica além de modular a velocidade da enzima. É curioso observar que, paralelamente aos resultados frente a situações de hipertiroidismo, houve no hipocampo e no córtex cerebral de ratos induzidos ao hipotiroidismo experimental (durante 2 semanas) um aumento da hidrólise de ATP, ADP e AMP, acompanhada por aumento da expressão gênica da NTPDase 1 e da 5'-nucleotidase, sendo esta hidrólise revertida após a administração de T4 (BRUNO *et al.*, 2005).

No que se refere a modelos experimentais intimamente relacionados ao sistema cardiovascular, dados obtidos recentemente em nosso laboratório demonstraram que o T3

estimula a atividade e a expressão gênica da enzima 5'-NT em culturas primárias de cardiomiócitos (CARNEIRO-RAMOS *et al.*, 2004), sugerindo que este efeito pode promover um aumento na formação da adenosina, a qual, como citado anteriormente, apresenta importante papel em condições de isquemia do miocárdio. Além disso, ainda neste tipo celular, outros dados mostraram que o T3 estimula a atividade e a expressão da NTPDase do tipo 3, promovendo um maior aumento da liberação de ADP (BARRETO-CHAVES *et al.*, 2006).

Embora a utilização de culturas celulares represente ainda um bom modelo experimental para avaliar um efeito biológico isoladamente, como, por exemplo, o efeito promovido pelos HT sobre a hidrólise de nucleotídeos, por outro, é importante ter em mente que, principalmente no tecido cardíaco, o efeito parácrino que uma célula apresenta sobre aquela localizada na sua vizinhança é de extrema importância, e nestas condições, torna este modelo de certa maneira limitado. Desta forma, um dos avanços no estudo da fisiologia celular surgiu com a descoberta da possibilidade da quebra das células e separação dos componentes intracelulares em frações subcelulares e, alguns grupos de pesquisa têm buscado avaliar a cinética de diferentes enzimas em frações subcelulares de diversos tecidos, incluindo o tecido cardíaco.

A utilização destas frações, na opinião de alguns autores, poderia representar uma forma alternativa para a avaliação da cinética enzimática do tecido cardíaco como um todo, sem excluir a interação de um tipo celular sobre o outro, e, portanto, um modelo mais real das ações fisiopatológicas. Isto se torna possível uma vez que a técnica de fracionamento celular por meio da centrifugação diferencial (diferindo na densidade, tamanho ou até mesmo na forma das moléculas) apresenta-se muito peculiar, pelo fato de proporcionar uma análise bioquímica dos componentes celulares numa forma ainda preservada, ativa e funcional além

de proporcionar o conhecimento da distribuição intracelular de uma determinada enzima ou mesmo função celular (LODISH *et al.*, 2002).

Assim, vários estudos têm se utilizado desse modelo experimental e demonstrado, em frações subcelulares do tecido cardíaco, a presença de enzimas importantes, inclusive as mencionadas anteriormente, as enzimas da família das E-NTPDases (VALENZUELA *et al.*, 1989; CALDWELL *et al.*, 1997; ALLEVA *et al.*, 2002).

2 – OBJETIVOS

Com base no exposto anteriormente e ainda considerando: - os efeitos fisiológicos dos nucleotídeos de adenina e do nucleosídeo adenosina no coração; - a existência de receptores de T3 de alta afinidade nas diferentes células cardíacas (YEN, 2001) e; - a ação do hormônio na regulação da atividade e expressão de ectonucleotidases em vários tipos celulares, incluindo miócitos e fibroblastos cardíacos, este estudo tem como objetivos:

1 – Estabelecer e padronizar a técnica de isolamento de frações solúveis e microsossomais de tecido cardíaco;

2 – Padronizar as condições ideais para a posterior avaliação da hidrólise dos nucleotídeos (ATP, ADP e AMP);

3 – Avaliar o efeito de alterações do estado tiroideo, sobre a atividade ectonucleotidásica em frações isoladas (microsossomais e solúveis) de tecido cardíaco de ratos adultos induzidos ao hipertiroidismo e ao hipotiroidismo experimental.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Animais

Foram utilizados ratos machos adultos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, pesando entre 200 e 300g, com no máximo 95 dias, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas – USP e mantidos ao longo do período experimental no Biotério do Departamento de Anatomia (ICB-USP). Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas e mantidos em sala climatizada com temperatura controlada (24°C) e ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais tiveram livre acesso à água e ração (NUVILAB).

Os procedimentos foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do ICB-USP (protocolo registrado sob nº 118), de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- **Grupo Controle ou Eutiroideo:** animais sem tratamento, apenas submetidos a injeções intraperitoneais de solução salina (NaCl) a 0,9%, durante 14 dias;
- **Grupo Hipertiroideo T4-10:** animais induzidos ao hipertiroidismo com uma dose de 10µg de Tiroxina (T4)/100g de peso corpóreo/dia, durante 14 dias;
- **Grupo Hipertiroideo T4-25:** animais induzidos ao hipertiroidismo com uma dose de 25µg de T4/100g de peso corpóreo/dia, durante 14 dias;
- **Grupo Hipertiroideo T4-50:** animais induzidos ao hipertiroidismo com uma dose de 50µg de T4/100g de peso corpóreo/dia, durante 14 dias;
- **Grupo Hipertiroideo T3-10:** animais induzidos ao hipertiroidismo com uma dose de 3,5µg de Triiodotironina (T3)/100g de peso corpóreo/dia, durante 14 dias;
- **Grupo Hipotiroideo:** animais tireoidectomizados e tratados com 0,05% de metimazol e 4,5mM de CaCl₂, adicionados à água de beber durante 14 dias;

- **Grupo Hipotiroideo + Reposição de T4-10:** animais tireoidectomizados e tratados com 0,05% de metimazol e 4,5mM de CaCl₂, adicionados à água de beber durante 14 dias e, posteriormente tratados com dose de 10µg de T4/100g de peso corpóreo/dia por igual período.

Os grupos hipertiroideos citados acima (T4-10, T4-25, T4-50 e T3-10) receberam essa denominação devido às doses de hormônio (T4 ou T3) injetadas corresponderem respectivamente a 10, 25, 50 e 10 vezes a dose fisiológica, normalmente encontrada no animal. Estas doses, bem como os protocolos adotados, foram realizadas com base em estudos prévios da literatura (TROST *et al.*, 2000; PANTOS *et al.*, 2002; HU *et al.*, 2003; GIANNOCCO *et al.*, 2004; BRUNO *et al.*, 2005).

3.2 – Protocolos Experimentais

3.2.1 - Indução ao Hipertiroidismo

Os animais foram induzidos ao hipertiroidismo experimental ao longo de 14 dias, por injeções intraperitoneais diárias de T4 (L-Thyroxine – SIGMA) ou T3 (Triiodo-L-Thyronine – SIGMA), de acordo com o grupo estudado, nas diferentes doses já citadas (item 3.1) e foram decapitados 24 horas após a última injeção hormonal. As injeções de T4 foram realizadas no período da manhã e sempre no mesmo horário. As injeções de T3 foram realizadas em dois períodos (manhã e tarde), também sempre nos mesmos horários. Neste caso, este procedimento foi adotado uma vez que o T3 é bastante instável, apresentando curta meia-vida e, portanto, rapidamente degradado e metabolizado. Assim, isto impede que haja um pico na concentração plasmática do hormônio apenas naquele horário da injeção.

O T4 e o T3 foram previamente diluídos em solução de NaOH 0,04M (SIGMA), seu volume completado com água destilada e estocado no congelador a -20°C. Quando necessário, no momento da injeção, o T4 e o T3 foram injetados utilizando como veículo solução salina a 0,9%.

3.2.2 - Indução ao Hipotiroidismo

Inicialmente os animais foram anestesiados com um coquetel de Acepran 1% (Acepromazina – UNIVET, concentração final de 1mg/mL), Rompun (Xilazina – BAYER, concentração final de 5mg/mL) e Dopalen (Ketamina – VETBRANDS, concentração final de 25mg/mL). Depois de anestesiados, realizou-se a assepsia, tricotomia e, em seguida, uma incisão na região cervical para expor a porção anterior da traquéia até a total visualização da glândula tireóide. Após a retirada da glândula (tireoidectomia), os animais foram suturados e a partir daí começaram a receber na água de beber 0,05% de metimazol (SIGMA), droga capaz de destruir células tiroideanas remanescentes, garantindo, então, a não produção de hormônio tiroideano pelos animais. Além disso, adicionou-se também à água de beber 4,5mM de cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – SIGMA) para a reposição de cálcio provocada pela possível retirada das glândulas paratireóides juntamente com a tireóide (GIANNOCCO *et al.*, 2004). Os animais hipotiroideos (hipo) também foram tratados durante 2 semanas e decapitados no 15º dia após a cirurgia.

3.2.3 - Hipotiroidismo com Reposição Hormonal

Neste grupo os animais foram inicialmente induzidos ao hipotiroidismo durante 2 semanas, conforme procedimento já citado anteriormente (item 3.2.2) e passaram a receber, a partir do 15º dia, uma reposição de hormônio tiroideano, no caso tiroxina (T4), durante mais 14 dias. A reposição hormonal foi feita com injeções intraperitoneais diárias, numa dose de 10µg de T4/100g de peso corpóreo/dia e os animais foram decapitados 24 horas após receberem a última injeção de T4.

3.3 – Avaliação do Peso Ventricular Cardíaco, do Peso Corporal, do Consumo de Água e de Ração

Considerando a ação trófica que os hormônios tiroideanos apresentam sobre o tecido cardíaco, foi avaliado o peso ventricular nos animais dos diferentes grupos experimentais. A hipertrofia ou atrofia cardíaca promovida pelo excesso ou falta dos hormônios tiroideanos foi avaliada nos grupos hipertiroideos e hipotiroideos pela relação peso ventricular (ventrículo direito + ventrículo esquerdo)/peso corpóreo, dada em mg/g de tecido. Assim, após a decapitação dos animais, os corações foram rapidamente retirados, dissecados para a retirada dos átrios e pesados.

Os parâmetros referentes ao peso corporal, consumo de água e de ração dos animais dos diferentes grupos experimentais foram acompanhados ao longo do desenvolvimento de todos os protocolos.

3.4 – Avaliação dos Parâmetros Hemodinâmicos

Durante o desenvolvimento dos protocolos experimentais foram aferidas a pressão arterial sistólica (PAS), em milímetros de mercúrio (mmHg) e a frequência cardíaca (FC), em batimentos por minuto (bpm) nos animais dos diferentes grupos, utilizando um método indireto de pletismografia de cauda. O aparelho de pressão (PE-300 – KENT SCIENTIFIC) conectado a um fisiógrafo (MK III-WINDAQ) consiste de um manguito de borracha que é adaptado à região proximal da cauda e ligado ao esfigmomanômetro para insuflar e desinsuflar gradualmente o manguito. Próximo ao manguito é acoplado um transdutor de pulso (sensor) que irá captar os sinais a serem enviados e registrados em computador para posteriormente serem analisados por software apropriado (Dataq[®]).

Antes do início das aferições, os animais foram previamente aquecidos por 5 minutos propiciando uma ligeira dilatação da artéria caudal. Posteriormente, os animais foram

colocados em um sistema de contenção, o qual consiste em um cilindro de acrílico com aberturas para a cauda e focinho. A PAS e a FC foram consideradas como a média de no mínimo cinco medidas. Em todos os animais as últimas medidas da PAS e FC foram obtidas no dia do sacrifício. Todos os animais passaram por um período inicial de adaptação ao sistema de aferição da PAS e FC de no mínimo duas semanas, antes do início das medidas no período experimental. Neste período de adaptação as medidas de PAS e FC foram acompanhadas todos os dias. Esta fase inicial tem como finalidade a total adaptação dos animais às novas condições de manipulação e de contenção na câmara de acrílico, sem que estas interfiram nos resultados obtidos ao longo do tratamento.

3.5 – Dosagens Séricas dos Hormônios Tiroideanos

Após o término dos diferentes protocolos experimentais, os animais foram decapitados, o sangue total coletado e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos, a 4°C (Centrifuge 5417R – EPPENDORF). Após a centrifugação, os soros foram retirados e coletados para as dosagens de T3 e T4 plasmáticos. As dosagens hormonais foram realizadas utilizando um kit comercial de radioimunoensaio (SCHERING AS, Cis Bio International – France, adquirido da REM) e os cálculos realizados segundo instruções do fabricante, sendo que a curva-padrão foi substituída por uma curva específica com o soro de rato.

3.6 – Análise Histológica do Coração

Considerando ser o coração o principal órgão-alvo dos hormônios tiroideanos, os quais agem diretamente sobre o trofismo do músculo cardíaco, uma avaliação da morfologia cardíaca foi realizada.

Uma vez retirados do animal e pesados, os corações foram lavados abundantemente com uma solução tampão de fosfato – PBS 1x (Phosphate Buffer Solution – SIGMA) contendo NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ e água Milli-Q, com pH final ajustado para 7,4.

Após as sucessivas lavagens, os corações (contendo apenas os ventrículos direito e esquerdo) foram transferidos para uma solução de paraformaldeído 10% tamponado (SYNTH) onde permaneceram por no mínimo 24 horas para fixação. Posteriormente, os tecidos foram lavados em água corrente durante 12 horas e então passaram por processo de desidratação com concentrações crescentes de álcool (SYNTH). Utilizou-se álcool 70%, 85%, 95%-I, 95%-II, 100%-I, 100%-II e 100%-III, permanecendo durante 30 minutos em cada uma das concentrações citadas. Após a desidratação, os tecidos foram diafanizados (para clarear, tornar o tecido translúcido e para facilitar a impregnação da parafina) em xilol (SYNTH) durante 30 minutos no xilol-I e xilol-II e, 15 minutos no xilol-III. Depois, os corações passaram por 3 banhos de parafina histológica (SYNTH), a 60 – 65°C durante 1 hora cada. Esses banhos de parafina fazem com que o tecido adquira uma consistência relativamente firme. Feito isso, o tecido foi finalmente incluído em blocos de parafina para posterior realização dos cortes histológicos (cortes transversais semi-seriados) no aparelho micrótomo (HM 320 – MICROM HEIDELBERG), numa espessura de 3µm.

Após obtenção dos cortes, as lâminas foram preparadas e colocadas na estufa durante 24 horas para escorrer a parafina. A partir daí, os cortes foram desparafinizados em 3 banhos de xilol (I, II e III) por 30 minutos e hidratados em álcool 100% (I e II), 95%, 85% e 70% por 2 minutos cada. Após passagem no álcool 70% as lâminas foram lavadas em água destilada por 3 minutos para então coloração dos cortes em hematoxilina (AMRESCO) + eosina (SIGMA) – HE. As lâminas foram imersas por 2 minutos em hematoxilina filtrada e depois de escorrer a hematoxilina, o excesso do corante nas lâminas foi removido com água destilada, onde permaneceram imersas durante 5 minutos. Em seguida as lâminas foram imersas em

eosina por 1 minuto, o corante escorrido e seu excesso novamente retirado com água destilada. As lâminas foram imersas rapidamente em álcool 50% e 70% passando para o álcool 80%, 95% e 100% (I, II e III) por 1 minuto cada, xilol (I e II) por 2 minutos cada e por fim xilol-III por no mínimo 2 minutos, para finalmente colocação da lamínula fixada com entellan (MERCK) na lâmina e posterior análise ao microscópio.

3.7 – Avaliação da Hidrólise dos Nucleotídeos nas Frações Subcelulares Cardíacas

3.7.1 - Preparação das Frações Subcelulares

Após a pesagem dos corações (ventrículos direito e esquerdo), estes foram cortados em aproximadamente seis partes, as quais foram homogeneizadas (Polytron PT 10/35 – KINEMATICA AG) em solução tampão contendo 0,25M de sacarose (SYNTH) e 10mM de Tris (INVITROGEN), em pH 7,4, numa proporção de 1g de coração para 23mL de volume de solução. Esta etapa de homogeneização fez com que as membranas das células fossem rompidas, liberando o conteúdo citoplasmático, que fica em solução. Posteriormente à homogeneização do tecido cardíaco, centrifugou-se o mesmo a uma rotação de 1000 x g, por 10 minutos, a 4°C (SORVALL – RT7). O precipitado (contendo células intactas, fibras de tecido conjuntivo e núcleos) foi descartado e o sobrenadante (contendo organelas) foi coletado, correspondendo à 1ª Fração (S1). Esta fração foi centrifugada a 105.000 x g, por 1 hora, a 4°C (SORVALL – ULTRA Pro 80) e o sobrenadante obtido separado. Este sobrenadante correspondeu à 2ª Fração (S2), a qual representa a fração solúvel (FS). O precipitado foi ressuspensionado (com o auxílio de um Potter e um pistilo) em aproximadamente 1mL de solução tampão contendo 0,25M de sacarose e 10mM de Tris, representando esta a fração microssomal (FM) (FLOREANI *et al.*, 2003).

Durante a homogeneização, e as centrifugações que se seguem, a maioria das organelas mantém sua forma intacta. Entretanto, o retículo endoplasmático se rompe

formando vesículas lisas ou granulares. A FM é composta por um conjunto de vesículas provenientes do retículo endoplasmático rugoso, cuja superfície é abundante em ribossomos, recebendo a denominação de microsossomos e mais especificamente de frações microsossomais (LODISH *et al.*, 2002).

3.7.2 - Ensaio da Atividade Enzimática das Ectonucleotidases, avaliada com base na Hidrólise de ATP, ADP e AMP

Imediatamente após a obtenção das frações solúvel e microsossomal do tecido cardíaco foram iniciados os ensaios enzimáticos utilizando os três diferentes substratos – ATP, ADP e AMP (SIGMA). A hidrólise destes nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP) foi determinada usando o método modificado de YEGUTKIN (1997). O fosfato inorgânico liberado pela hidrólise dos nucleotídeos, resultante da ação das ectonucleotidases, foi estimado pelo método colorimétrico de CHAN *et al.* (1986), com a utilização de NaH_2PO_4 (SIGMA) como fosfato inorgânico padrão (Pi - 300 μ moles/mL). As leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro (Ultrospec[®] 2000, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) utilizando um comprimento de onda de 630 η m.

A concentração de proteína existente em cada uma das amostras foi avaliada nas duas frações através do método colorimétrico de BRADFORD (1976), utilizando albumina bovina sérica (BSA – AMRESCO) como padrão (1mg/mL) e reagente de Bradford (BIOAGENCY). As leituras de proteína foram realizadas no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 595 η m.

Com base nas leituras obtidas nas curvas-padrão de fosfato e proteína foi determinado o Fator de Calibração, fator este, comum a todas as amostras de um mesmo experimento e que foi utilizado nos cálculos da atividade enzimática.

O ensaio enzimático utilizado para análise da atividade das ectonucleotidasas consistiu nas seguintes etapas. A reação de hidrólise foi feita com uma solução tampão 450mM de Tris-HCl (GIBCO) em pH 8,0, adicionando os diferentes nucleotídeos ATP, ADP e AMP (numa concentração final de 2mM), na presença de íon cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – SIGMA, concentração final de 4mM) para os nucleotídeos ATP e ADP ou magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – MERCK, concentração final de 4mM) para o nucleotídeo AMP, incubados em banho-maria, a 37°C, num volume final de 0,2mL. A reação foi parada com a adição de 0,2mL de TCA a 10% (ácido tricloroacético – SYNTH). Uma vez paradas as reações, as amostras foram colocadas no gelo e a quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberada foi medida através do método já citado anteriormente (CHAN *et al.*, 1986) utilizando-se um reagente (verde de malaquita) com afinidade pelo fosfato livre originado em decorrência da hidrólise dos nucleotídeos. A ligação do reagente ao Pi resulta numa coloração esverdeada de intensidade proporcional à quantidade de fosfato livre formado; coloração esta analisada por absorbância. Os reagentes utilizados para o preparo do corante foram: Verde Malaquita (ALDRICH Chemical Company) 0,812g dissolvido em 1L de água Milli-Q, Molibdato de Amônio (SYNTH) 28,6g dissolvido em 500mL de HCl 6N e Álcool Polivinílico (SIGMA) 11,6g dissolvido em 500mL de água fervendo. Todos os reagentes foram preparados separadamente e misturados por 30 minutos antes do uso, na proporção de 2:2:1:1 de verde malaquita, água Milli-Q, molibdato de amônio e álcool polivinílico, respectivamente. A partir daí adicionou-se a cada tubo de microcentrífuga 1mL do corante e após 20 minutos as amostras foram lidas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 630nm.

O tempo de incubação e a concentração de proteína (para cada um dos substratos e frações utilizadas) foram definidos através de uma prévia padronização, garantindo as condições ideais de incubação sempre na faixa de linearidade das reações. Para corrigir a hidrólise espontânea dos nucleotídeos, sem a presença da enzima, foram feitos tubos controles

com a adição da proteína após a reação ter sido parada com TCA 10%. Todas as amostras foram feitas em triplicatas e os controles em duplicatas.

Antes do início da reação, ou da incubação propriamente dita, foi realizada uma pré-incubação de 10 minutos, com o intuito de garantir que as amostras contendo as enzimas estivessem nas condições ideais para exercer a sua função catalisadora assim que o substrato fosse adicionado. A atividade enzimática ou atividade específica (AE) foi calculada em nanomoles de Pi liberado por minuto por miligrama de proteína.

O cálculo da quantidade de Pi liberado em nanomoles foi feito através da multiplicação do Δ extinção (média das leituras das amostras – média das leituras dos controles), obtido em diferentes tempos e concentrações de proteínas, pelo fator de calibração da curva padrão de fosfato e pela diluição que a amostra se encontrava. Este fator corresponde a um valor comum a todas as leituras (a derivada, ou ainda, a inclinação da reta comum a todos os pontos); enquanto que a diluição diz respeito à inativação da amostra pelo TCA 10%, ou seja, à diluição da amostra que foi alíquotada do tubo. Desta forma, para o cálculo da atividade específica, seguiu-se a seguinte fórmula:

$$AE = \frac{(\text{Absorbância da Amostra} - \text{Absorbância do Controle}) \times \text{Fator da Curva Padrão de Pi} \times \text{Diluição da amostra}}{\text{Vol. da Amostra (mL)} \times \text{Tempo (min)} \times \text{Concentração de Proteína (mg/mL)}}$$

3.8 – Análise da Expressão Protéica

Neste item foi realizada a padronização do método de Western Blot para análise da expressão protéica nas frações isoladas de tecido cardíaco. A expressão protéica foi realizada com o intuito de avaliar se haveria correlação entre os dados obtidos de atividade enzimática e a expressão protéica das ectonucleotidases envolvidas no processo de hidrólise (E-NTPDases ou ecto-5'-nucleotidase), nos dois modelos experimentais (hipertiroideo e hipotiroideo).

Após a obtenção das frações subcelulares cardíacas (FS e FM), foi adicionada a essas frações uma solução contendo coquetel de inibidores enzimáticos de proteases, numa proporção de 300µL de amostra para 1µL do coquetel de inibidores. Esses inibidores serviram para manter a integridade da amostra. O coquetel continha 5mM de aprotinina (SIGMA), 1mM de pepstatina (SIGMA), 1mM de leupeptina (SIGMA), e 0,1M de PMSF (fenil-metil-sulfonil fluoreto – GIBCO). Posteriormente a isso, foi realizado o método colorimétrico de BRADFORD (1976), como já citado, para a dosagem da concentração total de proteína existente em cada uma das frações.

75µg da proteína total foram submetidas ao aquecimento (por 5 minutos em água fervendo) para desnaturação das proteínas e depois à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 30%, por 3 horas a 100 Volts. Após a eletroforese, as proteínas totais presentes no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Trans Blot Transfer Médium Purê Membrane – BIO-RAD) em um sistema semi-seco (Trans-Blot Semi-Dry Cell – BIO-RAD), sob 20 Volts de tensão durante 1 hora. Após a transferência, a membrana foi lavada e corada com Ponceau (ponceau 0,1% – AMRESCO + ácido acético glacial 100% – MERCK) para observação da presença de proteínas na membrana. A membrana foi muito bem lavada com TBST (Tampão a base de NaCl – GIBCO e Tris Base – INVITROGEN com 1% de Tween 20 – AMRESCO) com pH acertado pra 7,5, durante 20 minutos para retirada total do ponceau.

A partir daí a membrana foi incubada com o anticorpo primário policlonal produzido em cabra, específico para a enzima 5'-NT (1:500 – SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) adicionado a 1% de leite em pó desnatado (MOLICO) diluído em TBST durante 2 horas, a 37°C, sob agitação. Posteriormente, a membrana foi lavada com TBST por 45 minutos e depois foi adicionado o anticorpo secundário específico contra o anticorpo primário (anti-

cabra) conjugado de IgG com peroxidase (1:1000 – JACKSON IMMUNO RESEARCH), por 1 hora a temperatura ambiente. Após a ligação do anticorpo secundário, a membrana foi novamente lavada com TBST por 45 minutos e acrescentada a solução de ECL (AMERSHAM BIOSCIENCES), a qual tem como função promover uma reação de luminescência, cujo produto final irá impressionar um filme de raio X. Ao término deste processo, as membranas foram então expostas ao filme de raio X (T-MAT G/RA Film – KODAK), promovendo a marcação de bandas, as quais são proporcionais à quantidade de proteína ligada ao anticorpo específico. Estas bandas foram posteriormente quantificadas densitometricamente em um sistema de fotodocumentação Gel Pro Imager (MEDIA CYBERNETICS).

3.9 – Análise Estatística dos Resultados

Os dados estão apresentados como médias \pm desvio-padrão da média (DP), considerando “n” o número de animais utilizados em cada experimento. Os resultados foram analisados e comparados utilizando-se o *teste-t* de Student para comparação entre dois grupos ou a Análise de Variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey entre mais de dois grupos experimentais. Foram consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$ (Instat Instant Biostatistics – GRAPHPAD Software).

Para os experimentos de padronização (tempo de incubação ideal e concentração de proteína ideal para o cálculo da atividade ectonucleotidásica), os resultados foram analisados pela reta de regressão do tipo linear simples, utilizando o coeficiente de determinação (R^2 da curva), para determinar a correlação (grau da relação linear) existente entre os eixos X e Y. Foram considerados valores ideais de R^2 acima de 0,950 para que se pudesse confiar na linearidade da reação.

4.1 – Avaliação do Peso Corpóreo, Consumo Total de Água e Ração dos Animais

Os dados referentes ao peso corpóreo dos animais no início e no final dos protocolos experimentais estão apresentados na Tabela 1, a seguir. Conforme pode ser observado, o peso corporal dos animais no início do experimento não diferiu. No entanto, no final do protocolo experimental, os animais do grupo controle e do grupo tratado com a menor dose de T4 (T4-10) apresentaram peso significativamente maior em relação ao peso no início do experimento, o que não ocorreu com os animais dos demais grupos estudados (T4-25, T4-50, T3-10 e Hipotiroideo). Apesar de não haver diferença significativa quanto ao peso final entre esses dois grupos, nota-se um menor ganho de peso no grupo hipertiroideo (T4-10) em relação ao grupo controle.

Tabela 1 – Peso inicial (Pi), peso final (Pf) e ganho de peso ($\Delta = Pf - Pi$) dos animais.

Grupos	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Δ (Pf – Pi) (g)
Controle	241,50 \pm 7,57 (n=6)	266,17 \pm 14,75 (n=6)#	24,67
T4-10	246,12 \pm 5,22 (n=8)	259,12 \pm 7,49 (n=8)#	13
T4-25	246,04 \pm 19,56 (n=6)	241,06 \pm 17,34 (n=6)*	-4,98
T4-50	239,79 \pm 10,82 (n=6)	248,57 \pm 17,25 (n=6)	8,78
T3-10	260,89 \pm 15,54 (n=4)	250,57 \pm 16,02 (n=4)	-10,32
Hipotiroideo	255,48 \pm 26,96 (n=6)	234,45 \pm 15,39 (n=6)**	-21,03

Os resultados estão expressos como Média \pm DP. *n*= número de animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando-se ANOVA seguida do teste de Tukey ou *teste t* de Student. * *p*<0,05 e ** *p*<0,01 vs Grupo Controle e, # *p*<0,01 vs Peso Inicial do respectivo grupo.

O consumo total de água e ração também foi avaliado ao longo do período experimental. Nos grupos hipertiroideos houve um maior consumo total, tanto de água como de ração, em relação ao grupo controle, além deste consumo ter se mostrado diretamente relacionado com a dose de hormônio administrada, chegando a 1682,5g de ração e 2725mL de água no grupo T4-50, em relação à 1414g e 1970mL no grupo controle. O oposto ocorreu em relação ao grupo dos animais tireoidectomizados, que apresentou consumos de água e ração bastante inferiores (731g e 1500mL, respectivamente) em relação aos observados no grupo controle.

4.2 – Análise da Razão Peso Ventricular (Ventrículos Direito e Esquerdo)/Peso Corpóreo nos Diferentes Grupos Estudados

A razão peso ventricular do coração (Ventrículo Direito + Ventrículo Esquerdo)/peso corpóreo, em mg/g, foi avaliada nos diferentes grupos experimentais: T4-10, T4-25, T4-50, T3-10, Hipo e Hipo + T4-10 (Figura 3). Observa-se que todos os grupos tratados com hormônio tiroideano seja com T3 ou T4, apresentaram um significativo aumento nesta razão, em relação ao grupo eutiroideo. Esta razão aumentou de maneira dose-dependente, obtendo valor máximo ($3,590 \pm 0,108$ mg/g, n=6) na maior dose de T4 (T4-50). Além disso, é possível observar que o grupo que recebeu tratamento com T3 (T3-10) apresentou uma razão similar à do grupo T4-50 ($3,627 \pm 0,123$ mg/g, n=6), indicando a maior eficiência do T3 em promover hipertrofia cardíaca, com doses da ordem de cinco vezes inferiores às do T4. Com relação ao grupo hipotiroideo observa-se a diminuição desta razão em comparação ao grupo controle ($1,818 \pm 0,107$ mg/g no hipo, n=6 versus $2,338 \pm 0,093$ mg/g no controle, n=6) – Fig. 3. Quanto ao grupo que recebeu reposição hormonal após a instalação do estado hipotiroideo (Hipo + T4-10) este, teve sua hipertrofia significativamente superior ao grupo hipotiroideo

com valor de $2,488 \pm 0,181$ mg/g (n=5) e muito semelhante à razão encontrada no grupo controle ($2,338 \pm 0,093$ mg/g, n=6).

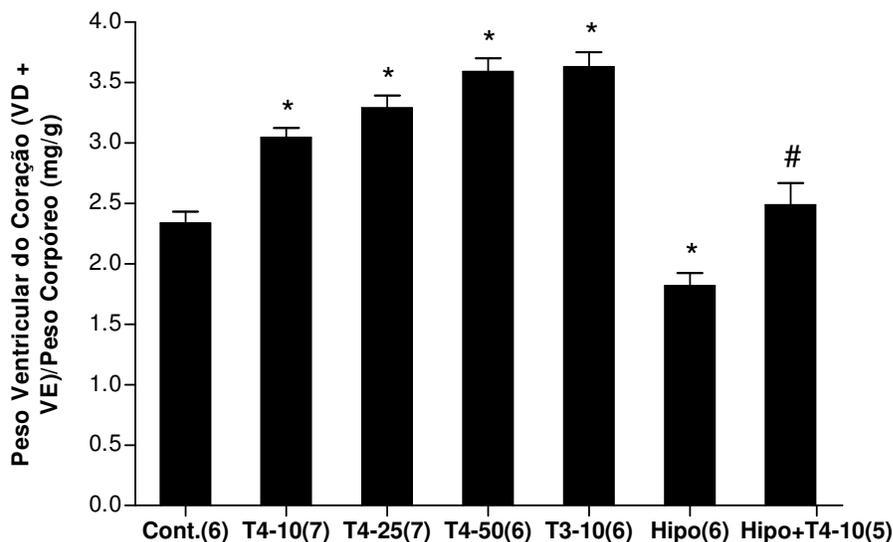


Figura 3 – Razão Peso Ventricular/Peso Corpóreo dos diferentes grupos experimentais. Grupo Controle (Cont.) – salina; T4-10 – 10 μ g de T4/100g de peso corpóreo; T4-25 – 25 μ g de T4/100g de peso corpóreo; T4-50 – 50 μ g de T4/100g de peso corpóreo; T3-10 – 3,5 μ g de T3/100g de peso corpóreo; Hipotiroideo (Hipo) – animais tireoidectomizados + metimazol + CaCl₂; Hipo com reposição hormonal (Hipo – 2semanas + T4-10 – 2 semanas). O número em parênteses representa o número de animais de cada grupo. Os resultados representam a Média \pm DP e foram analisados utilizando-se ANOVA, seguida do teste de Tukey ou *teste t* de Student. * vs Controle, $p < 0,001$ e # vs Hipotiroideo, $p < 0,001$.

4.3 – Avaliação da Frequência Cardíaca e da Pressão Arterial Sistólica

Os dados de frequência cardíaca (FC) e pressão arterial sistólica (PAS) foram acompanhados ao longo dos tratamentos (Figuras 4 e 5, respectivamente). Podemos observar que os grupos que receberam hormônio tireoideano (10, 25 ou 50 vezes a dose fisiológica de T4) apresentaram um aumento progressivo da FC, a qual no último dia de tratamento mostrou-se significativamente elevada em todos os grupos hipertiroideos, em relação ao grupo controle ($422,57 \pm 13,50$ bpm no grupo T4-10, n=5; $549,12 \pm 12,05$ bpm no grupo T4-

25, n=6 e; $536,63 \pm 83,92$ bpm no grupo T4-50, n=6). Paralelamente, o grupo Hipo apresentou significativa diminuição da FC, no entanto, após a reposição de T4 (grupo Hipo + T4-10) observou-se um rápido aumento da FC destes animais, chegando a valores que ultrapassaram os do grupo controle, sendo significativamente superiores a estes (Figura 4).

Com relação à PAS, esta se mostrou aumentada nos grupos tratados com hormônio tiroideano e diminuída no grupo hipo (Figura 5). No final do tratamento, os grupos tratados com as maiores doses de T4 (T4-25 e T4-50) apresentaram aumento significativamente superior ao grupo controle, com $166,37 \pm 10,95$ mmHg (n=6) no grupo T4-25 e $196,01 \pm 27,33$ mmHg (n=6) no grupo T4-50, em comparação ao grupo controle com $130,40 \pm 3,66$ mmHg (n=5). Com relação ao grupo hipotiroideo e hipo + T4-10, a PAS apresentou-se significativamente diminuída em relação ao grupo controle ($112,80 \pm 8,39$ mmHg; n=5 no hipo e $106,87 \pm 13,55$ mmHg; n=5 no grupo hipo + T4-10, em relação a $130,40 \pm 3,66$ mmHg; n=5 no grupo controle). A diminuição da pressão do grupo hipo + T4-10 perdurou até mesmo após 4 dias do início da reposição hormonal, sendo revertida apenas no sexto dia da reposição de T4 (ou 21º dia de tratamento), voltando então a níveis muito semelhantes ao grupo controle, com PAS de $139,99 \pm 17,90$ mmHg; n=5 para o grupo reposição hormonal e $143,80 \pm 2,37$ mmHg; n=5 para o grupo controle.

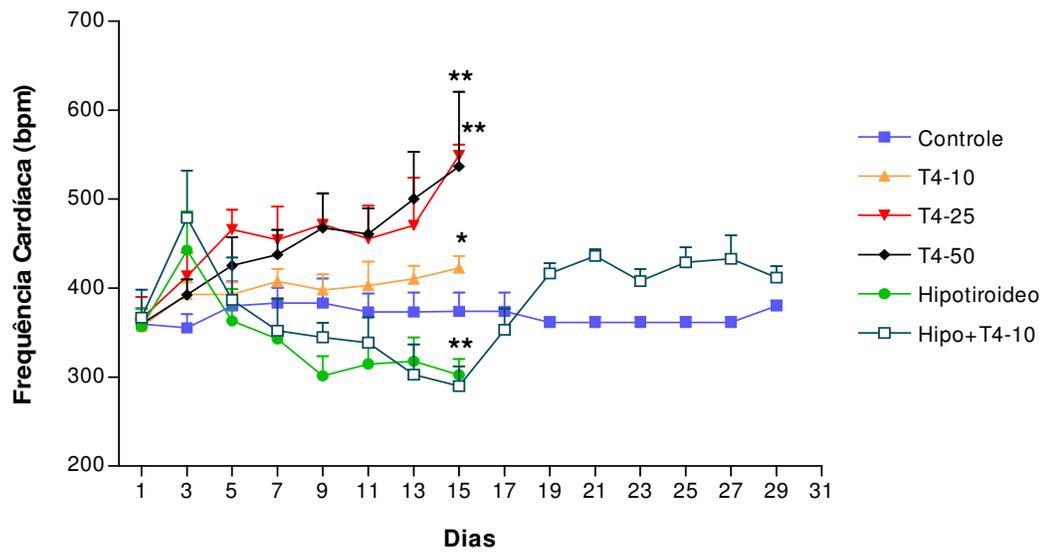


Figura 4 – Evolução da Frequência Cardíaca (bpm) nos diferentes grupos experimentais. Grupo Controle – salina (n=5); T4-10 – 10µg de T4/100g de peso corpóreo (n=5); T4-25 – 25µg de T4/100g (n=6); T4-50 – 50µg de T4/100g (n=6); Hipotiroideo – animais tireoidectomizados + metimazol + CaCl₂ (n=5) e Hipo + T4-10 – animais hipotiroideos (14 dias) + T4-10 (14 dias) (n=5). Os dados estão apresentados como Média ± DP e foram comparados no dia 15 utilizando-se a ANOVA, seguida do teste de Tukey. * vs Controle, $p < 0,01$ e ** vs Controle, $p < 0,001$.

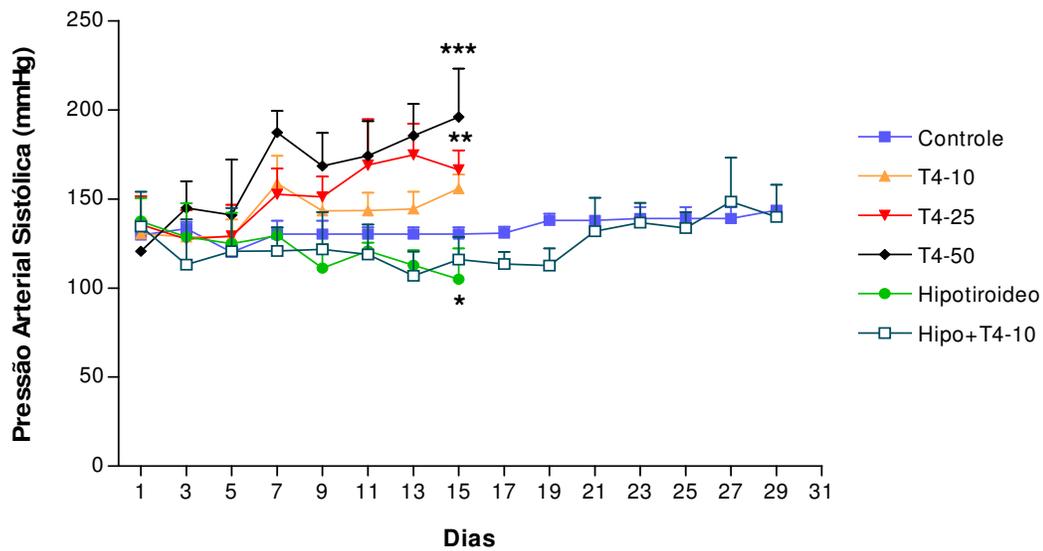


Figura 5 – Evolução da Pressão Arterial Sistólica (mmHg) nos diferentes grupos experimentais. Grupo Controle – salina (n=5); T4-10 – 10µg de T4/100g de peso corpóreo (n=5); T4-25 – 25µg de T4/100g (n=6); T4-50 – 50µg de T4/100g (n=6); Hipotiroideo – animais tireoidectomizados + metimazol + CaCl₂ (n=5) e Hipo + T4-10 – animais hipotiroideos (14 dias) + T4-10 (14 dias) (n=5). Os dados estão apresentados como Média ± DP e foram comparados no dia 15 utilizando-se a ANOVA, seguida do teste de Tukey ou teste *t* de Student. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs Controle.

4.4 – Dosagens Séricas

As dosagens séricas hormonais dos grupos controle, T4-10, T4-25, T4-50, T3-10, Hipotiroideo e Hipo + T4-10 estão apresentadas na Tabela 2. Conforme pode ser observado, os animais que receberam tratamento com hormônio tiroideano apresentaram níveis significativamente aumentados de T3 e T4 totais no soro. É de se notar também que no grupo T3-10 a concentração de hormônio T3 foi muito similar à encontrada no grupo T4-10, porém a concentração de hormônio T4 esteve inferior a 0,01 ng/mL neste grupo.

Por outro lado, os ratos submetidos à tireoidectomia apresentaram uma intensa diminuição dos hormônios tiroideanos, chegando a valores menores que 0,01 ng/mL para ambos. No entanto, o grupo que recebeu reposição hormonal após a tireoidectomia, embora tivesse apresentado níveis de T3 similares aos níveis basais encontrados no grupo eutiroideo, obteve níveis de T4 significativamente superiores aos encontrados no grupo controle (Tabela 2).

Estes resultados referentes às dosagens hormonais, em paralelo com os dados hemodinâmicos já apresentados previamente, e ainda os dados de trofismo cardíaco confirmam a eficácia dos protocolos experimentais de indução ao hiper e ao hipotiroidismo.

Tabela 2 – Dosagens séricas de T3 e T4.

Grupos	N (número de animais)	T3 (ng/mL)	T4 (ng/mL)
Controle	7	0,89 ± 0,18	79,56 ± 4,34
T4-10	7	1,37 ± 0,25*	108,13 ± 19,09**
T4-25	7	1,63 ± 0,33***	115,30 ± 12,13***
T4-50	7	1,72 ± 0,30***	109,05 ± 17,57**
T3-10	5	1,40 ± 0,11*	<0,01***
Hipotiroideo	10	<0,01***	<0,01***
Reposição Hormonal (Hipo+T4-10)	4	1,10 ± 0,08#	94,21 ± 3,36***#

Os resultados estão expressos como Média ± DP. Os dados foram analisados utilizando-se ANOVA seguida do teste de Tukey ou *teste t* de Student. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs Controle; # $p < 0,001$ vs Hipotiroideo

4.5 – Análise Histológica do Coração

Secções transversas representativas de corações dos grupos controle, hipotiroideo e hipertiroideo com a maior dose (T4-50) encontram-se apresentadas na Figura 6. A análise comparativa da morfologia do coração desses três grupos experimentais mostra nitidamente o intenso efeito que o hormônio tiroideano apresenta sobre o trofismo deste tecido muscular. Assim, o coração do animal hipotiroideo apresentou uma marcante atrofia do músculo cardíaco, contrariamente ao observado no grupo hiper, cujo coração mostrou-se claramente hipertrofiado em relação ao controle.



Figura 6 – Fotomicrografias representativas dos corações de 3 diferentes grupos experimentais estudados: Grupo Controle – salina; T4-50 – 50 μ g de T4/100g de peso corpóreo e Hipotiroideo – animais tireoidectomizados + metimazol + CaCl₂. Coloração do tipo HE.

4.6 – Análise da Atividade Enzimática nas Frações Subcelulares (Solúvel e Microssomal)

4.6.1 - Padronização das Condições Ideais

Encontram-se, a seguir, os resultados referentes às curvas inicialmente realizadas, a partir das quais o tempo de incubação e a concentração de proteína ideais, das duas frações subcelulares (solúvel e microssomal), foram escolhidos assegurando a linearidade da reação, como descrito anteriormente na seção “Material e Métodos”.

4.6.1.1 – Quanto à Fração Solúvel (FS): Hidrólise de ATP, ADP e AMP

A seguir, na Figura 7, estão demonstrados os resultados de padronização do tempo e concentração de proteína na FS para cada um dos substratos estudados.

Para a curva de tempo da hidrólise de ATP, a FS foi incubada com tempos que variaram de 4 a 12 minutos com uma concentração fixa de 90 μ g de proteína, como pode ser observado na Figura 7A. Para a curva de proteína da hidrólise de ATP, a FS foi incubada com diferentes concentrações de proteína que variaram entre 80 e 120 μ g, num tempo determinado

de 10 minutos, estipulado com base na curva anterior. A hidrólise de ATP foi linear durante o tempo de incubação percorrido, e até pelo menos a concentração de 110 μ g de proteína (Figura 7B). Na FS houve a hidrólise de ATP com uma atividade específica (AE) de $26,11 \pm 1,85$ nmol de Pi/min/mg de proteína na curva de tempo (n=3) e uma AE de $20,09 \pm 1,03$ nmol de Pi/min/mg de proteína na curva de proteína (n=3).

Para a curva de tempo da hidrólise de ADP, a FS foi incubada com tempos que variaram de 22 a 34 minutos, com uma concentração fixa de 90 μ g de proteína (Figura 7C). Para a curva de proteína da hidrólise de ADP, a FS foi incubada com diferentes concentrações de proteína que variaram entre 90 e 120 μ g, num tempo determinado de 30 min, estipulado com base na curva anterior. A hidrólise de ADP foi linear durante todo o tempo de incubação percorrido (22 a 34 min), assim como para as diferentes concentrações de proteína incubadas (Figuras 7C e 7D). Na FS houve a hidrólise de ADP com uma AE de $12,54 \pm 0,74$ nmol de Pi/min/mg de proteína na curva de tempo (n=3) e uma AE de $11,99 \pm 1,32$ nmol de Pi/min/mg de proteína na curva de proteína (n=3).

Para a curva de tempo da hidrólise de AMP, a FS foi incubada com tempos que variaram de 32 a 48 minutos, com uma concentração fixa de 90 μ g de proteína (Figura 7E). Para a curva de proteína da hidrólise de AMP, a FS foi incubada com diferentes concentrações de proteína que variaram entre 80 e 120 μ g, num tempo determinado de 40 min, estipulado com base na curva anterior. A hidrólise de AMP é linear até pelo menos o tempo de 44 min de incubação e linear para as diferentes concentrações de proteína incubadas (Figuras 7E e 7F). Na FS houve a hidrólise de AMP com uma AE de $17,08 \pm 2,74$ nmol de Pi/min/mg de proteína na curva de tempo (n=3) e uma AE de $15,68 \pm 1,44$ nmol de Pi/min/mg de proteína na curva de proteína (n=3).

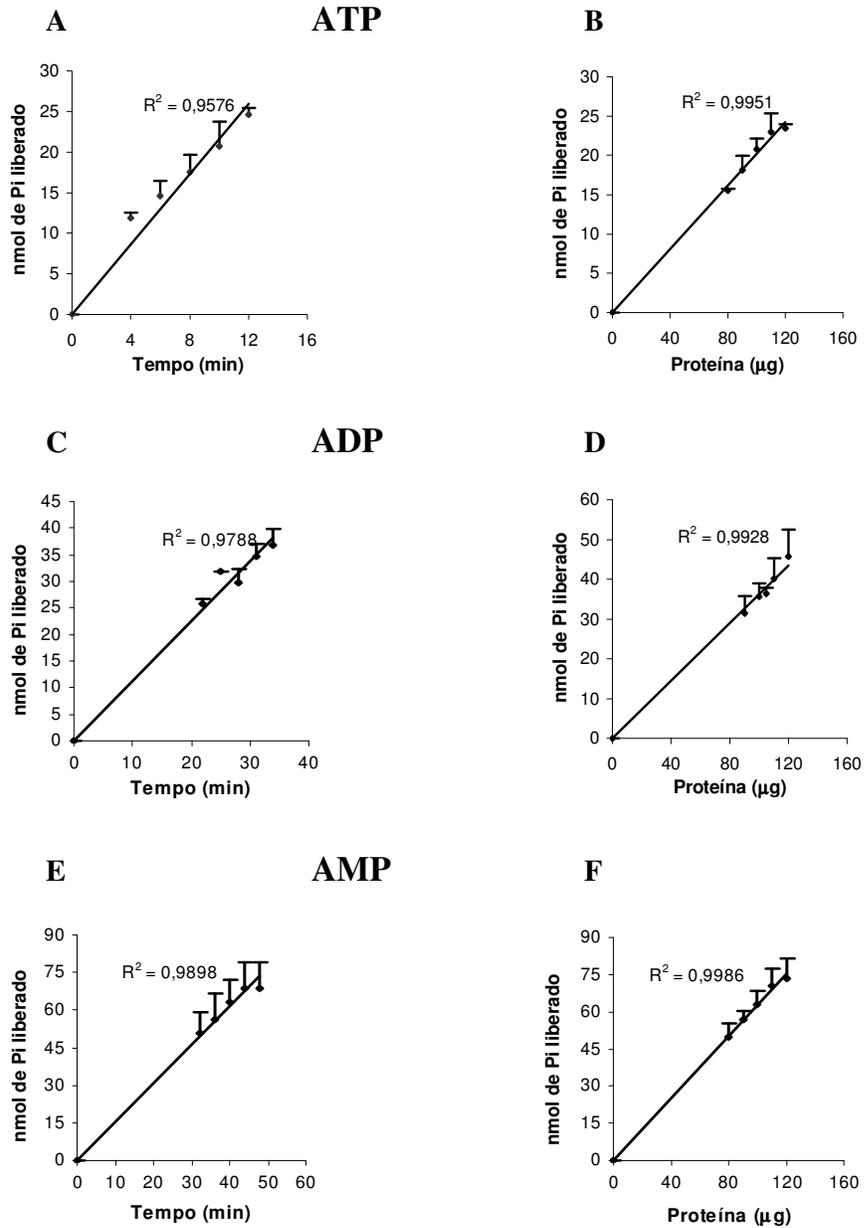


Figura 7 – Padronização do tempo de incubação (à esquerda) e da concentração de proteína (à direita) ideais para a avaliação da hidrólise dos nucleotídeos: ATP (A e B), ADP (C e D) e AMP (E e F) na **Fração Solúvel**. Os dados estão representados como Média \pm DP. Foram realizados 3 experimentos para cada curva e substrato.

4.6.1.2 – Quanto à Fração Microssomal (FM): Hidrólise de ATP, ADP e AMP

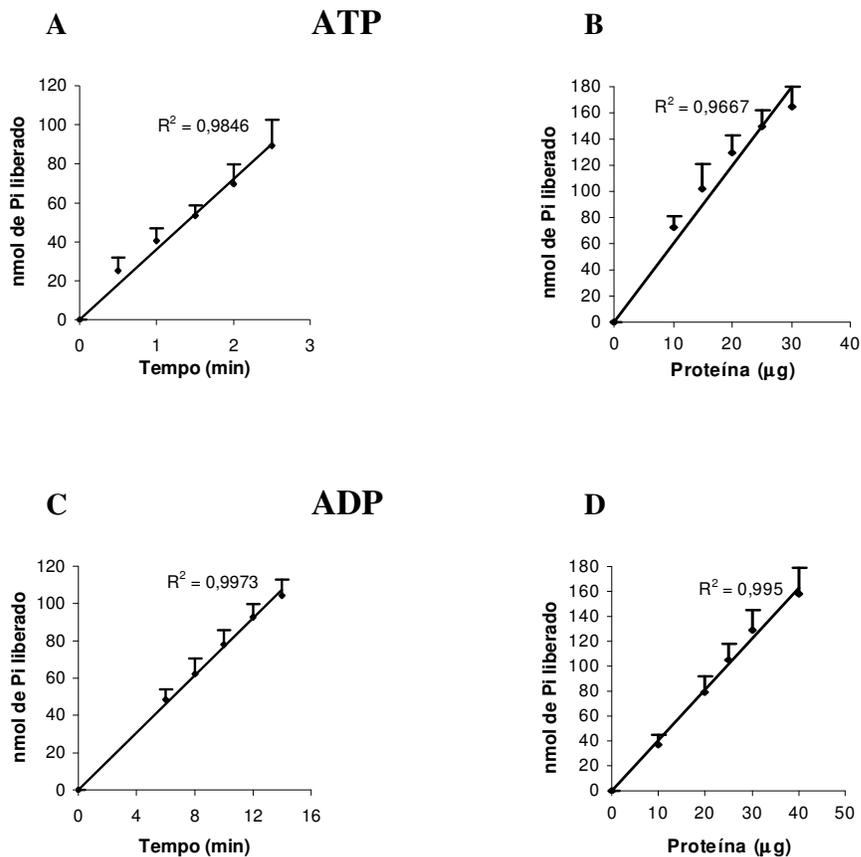
Os dados representativos da padronização realizada na FM estão representados, a seguir, na Figura 8.

Para a curva de tempo da hidrólise de ATP, a FM foi incubada com tempos que variaram de 0,5 a 2,5 minutos e com uma concentração fixa de 20 μ g de proteína, como pode ser observado na Figura 8A. Para a curva de proteína da hidrólise de ATP, a FM foi incubada com diferentes concentrações de proteína que variaram entre 10 e 30 μ g, num tempo determinado de 1,5 min, estipulado conforme curva anterior (Figura 8B). A hidrólise de ATP foi linear durante todo o tempo de incubação percorrido (0,5 a 2,5 min), porém para as diferentes concentrações de proteína incubadas, a reação foi linear até a concentração de 25 μ g (Figuras 8A e 8B). Na FM houve a hidrólise de ATP com uma AE de $2011,05 \pm 282,30$ nmol de Pi/min/mg de proteína na curva de tempo (n=3) e uma AE de $4259,45 \pm 389,38$ nmol de Pi/min/mg de proteína na curva de proteína (n=3).

Para a curva de tempo da hidrólise de ADP, a FM foi incubada com tempos que variaram de 6 a 14 minutos e com uma concentração fixa de 20 μ g de proteína, como pode ser observado na Figura 8C. Para a curva de proteína da hidrólise de ADP, a FM foi incubada com diferentes concentrações de proteína que variaram entre 10 e 40 μ g, num tempo determinado de 10 min, estipulado conforme curva anterior (Figura 8C). A hidrólise de ADP foi linear durante todo o tempo de incubação percorrido (6 a 14 min), assim como para as diferentes concentrações de proteína incubadas (Figuras 8C e 8D). Na FM houve hidrólise de ADP com uma AE de $395,30 \pm 43,55$ nmol de Pi/min/mg de proteína na curva de tempo (n=3) e $404,04 \pm 60,74$ nmol de Pi/min/mg de proteína na curva de proteína (n=3).

Para a curva de tempo da hidrólise de AMP, assim como para a hidrólise de ADP, a FM foi incubada com tempos que variaram de 6 a 14 minutos, porém com uma concentração fixa de 40 μ g de proteína, como pode ser observado na Figura 8E. Para a curva de proteína da

hidrólise de AMP, a FM foi incubada com diferentes concentrações de proteína que variaram entre 30 e 60µg, num tempo determinado de 10 min, estipulado na curva anterior (Figura 8F). A hidrólise de AMP foi linear durante todo o tempo de incubação (6 a 14 min), assim como para as diferentes concentrações de proteína incubadas (Figuras 8E e 8F). Na FM houve hidrólise de AMP com uma AE de $184,70 \pm 9,86$ nmol de Pi/min/mg de proteína na curva de tempo (n=3) e $212,80 \pm 19,03$ nmol de Pi/min/mg de proteína na curva de proteína (n=3).



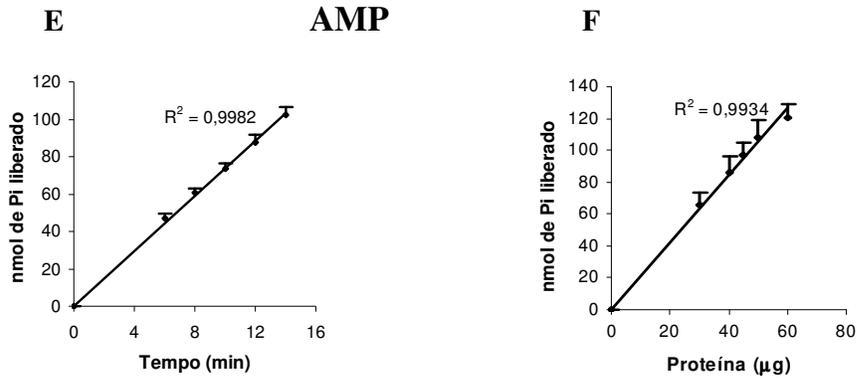


Figura 8 – Padronização do tempo de incubação (à esquerda) e da concentração de proteína (à direita) ideais para a avaliação da hidrólise dos nucleotídeos ATP (A e B), ADP (C e D) e AMP (E e F) na **Fração Microssomal**. Os dados estão representados como Média \pm DP. Foram realizados 3 experimentos para cada curva e substrato.

Os experimentos referentes à padronização foram realizados no sentido de estabelecer as exatas condições (tempo de incubação e concentração de proteína incubada) em que a etapa experimental propriamente dita deveria ser realizada, sendo, portanto indispensável para a fase posterior – a fase de avaliação do efeito dos tratamentos. Uma vez estabelecidas estas condições, deu-se início à fase experimental, ou seja, a análise da atividade enzimática das frações isoladas de tecido cardíaco em condições controle e após tratamento (hipertiroidismo – T4 em diferentes doses e T3, hipotiroidismo e, hipotiroidismo com reposição de T4).

Diante dos resultados de padronização obtidos para cada uma das frações estudadas (FS e FM), a análise da hidrólise dos nucleotídeos nas diferentes situações experimentais de tratamento utilizou como condição ideal os seguintes parâmetros:

➤ **Na Fração Solúvel**

- tempo de 10 minutos e 100µg de proteína para ATP
- tempo de 30 minutos e 100µg de proteína para ADP
- tempo de 40 minutos e 100µg de proteína para AMP

➤ **Na Fração Microsomal**

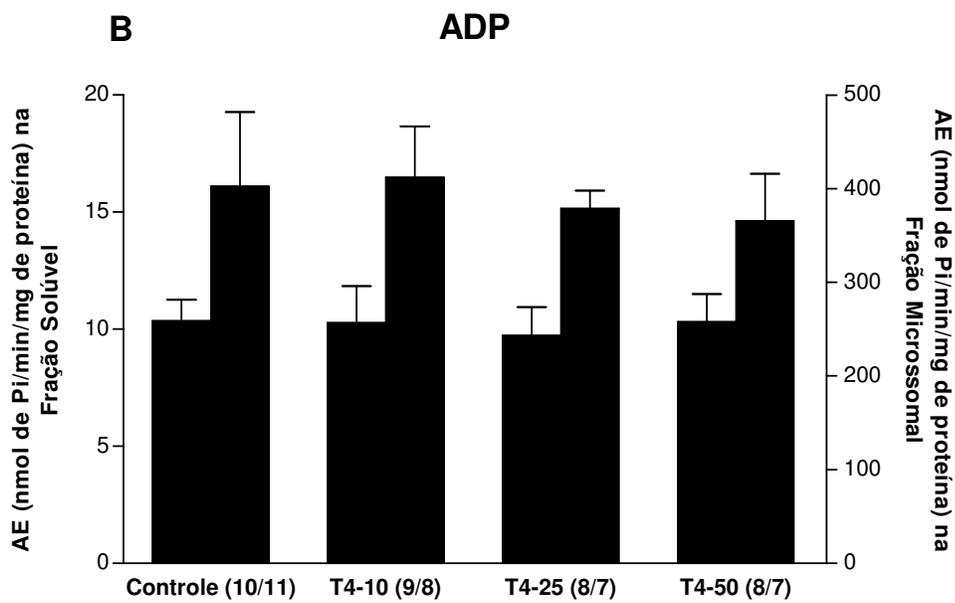
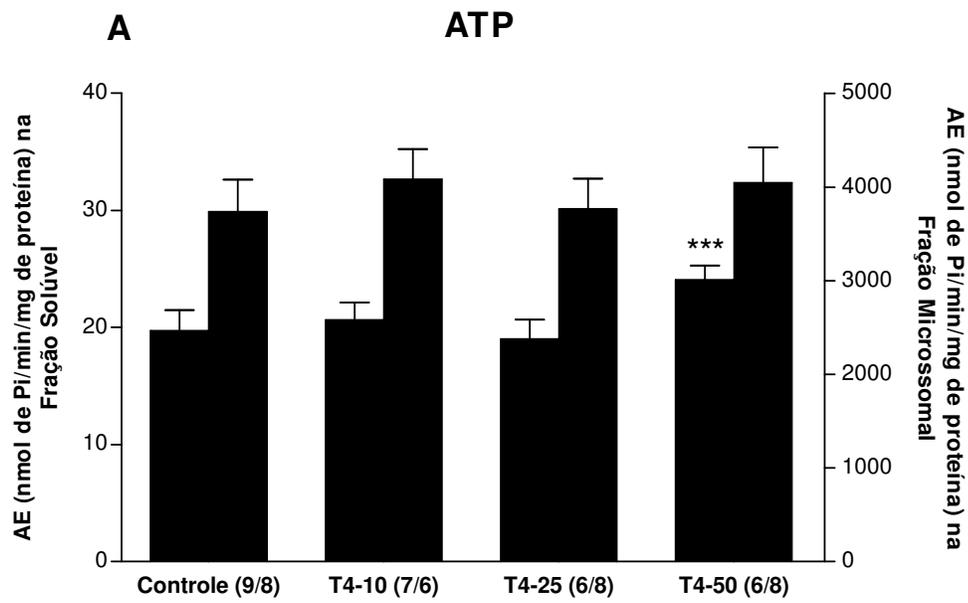
- tempo de 1,5 minutos e 20µg de proteína para ATP
- tempo de 10 minutos e 25µg de proteína para ADP
- tempo de 10 minutos e 40µg de proteína para AMP

4.6.2 – Efeito do Hipertiroidismo (utilizando T4) nas Atividades Ectonucleotidásicas das Frações Solúvel e Microsomal

A atividade das E-NTPDases (hidrólise de ATP e ADP) e da ecto-5'-nucleotidase (hidrólise de AMP) nas frações subcelulares (FS e FM), após o tratamento dos animais com diferentes concentrações de hormônio tiroideano (10µg, 25µg e 50µg de T4/100g de peso corpóreo), está representada na Figura 9.

Podemos observar que na FS houve um aumento significativo ($p < 0,001$) da hidrólise de ATP apenas no grupo T4-50, em relação ao grupo controle ($24,06 \pm 1,23$ versus $19,72 \pm 1,77$ nmol de Pi/min/mg de proteína no grupo controle). Com relação à hidrólise de ADP na FS, todos os grupos experimentais tratados com hormônio tiroideano (T4-10, T4-25 e T4-50) apresentaram um comportamento similar ao grupo controle, o qual teve uma AE de $10,35 \pm 0,90$ nmol de Pi/min/mg de proteína. Por fim, com relação à hidrólise de AMP, observou-se uma diminuição na AE, de maneira dose dependente, nos grupos T4-10, T4-25 e T4-50, porém esta diminuição tornou-se significativamente diferente do grupo controle apenas nos grupos T4-25 e T4-50 ($11,43 \pm 1,29$ e $10,57 \pm 1,66$, respectivamente, em comparação a $13,30 \pm 1,34$ nmol de Pi/min/mg de proteína no grupo controle).

Para a FM podemos observar que, estatisticamente, nada ocorreu em relação à hidrólise de ATP, ADP e AMP (Figura 9A-C, barras listradas).



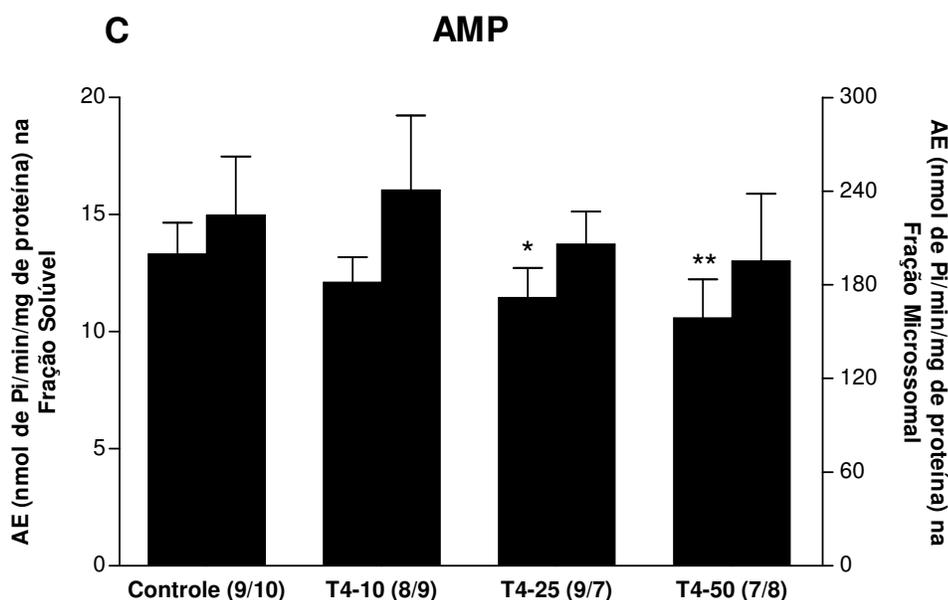


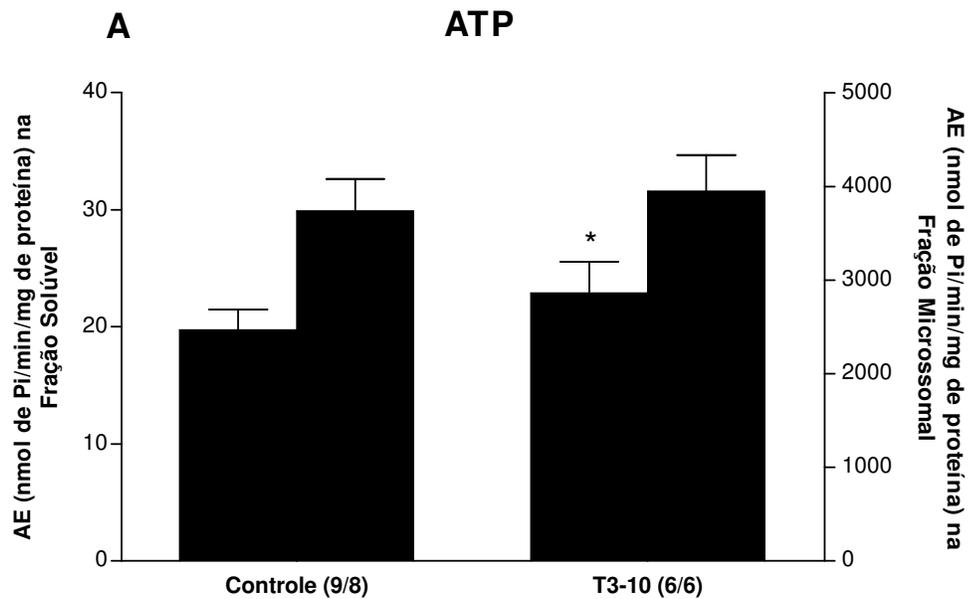
Figura 9 – Efeito de diferentes graus de Hipertiroidismo (induzidos por T4) sobre a hidrólise dos nucleotídeos ATP (A), ADP (B) e AMP (C) nas Frações Solúvel e Microsomal de coração. Grupo Controle (salina); T4-10 – 10µg de T4/100g de peso corpóreo; T4-25 – 25µg de T4/100g de peso corpóreo e T4-50 – 50µg de T4/100g de peso corpóreo. Barras em preto representam a hidrólise dos nucleotídeos na FS e barras listradas representam a hidrólise dos nucleotídeos na FM. O número em parênteses representa o número de experimentos das frações solúvel e microsomal, respectivamente. Os resultados estão apresentados como Média ± DP e foram analisados utilizando-se ANOVA, seguida do teste de Tukey. * vs Controle, $p < 0,05$; ** vs Controle, $p < 0,01$; *** vs Controle, $p < 0,001$.

4.6.3 – Efeito do Hipertiroidismo (utilizando T3) nas Atividades Ectonucleotídicas das Frações Solúvel e Microsomal

Considerando os mecanismos utilizados pelo T4 e pelo T3 para exercer um determinado efeito biológico, para estabelecer uma comparação entre estas duas moléculas, o efeito do T3 (10 vezes a dose fisiológica) sobre a atividade ectonucleotídica foi também avaliada. A atividade específica das enzimas responsáveis por hidrolisar ATP e ADP (E-NTPDases) e AMP (ecto-5'-nucleotidase) nas Frações Solúvel e Microsomal, após o tratamento dos animais com T3, na dose de 3,5µg de T3/100g de peso corpóreo, está apresentada na Figura 10.

O tratamento com o T3 praticamente em nada alterou a hidrólise dos nucleotódeos em ambas as frações (solúvel e microssomal), quando comparada à do grupo controle. Apenas com relação à hidrólise de ATP na FS houve um aumento significativo ($p < 0,05$) da AE ($22,86 \pm 2,69$ versus $19,72 \pm 1,77$ nmol de Pi/min/mg de proteína no grupo controle).

Quanto à FM do grupo T3-10, embora se note uma pequena tendência ao aumento da AE quanto à hidrólise de ATP, novamente não ocorreu alteração estatisticamente significativa na hidrólise do ATP, ADP e AMP, como já havia sido anteriormente observado (Figura 9) em todas as diferentes doses de T4.



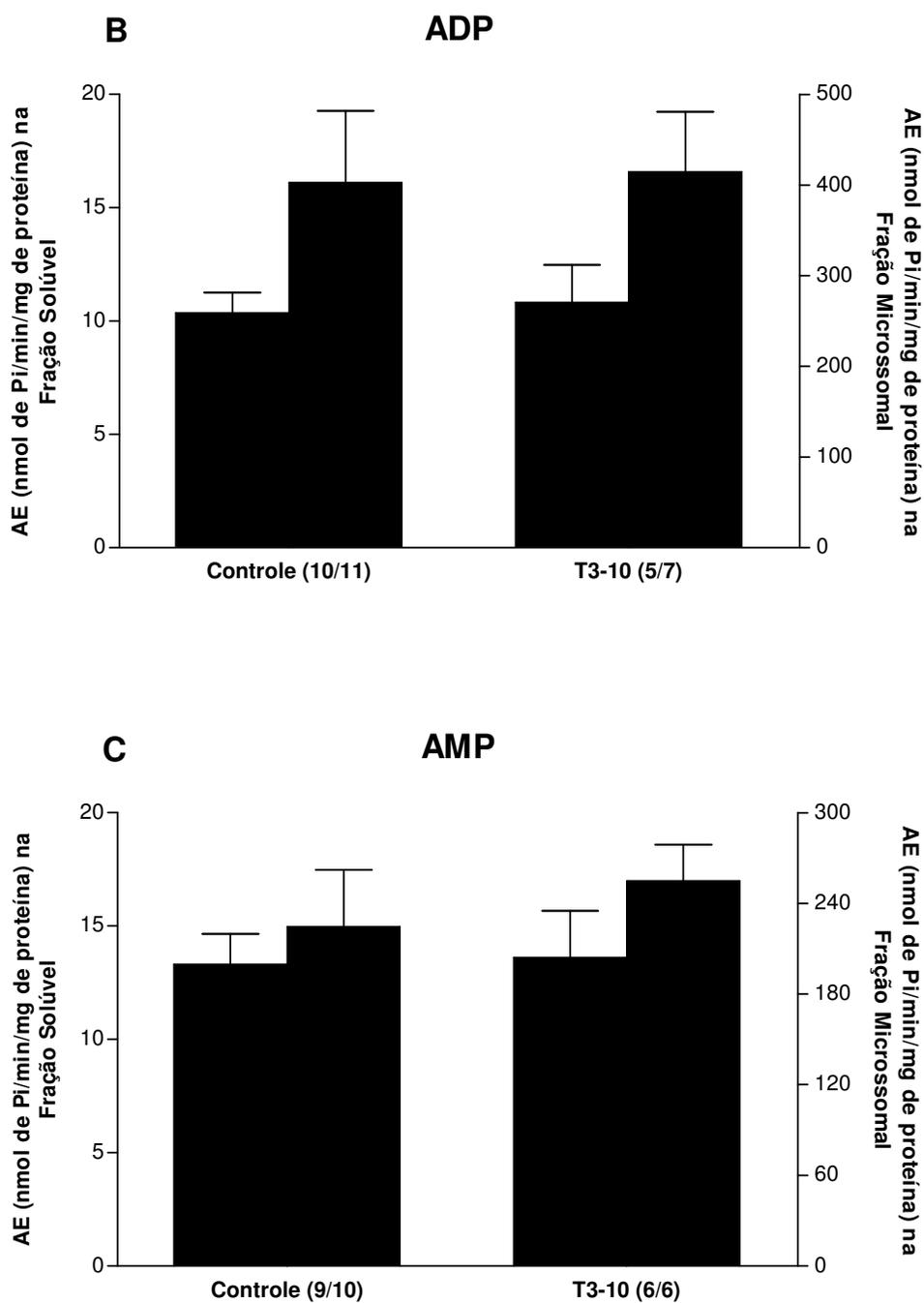


Figura 10 – Efeito do T3 sobre a hidrólise dos nucleotídeos ATP (A), ADP (B) e AMP (C) nas Frações Solúvel e Microsossomal de coração. Grupo Controle (salina); T3-10 – 3,5µg de T3/100g de peso corpóreo. Barras em preto representam a hidrólise dos nucleotídeos na FS e barras listradas representam a hidrólise dos nucleotídeos na FM. O número em parênteses representa o número de experimentos das frações solúvel e microsossomal, respectivamente. Os resultados estão apresentados como Média ± DP e foram analisados utilizando-se o teste *t* Student. * vs Controle, $p < 0,05$.

4.6.4 – Efeito do Hipotiroidismo e da Reposição Hormonal de T4-10 sobre as Atividades Ectonucleotidásicas das Frações Solúvel e Microsomal

A atividade das E-NTPDases (hidrólise de ATP e ADP) e da ecto-5'-nucleotidase (hidrólise de AMP) nas frações subcelulares (FS e FM), após o tratamento dos animais tireoidectomizados (hipotiroideos, tratados com 0,05% de metimazol e 4,5mM de CaCl₂) e dos animais submetidos ao hipotiroidismo com posterior reposição hormonal (hipo + T4-10), está apresentada na Figura 11.

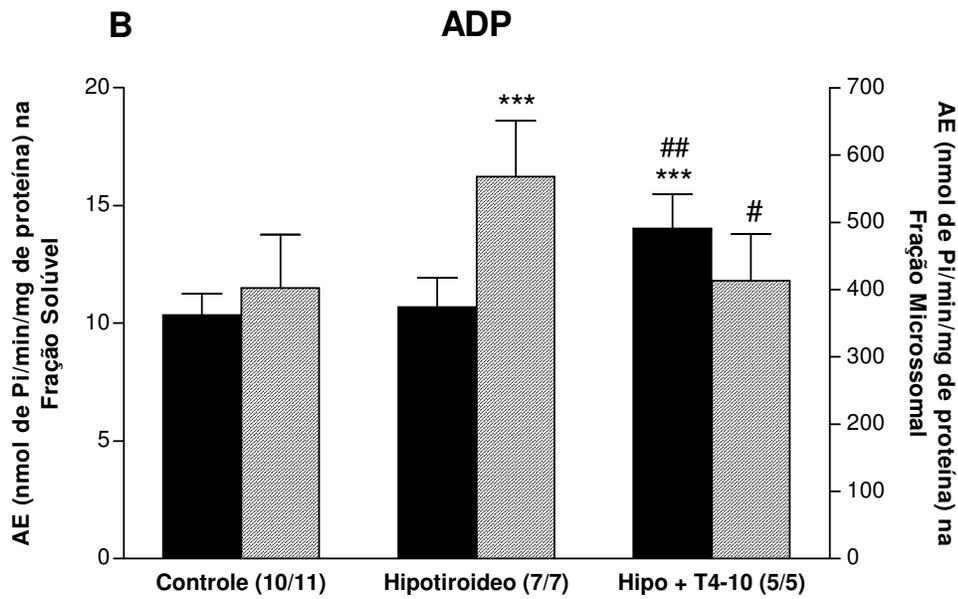
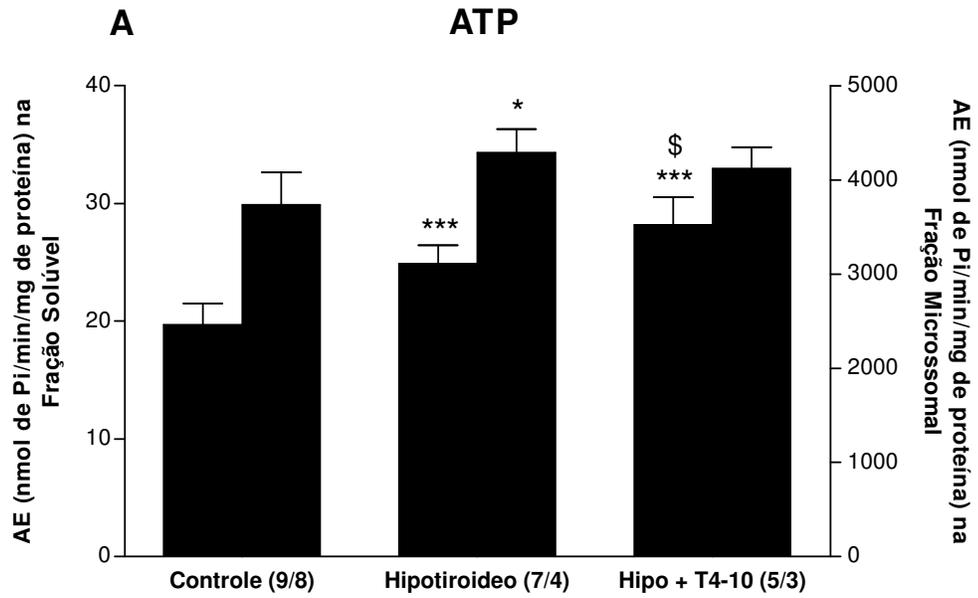
A FS do grupo hipotiroideo mostrou um aumento significativo ($p < 0,001$) da hidrólise de ATP, em relação ao grupo controle ($24,89 \pm 1,57$ versus $19,72 \pm 1,77$ nmol de Pi/min/mg de proteína). Com relação à hidrólise de ADP na FS, não houve qualquer alteração em relação ao grupo controle. Já no que diz respeito à hidrólise de AMP na FS, observou-se novamente um aumento significativo ($p < 0,001$) na atividade do grupo hipotiroideo em relação ao grupo controle ($21,57 \pm 1,73$ versus $13,30 \pm 1,34$ nmol de Pi/min/mg de proteína).

Quanto ao grupo hipo com reposição de T4-10, é possível observar que, na FS, a hidrólise de ATP não só se apresentou significativamente aumentada em relação ao grupo controle ($p < 0,001$), como também em relação ao grupo hipotiroideo ($p < 0,05$) com AE de $28,19 \pm 2,35$ nmol de Pi/min/mg de proteína. Na hidrólise de ADP observou-se também um aumento significativo ($p < 0,001$) da AE do grupo hipo + T4-10 em relação ao grupo controle e hipotiroideo, com AE de $14,03 \pm 1,46$ nmol de Pi/min/mg de proteína. Por outro lado, com relação à hidrólise de AMP, nota-se uma diminuição significativa da atividade específica em relação ao grupo hipotiroideo ($p < 0,001$). Esta diminuição da AE do grupo hipo + T4-10 retornou a um valor de atividade semelhante ao do grupo controle com AE de $14,45 \pm 2,07$ versus $13,30 \pm 1,34$ nmol de Pi/min/mg de proteína no controle.

Para a FM podemos observar que a cascata enzimática responsável por hidrolisar os nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP) está inteiramente ativada no grupo que apresenta

privação de hormônio tiroideano (hipotiroideo). Na hidrólise de ATP a atividade específica deste grupo foi aumentada significativamente ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle ($4289,61 \pm 248,33$ versus $3737,34 \pm 342,92$ nmol de Pi/min/mg de proteína no controle). Quanto à hidrólise de ADP observou-se também um aumento significativo ($p < 0,001$) na atividade específica do grupo experimental ($567,75 \pm 83,36$ comparado a $402,51 \pm 79,23$ nmol de Pi/min/mg de proteína no controle). Por fim, a hidrólise de AMP da FM do grupo hipotiroideo também foi aumentada significativamente ($p < 0,01$) em relação ao controle ($299,20 \pm 43,96$ versus $224,48 \pm 37,70$ nmol de Pi/min/mg de proteína no controle).

Quanto ao grupo hipo + T4-10, é possível observar que, na FM, apesar da hidrólise de ATP não ser significativamente diferente do controle, esta ainda se apresentou um pouco elevada ($4121,42 \pm 227,18$ nmol de Pi/min/mg de proteína) e próxima aos valores do grupo hipotiroideo. Ao contrário do observado na hidrólise de ATP, a hidrólise de ADP neste grupo se mostrou muito semelhante ao controle e com uma diminuição significativa ($p < 0,01$) na AE quando comparada ao grupo hipotiroideo apresentando AE de $413,47 \pm 69,36$ nmol de Pi/min/mg de proteína. Por fim, com relação à hidrólise de AMP nada ocorreu do ponto de vista estatístico, todavia observa-se, assim como na hidrólise de ATP, que a AE do grupo hipo + T4-10 ainda se apresentou um pouco elevada ($269,28 \pm 17,05$ nmol de Pi/min/mg de proteína) em relação ao grupo controle ($224,48 \pm 37,70$ nmol de Pi/min/mg de proteína), porém diminuída em relação ao grupo hipotiroideo ($299,20 \pm 43,96$ nmol de Pi/min/mg de proteína).



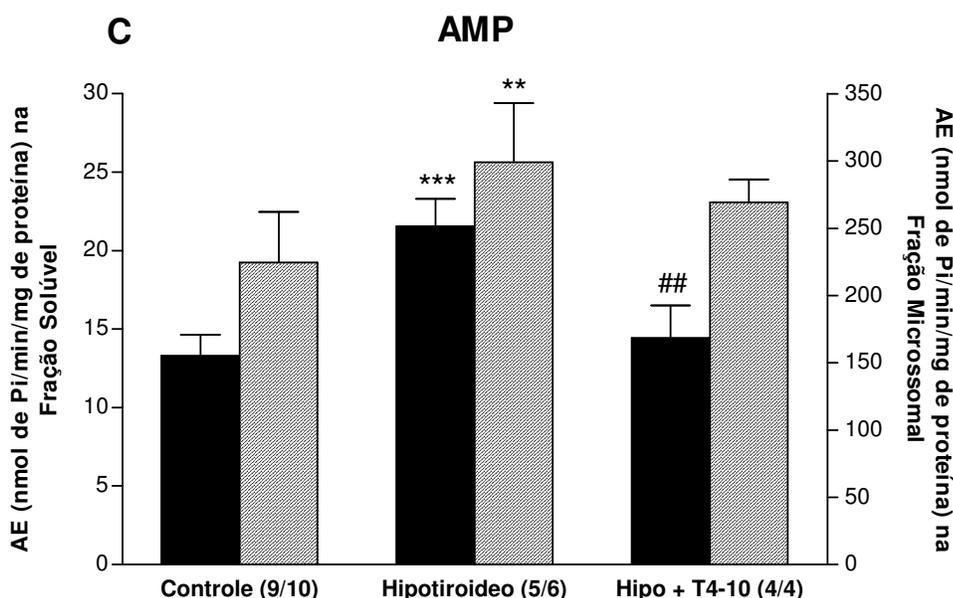


Figura 11 – Efeito do Hipotiroidismo e da Reposição Hormonal de T4 sobre a hidrólise dos nucleotídeos ATP (A), ADP (B) e AMP (C) nas Frações Solúvel e Microsomal de coração. Grupo Controle; Hipotiroideo – ratos tireoidectomizados + metimazol + CaCl₂ e Reposição Hormonal – ratos hipotiroideos (2 semanas) + T4-10 (2 semanas). Barras em preto representam a hidrólise dos nucleotídeos na FS e barras listradas representam a hidrólise dos nucleotídeos na FM. O número em parênteses representa o número de experimentos das frações solúvel e microsomal, respectivamente. Os resultados estão apresentados como Média ± DP e os dados foram analisados utilizando-se ANOVA, seguida do teste de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs Controle; \$ $p < 0,05$, # $p < 0,01$ e ## $p < 0,001$ vs Hipotiroideo.

4.6.5 – Razão de Hidrólise ATP:ADP nas Frações Solúvel e Microsomal

Considerando o previamente exposto na seção “Introdução”, referente à associação de um tipo específico de NTPDase com base na razão de hidrólise ATP/ADP (ZIMMERMANN, 2001) a razão de hidrólise em ambas as frações (FS e FM) das atividades ecto-ATPásica e ecto-ADPásica de cada um dos grupos estudados (Controle, T4-10, T4-25, T4-50, T3-10, Hipotiroideo e Hipotiroideo + T4-10) foi calculada e está apresentada na Tabela 3. Nota-se que esta razão manteve-se constante e praticamente similar à do grupo controle, independentemente do protocolo experimental utilizado, seja nos grupos induzidos ao hipertiroidismo ou ao hipotiroidismo com ou sem reposição hormonal (Tabela 3).

Tabela 3 – Razão ATPase/ADPase na Fração Solúvel e Microsomal, baseada na atividade específica (nmol de Pi liberado/min/mg de proteína) dos diferentes grupos estudados.

GRUPOS	FRAÇÃO SOLÚVEL			FRAÇÃO MICROSSOMAL		
	ATP	ADP	RAZÃO ATP:ADP	ATP	ADP	RAZÃO ATP:ADP
Controle	19,72 ± 1,77 (n=9)	10,35 ± 0,90 (n=10)	1,90	3737,34 ± 342,92 (n=8)	402,51 ± 79,23 (n=11)	9,28
T4-10	20,66 ± 1,47 (n=7)	10,27 ± 1,56 (n=9)	2,01	4083,55 ± 319,72 (n=6)	411,97 ± 54,29 (n=8)	9,91
T4-25	19,01 ± 1,67 (n=6)	9,73 ± 1,22 (n=8)	1,95	3765,29 ± 324,57 (n=8)	378,73 ± 18,91 (n=7)	9,94
T4-50	24,06 ± 1,23 (n=6)	10,31 ± 1,19 (n=8)	2,33	4042,81 ± 378,77 (n=8)	365,40 ± 50,33 (n=7)	11,06
T3-10	22,86 ± 2,69 (n=6)	10,83 ± 1,65 (n=5)	2,11	3943,53 ± 391,53 (n=6)	414,71 ± 66,01 (n=7)	9,51
Hipotiroideo	24,89 ± 1,57 (n=7)	10,69 ± 1,23 (n=7)	2,33	4289,61 ± 248,33 (n=4)	567,75 ± 83,36 (n=7)	7,56
Reposição Hormonal (Hipo + T4-10)	28,19 ± 2,35 (n=5)	14,03 ± 1,46 (n=5)	2,01	4121,42 ± 227,18 (n=3)	413,47 ± 69,36 (n=5)	9,97

Os resultados estão expressos como Média ± DP. n= número de experimentos.

4.7 – Análise da Expressão Protéica da Enzima Ecto-5'-Nucleotidase nas Frações Solúvel e Microssomal – Resultados Preliminares

Com o intuito de avaliar se alterações na atividade enzimática da 5'-nucleotidase promovidas por um determinado modelo experimental poderiam estar relacionadas a alteração nos níveis protéicos da enzima, experimentos de Western Blotting foram realizados. A imagem de um imunoblot representativo encontra-se apresentada na Figura 12 (A e B).

Inicialmente, foi avaliada, através dos experimentos de Western-Blotting, a expressão protéica da enzima ecto-5'-nucleotidase nas duas frações subcelulares extraídas de corações de animais sem qualquer tratamento. A expressão da enzima nas duas frações pode ser observada na Figura 12A. A análise desta figura mostra que na FS a expressão protéica da 5'-NT é menor quando comparada àquela encontrada na FM. Estes resultados comprovam, de certa forma, a eficiência do protocolo de isolamento das frações subcelulares, uma vez que é na fração microssomal que é encontrada a maior quantidade de proteína, em relação à solúvel.

A expressão protéica referente às duas frações (FS e FM) em grupos experimentais nos quais se observou alteração quanto à atividade enzimática, em relação ao grupo controle, foi avaliada, ou seja, grupos: controle, T4-50 e hipotiroideo. Novamente se observa que no grupo controle a banda relativa à FM é mais intensa em relação à da FS (Figura 12B). Ainda, embora que preliminares, os resultados parecem mostrar um pequeno aumento da expressão da enzima no grupo Hipo, na FS e, contrariamente uma diminuição neste grupo na FM. Estes experimentos deverão, portanto, ser repetidos por mais 2 vezes no mínimo, para que qualquer análise mais apurada desses resultados possa ser realizada, após a quantificação das bandas e a comparação em relação ao respectivo grupo controle.

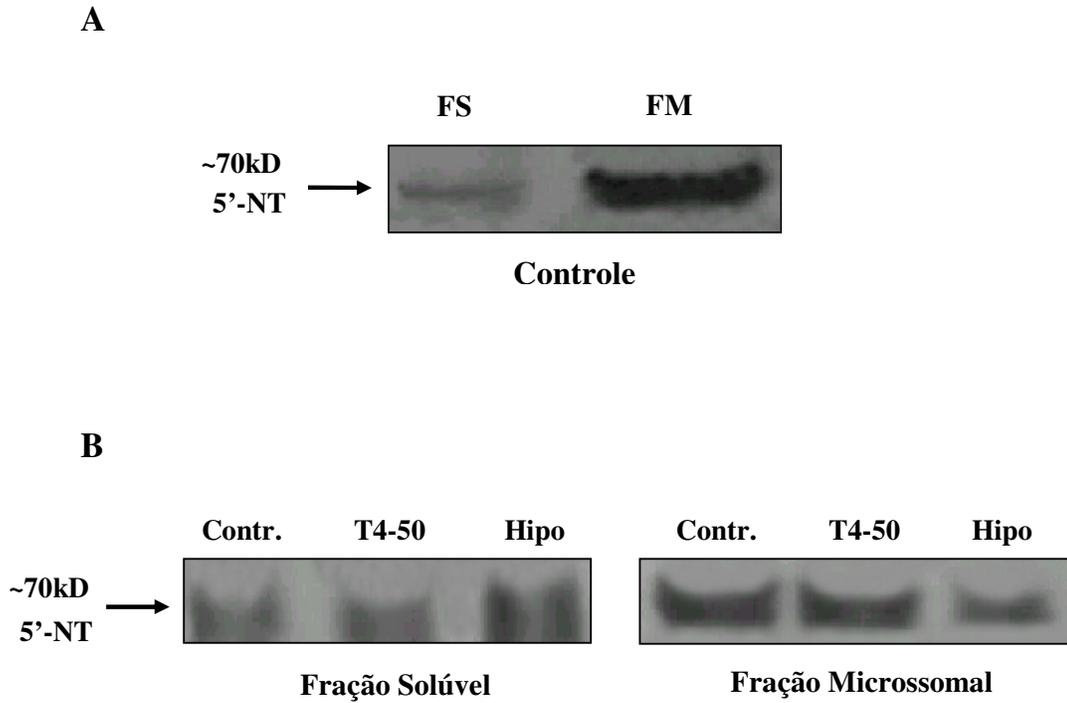


Figura 12 – Expressão protéica da enzima ecto-5'-nucleotidase nas frações solúvel e microssomal. A – Padronização da concentração do anticorpo anti 5'-NT e da expressão protéica desta enzima em cada uma das frações (FS e FM) em rato controle. B – Resultado preliminar da expressão protéica da 5'-NT nos grupos Controle (salina), T4-50 – 50µg de T4/100g de peso corpóreo e Hipotiroideo – ratos tireoidectomizados + metimazol + CaCl₂, realizado nas frações solúvel e microssomal de cada um dos grupos.

Os hormônios tiroideanos (T4/T3) sabidamente desempenham intensos efeitos no sistema cardiovascular e, alterações nos níveis destes hormônios como, por exemplo, no hipotireoidismo e hipertireoidismo podem levar a disfunções severas neste sistema (KLEIN & OJAMAA, 2001). Além disso, devido à presença de receptores nucleares para o hormônio tiroideano no coração, este órgão se torna um dos principais alvos de ação do HT, uma vez que os distúrbios cardiovasculares correspondem aos primeiros e principais eventos deflagrados no hiper e hipotireoidismo (KAHALY & DILLMANN, 2005). Esta ação pode se dar diretamente, através da ativação de genes sensíveis a iodotironinas (ação genômica) (DILLMANN, 2002) ou indiretamente, através da rápida ativação de cascatas intracelulares de sinalização (ação não-genômica) (DAVIS & DAVIS, 2002).

Os nucleotídeos de adenina, presentes em quantidades variáveis no espaço extracelular do sistema cardiovascular, desempenham importantes funções (alterações no funcionamento cardíaco, respostas vasomotoras, ativação plaquetária e processos inflamatórios) ao interagir com receptores específicos do tipo purinérgico (BURNSTOCK, 2006). A variedade de respostas (desencadeadas pela sinalização purinérgica), mediadas por estes receptores, não depende somente do tipo de receptor ativado (P1, P2X ou P2Y), mas também da célula com a qual este nucleotídeo/nucleosídeo extracelular interagiu. A concentração extracelular destes nucleotídeos/nucleosídeo de adenina é regulada pela complexa cascata de ecto-enzimas e enzimas solúveis que hidrolisam completamente o nucleotídeo trifosfato (ZIMMERMANN, 2001; ROBSON *et al.*, 2006). Porém, não menos importante que isto, as endonucleotidases também controlam a concentração extracelular destas moléculas, já que estes compostos têm a capacidade de serem transportados através da membrana plasmática.

Desta forma, pelo fato do HT e dos nucleotídeos de adenina desempenharem importantes ações no sistema cardiovascular foi verificado, neste estudo, a influência dos hormônios tiroideanos na cascata enzimática responsável por hidrolisar os nucleotídeos de

adenina (ATP, ADP e AMP) até a formação de adenosina, utilizando como modelo frações subcelulares (fração solúvel e microssomal) cardíacas.

Porém, antes mesmo da verificação do efeito do hormônio na atividade enzimática, foram verificados alguns parâmetro importantes para a caracterização do modelo experimental utilizado.

5.1 – Modelo de Hipertiroidismo e Hipotiroidismo Experimental

Neste item serão feitas considerações importantes do modelo estudado. Desta forma, a análise de parâmetros como peso corpóreo, água e ração, juntamente com a hipertrofia cardíaca, dosagem sérica dos hormônios (T3 e T4) e aqueles relacionados às alterações hemodinâmicas (PAS e FC), servem como um importante indício para a confirmação do estado eutiroideo, hipertiroideo ou hipotiroideo em que se encontravam os animais e claro, a eficiência do protocolo experimental. Diversos estudos contendo este tipo de abordagem já foram realizados (FOLEY *et al.*, 2001; KUZMAN *et al.*, 2005), inclusive estudos recentemente desenvolvidos por nosso grupo (HU *et al.*, 2003; ANJOS-RAMOS *et al.*, 2006; CARNEIRO-RAMOS *et al.*, 2006).

Com relação à caracterização do modelo, vimos que os animais do grupo controle, ao longo do tempo, como esperado, ganharam peso, uma vez que com a idade o metabolismo basal desses animais é diminuído, gastando menos energia e desenvolvendo aumento do peso corpóreo. Outro ponto importante é que esses animais são adultos jovens e, portanto, estão de certa forma em crescente desenvolvimento. Os animais dos grupos tratados com hormônio tiroideano não apresentaram diminuição do peso final em relação ao peso inicial, mas como esperado, tiveram uma diminuição do ganho de peso, ou até perda do mesmo, uma vez que o

HT tem como um dos seus principais efeitos o aumento do metabolismo basal em geral (YEN, 2001), modulando a atividade mitocondrial das células: consumo de oxigênio e capacidade bioenergética (GOLDENTHAL *et al.*, 2004). Todavia, poderia ser esperado que ao menos o grupo tratado com a maior dose de HT (T4-50) tivesse uma diminuição considerável do peso final em comparação ao peso inicial. Isso não foi evidenciado, mas pode ser explicado pelo grande aumento do consumo de água e ração, que ocorre como consequência da adaptação desses animais ao aumento do metabolismo, ou seja, consomem muito mais do que gastam. No estado hipotiroideo o aumento de peso é característico, uma vez que os animais nesse estado apresentam uma diminuição do metabolismo basal pela falta de HT. Por outro lado, estando os níveis de T3 e T4 diminuídos ou até ausentes, uma das principais funções destes hormônios, que é a de estimular a síntese protéica de maneira geral, fica absolutamente comprometida (KLEIN & OJAMAA, 2001; TANG *et al.*, 2005), o que pode explicar a diminuição de peso que algumas vezes se observa neste modelo experimental, como ocorreu em nosso estudo.

Neste trabalho foram avaliados ainda alguns parâmetros hemodinâmicos, como frequência cardíaca (FC) e pressão arterial sistólica (PAS), ao longo de todo o tratamento. Os resultados obtidos frente a estes parâmetros estão de acordo com os encontrados na literatura (YEN, 2001; KLEIN & OJAMAA, 2001) e mostram que os grupos tratados com hormônio tiroideano tiveram a FC e a PAS aumentadas em relação ao grupo controle, ocorrendo o inverso no grupo hipotiroideo, o que caracteriza o estado hiper e hipotiroideo, respectivamente. Alguns trabalhos têm ainda mostrado uma importante interação dos HT com o Sistema Renina-Angiotensina na modulação destes parâmetros hemodinâmicos (HU *et al.*, 2003; CARNEIRO-RAMOS *et al.*, 2006).

Um outro parâmetro avaliado neste estudo foi a relação peso ventricular (Ventrículo Direito + Ventrículo Esquerdo) – peso corpóreo, o qual dá uma idéia do desenvolvimento ou

não da massa cardíaca, em relação ao crescimento ou não do animal. Todos os grupos que receberam tratamento com HT (T4 ou T3) apresentaram aumento da massa cardíaca em relação ao grupo eutiroideo, de maneira dose-dependente. A instalação da hipertrofia evidencia o efeito do hormônio tiroideano, capaz de promover um aumento total na síntese de proteínas no tecido cardíaco, principalmente proteínas contráteis associadas aos cardiomiócitos, células estas, responsáveis pela contração cardíaca. Esses resultados estão de acordo com trabalhos da literatura (FOLEY *et al.*, 2001; DEGENS *et al.*, 2003; KUZMAN *et al.*, 2005) e também com estudos já publicados de nosso grupo que demonstraram um aumento da hipertrofia cardíaca provocada pelo HT na dose de T4-10, seja com tratamento de 7 dias (HU *et al.*, 2003; ANJOS-RAMOS *et al.*, 2006) ou 14 dias (CARNEIRO-RAMOS *et al.*, 2006).

Assim, com base nos resultados discutidos previamente, tem-se a idéia da confirmação do estado hipertiroideo, nos animais tratados com T4 e T3, ou hipotiroideo, nos animais tireoidectomizados tratados com metimazol + CaCl₂, além dos resultados referentes às dosagens séricas, os quais corroboram os anteriores.

5.2 – Presença das Ectonucleotidases nas Frações Subcelulares

Com o intuito de avaliar quais as condições ideais para a análise posterior da atividade enzimática nas diferentes situações experimentais, uma padronização dos ensaios bioquímicos foi previamente realizada. Assim, experimentos variando o tempo de incubação ou a concentração de proteína incubada para os diferentes nucleotídeos (ATP, ADP e AMP) foram realizados nas duas frações isoladas. No que se refere à concentração ideal do substrato, esta já havia sido previamente estabelecida nas duas frações subcelulares em trabalho anterior realizado pelo grupo (SPIER & SARKIS, 2004).

Primeiramente foi demonstrado que tanto a FS como a FM hidrolisam os nucleotídeos ATP, ADP e AMP, sugerindo a presença das enzimas NTPDase e 5'-NT. É importante salientar que a hidrólise dos nucleotídeos (ATP, ADP e AMP) na FM foi mais acentuada que na FS, considerando tanto a liberação de nmol de Pi como a atividade específica. Isto se deve ao fato de que na FM encontram-se especificamente as ecto-enzimas (enzimas de membrana), embora não possa ser descartada a possível existência das NTPDases 5 e 6, que estão associadas ao retículo endoplasmático ou aparelho de golgi e que não podem ser separadas no isolamento das frações (WANG & GUIDOTTI, 1998). Já na FS, além das ecto-enzimas em solução (que podem ter sido originadas das membranas das células cardíacas, uma vez que o estresse mecânico provocado pelo próprio processo de isolamento das frações pode romper a ancoragem destas enzimas na membrana), encontra-se ainda uma série de outras enzimas (no interior de organelas citoplasmáticas – nucleotidases e também circulantes (solúveis), no interstício do tecido), fazendo com que a quantidade de ectonucleotidases presentes nesta fração seja muito menor.

De acordo com os resultados obtidos e considerando ainda a razão de hidrólise destes nucleotídeos, podemos sugerir, com base na razão da atividade específica ATPase/ADPase, qual o tipo de NTPDase envolvida (do tipo 1, 2 ou 3), de acordo com ZIMMERMANN (2001). Assim, para a FS, a razão ATPase/ADPase de 1,9 indicaria uma enzima NTPDase do tipo 3, caracterizada por apresentar valores de razão de hidrólise entre 1 e 3 ou até mesmo a NTPDase do tipo 8, que apresenta uma razão de hidrólise de até 2 (BIGONNESSE *et al.*, 2004). Com relação à FM, a razão ATPase/ADPase de 9,8 indicaria ser uma enzima NTPDase do tipo 2, que se caracteriza por apresentar valores de razão de hidrólise de até 30, já que esta enzima apresenta uma grande preferência por nucleotídeos trifosfatos. Ainda na FS, há que considerar que as NTPDases intracelulares estão em grande quantidade nesta fração e contribuem bastante para a hidrólise destes nucleotídeos, apesar de terem uma maior

preferência para os nucleotídeos difosfatos de uracila, guanina e citosina aos nucleotídeos de adenina (ROBSON *et al.*, 2006).

Quanto à hidrólise do AMP, os resultados indicam para a presença da enzima 5'-nucleotidase também nas duas frações (FS e FM), apresentando a FM uma AE mais elevada, o que está de acordo com a maior expressão protéica observada nessa fração, avaliada nos ensaios de imunobloting. A atividade da enzima 5'-nucleotidase é de fundamental importância para a formação de adenosina, a qual exerce importante efeito cárdio-protetor, por atuar como molécula vasodilatadora, aliada ao fato de que o ATP (vasoconstritor e citotóxico) e o ADP (agregador plaquetário), quando em concentrações elevadas, apresentam uma série de efeitos prejudiciais, os quais se associam a inúmeras condições patológicas (BURNSTOCK, 2006). Uma vez ocorrendo a hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP pela NTPDase do tipo 2 e 3 e/ou 8, mais AMP é formado, de modo a aumentar ainda mais os níveis do produto final (adenosina), favorecendo assim os efeitos protetores no coração.

5.3 – Hormônio Tiroideano e Ectonucleotidases

Frente aos resultados de hidrólise do ATP e do ADP após tratamento com o hormônio tiroideano, apenas no grupo T4-50 foi observado efeito da ação deste hormônio e, ainda assim, restrito às enzimas da FS. Já na FM, não foi observada nenhuma diferença significativa nas hidrólises do ATP, ADP e AMP. Considerando então que o T4 estimulou a atividade ATPásica e inibiu a atividade AMPásica na FS imagina-se que haja um aumento de ADP e AMP intracelular. O ADP, principal agente recrutador de plaquetas por ativar receptores de membrana do tipo P2Y₁ e P2Y₁₂ presentes nas plaquetas (ANDRE *et al.*, 2003), se transportado para o meio extracelular, pode permanecer por mais tempo neste microambiente, já que a atividade ADPásica das enzimas de membrana permaneceu com sua atividade basal,

o que facilitaria a agregação plaquetária. Além disso, a diminuição dos níveis de adenosina no tecido cardíaco, dada pela diminuição da atividade AMPásica pode implicar na redução do efeito cardioprotetor provocado por este nucleosídeo, já que, uma vez a adenosina formada, age: promovendo vasodilatação em leitos vasculares, através de receptores A2a e A2b (VILLARREAL *et al.*, 2003), inibindo a agregação de trombócitos (BAKKER *et al.*, 1994) e ainda, através do receptor A1, atenuando a estimulação β -adrenérgica (VILLARREAL *et al.*, 2003) a hipertrofia cardíaca e a disfunção miocárdica (LIAO *et al.*, 2003). Apesar disso, AMP (anti-agregador plaquetário), se transportado para o meio extracelular, permanece por mais tempo neste meio (já que a atividade AMPásica da FM não foi alterada), diminuindo a resposta inicialmente facilitada pelo ADP. Por outro lado, sabendo dos efeitos do HT em provocar diminuição da resistência periférica e, portanto vasodilatação, estes talvez pudessem explicar, pelo menos em parte, a diminuição na produção de adenosina, o que intensificaria ainda mais o efeito vasodilatador.

Ao observarmos isoladamente os resultados obtidos nas frações subcelulares cardíacas frente aos tratamentos com o hormônio tiroideano, a princípio, eles parecem não concordar com outros resultados previamente obtidos por nosso grupo. CARNEIRO-RAMOS *et al.* (2004) e BARRETO-CHAVES *et al.* (2006) demonstraram, em culturas primárias de cardiomiócitos de ratos neonatos, o aumento da atividade e da expressão gênica da 5'NT, maior responsável pela formação da adenosina, e ainda o aumento da atividade e expressão gênica da NTPDase 3, após tratamento com hormônio tiroideano (T3). No entanto, considerando que no presente estudo foi utilizado um modelo experimental distinto do anterior, ou seja, frações subcelulares do tecido cardíaco ao invés de um tipo celular específico, é possível que esta diferença se deva, por exemplo, a um comportamento diferenciado de outros tipos celulares presentes nas frações, já que se considera no atual modelo a somatória de todas as células presentes no tecido cardíaco (cardiomiócitos,

fibroblastos cardíacos, células endoteliais, células de defesa, entre outras). Além disso, merece ser destacada aqui a importância que os fibroblastos apresentam na formação do tecido cardíaco, sendo responsáveis por 2/3 do número total de células (WEBER & BRILLA, 1991).

Ainda com relação aos resultados obtidos no grupo hipertiroideo, como já comentado anteriormente, o fato da diminuição da atividade AMPásica ser prejudicial ao sistema, pois diminuiria a quantidade de adenosina e assim o efeito cardioprotetor, não apresenta um efeito tão maléfico se outros fatos forem levados em consideração. O estado hipertiroideo sabidamente aumenta o dinamismo cardíaco (KLEIN & OJAMAA, 2001), modula a síntese protéica, levando ao aumento de uma série de proteínas como, por exemplo, da α -miosina de cadeia pesada, que posteriormente leva à hipertrofia cardíaca (FADEL *et al.*, 2000; KAHALY & DILLMANN, 2005) e também ao aumento do metabolismo em geral com expressivo aumento na atividade da enzima citrato sintase (responsável pela formação de citrato, 1º produto formado no ciclo de Krebs) (FOLEY *et al.*, 2001; GOLDENTHAL *et al.*, 2004). Portanto, pode-se pensar que se uma quantidade excessiva de ATP for formada e se a cascata enzimática não estiver modulando a hidrólise destes nucleotídeos corretamente (com algum desequilíbrio na cascata ATP-ADP-AMP-adenosina), o aumento da adenosina passaria a ter efeito maléfico, já que em altas concentrações (da ordem de micromolar) a adenosina passa a ser tóxica e ter um efeito atípico, normalmente mediado pelo receptor A3, a qual após sua ligação provoca morte celular (JACOBSON *et al.*, 1999). Assim sendo, acredita-se que o hormônio tiroideano esteja contrabalanceando por meio das ectonucleotidases e endonucleotidases da FS o efeito que as altas concentrações de ATP provocariam no meio extracelular e ou intracelular. O ATP em altas concentrações poderia originar um excessivo estado contrátil do coração ao se ligar nos receptores P2X₁, P2X₂ e P2X₄ das células musculares (BURNSTOCK, 2006) e, portanto, a diminuição dos níveis desse nucleotídeo

como observado na FS (aumento da atividade ATPásica) podem significar um importante fator de prevenção deste estado.

Além disso, a menor produção de adenosina encontrada no hipertiroidismo pode ser um mecanismo importante para a não intensificação dos efeitos maléficos do excesso de HT no coração uma vez que VIRDIS *et al.* (1999) demonstraram em trabalho realizado com artérias coronárias de pacientes hipertensos que a infusão de adenosina exógena estimula a liberação de renina ativa e então aumentando a formação de angiotensina II (principal efector do sistema renina angiotensina, importante no controle da pressão arterial e balanço hidroeletrólítico); levando a um sinergismo nos distúrbios da função cardíaca provocado pelo hormônio tiroideano devido à interação já observada entre esses dois sistemas (CARNEIRO-RAMOS *et al.*, 2006).

É claro que, além disso, temos que considerar ainda as ectonucleotidases solúveis, como NTPDases, NPPs e 5'-NT, as quais desempenham importante papel na regulação da concentração extracelular destes nucleotídeos, mantendo a homeostasia tecidual, assim como as NTPDases intracelulares (5 e 6) que também de alguma forma podem se tornar solúveis (pela quebra da porção N-terminal quando ancoradas na membrana – Fig.1) e contribuir para a homeostasia destes nucleotídeos. Merece um destaque maior a NTPDase do tipo 6, já que esta parece ser predominantemente encontrada no coração, ao contrário da NTPDase 5, e que, provavelmente, tem um importante papel na manutenção da circulação cardíaca por apresentar uma preferência pelos nucleotídeos difosfatos, ou seja, metaboliza ADP e bloqueia a futura ativação e recrutamento plaquetário naquele leito vascular (YEUNG *et al.*, 2000).

Alguns estudos com diferentes modelos experimentais têm sido realizados para demonstrar a importância dessas enzimas solúveis (YEGUTKIN *et al.*, 2000; OSES *et al.*, 2004; POCHMANN *et al.*, 2004).

Contrariamente ao que foi observado em situações de hipertiroidismo, a privação do hormônio tiroideano (grupo hipotiroideo) levou a um aumento significativo de toda a cascata enzimática na FM, ou seja, estimulou a hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP, e ainda estimulou as atividades ATPásica e AMPásica na FS. Estes resultados favorecem um aumento na formação dos níveis de adenosina no coração, já que o complexo multi-enzimático está completamente ativado, o que talvez contribua para a manutenção da função cardíaca, a qual se tornou prejudicada pela falta do hormônio tiroideano. Considerando que o metabolismo celular encontra-se diminuído em situações de hipotiroidismo e, conseqüentemente, menor formação de ATP está ocorrendo, os resultados deste estudo sugerem que o pouco ATP formado está sendo rapidamente hidrolisado a AMP. Somando-se a isso, a atividade aumentada da enzima 5'-NT tanto na FS quanto na FM leva ao aumento dos níveis de adenosina, que ao atuar no receptor A2a, protege contra a inflamação vascular pela diminuição da expressão de moléculas de adesão (VCAM-1) e contra a hiperplasia da camada neoíntima (ZERNECKE *et al.*, 2006), características essas que se não prevenidas, podem levar a aterosclerose, trombose, hipotensão arterial e posteriormente a um infarto do miocárdio, que geralmente são encontrados no hipotiroidismo justamente por estar este associado à hipercolesterolemia e à hipertensão (KLEIN & OJAMAA, 2001; KAHALY & DILLMANN, 2005).

Tendo em vista os resultados de reposição hormonal do presente estudo foi observado que este tratamento não foi eficiente em reverter o aumento das atividades NTPDásica e 5'-nucleotidásica na FS tão pouco na FM. Considerando a tendência que se observa quanto às hidrólises de ATP e de AMP, na FM, de voltarem aos níveis encontrados no controle, talvez se o tratamento de reposição hormonal fosse continuado por um tempo mais longo, houvesse uma diminuição da AE com valores próximos ao controle. Contudo, no que diz respeito à

hidrólise de AMP na FS, a reposição hormonal foi bem eficaz para restituir os valores para próximos do controle. Isso demonstra a grande importância e a plasticidade da enzima 5'-nucleotidase presente na fração solúvel, pois esta foi modulada negativa ou positivamente em ambos os casos de distúrbios hormonais (hiper e hipotiroidismo), e ainda, retornou a níveis basais quando na reposição do hormônio. Essa plasticidade da 5'-nucleotidase na FS é mais um forte indício de que o gene desta enzima é regulado pelo HT. Segundo SPYCHALA *et al.* (1999), o promotor do gene da 5'-NT apresenta muitos sítios de ligação para o fator de transcrição Sp1 que interage com proteínas associadas a fatores de ligação do receptor de hormônio tireoideano (TAFs) e que por si ativaria a transcrição.

Curiosamente, na hidrólise de ATP da FS, ao invés de retornar aos níveis basais, esta se manteve alta e ainda superior ao grupo hipotiroideo. Aparentemente, este resultado não indica um efeito de desregulação desta cascata enzimática, uma vez que a hidrólise de ADP também esteve aumentada e, portanto, não há o desequilíbrio no sentido de apenas formar mais ADP. O único desequilíbrio estaria ocorrendo no sentido de formar mais AMP (substrato para a formação de adenosina), o qual talvez não fosse totalmente hidrolisado, uma vez que a atividade da 5'-NT foi revertida, o que também não acarretaria em maiores danos.

Na FM foi observado que o HT foi capaz de reverter eficientemente apenas a atividade ADPásica. Temos que levar em conta que o animal que era hipotiroideo, ao receber a reposição hormonal, começa a ter uma diminuição dos riscos de aterosclerose e trombose, pois teoricamente este animal volta a estar submetido às ações do HT e, portanto, passa a ter o retorno das funções fisiológicas cardíacas com breve retorno da FC, aumento do fluxo sanguíneo e diminuição da resistência vascular, o que dificultaria a formação de trombos.

Outras enzimas que não foram abordadas e que poderiam explicar alguns dos resultados obtidos neste trabalho frente ao tratamento ou não com hormônio tireoideano são as

enzimas NPPs (fosfodiesterase) e a fosfatase alcalina, capazes de hidrolisar ATP até adenosina.

Um outro resultado apresentado neste estudo, mas que merece inúmeras ressalvas, diz respeito à análise da razão de hidrólise ATP:ADP. Até um tempo atrás a análise desta razão correspondia a um parâmetro importante para inferir o tipo de NTPDase que estaria envolvida com determinada resposta (ZIMMERMANN, 2001; BIGONNESSE *et al.*, 2004). Sendo assim, com base em nossos resultados, para a FS é possível sugerir a participação das NTPDase 3 e/ou 8 e para a FM a NTPDase do tipo 2. Estes achados, onde se infere o tipo específico de enzima, estão de acordo com os citados por SÉVIGNY *et al.* (2002). Estes autores demonstraram, em corações de ratos, um notável aumento na razão ATP-ADP (da ordem de 10), o qual foi confirmado por imunohistoquímica, através da identificação da NTPDase 2 – uma ecto-ATPase preferencial, que promove ativação plaquetária por converter ATP em ADP. Além disso, OLIVEIRA *et al.* (1997) identificou em sarcolema cardíaco de ratos a presença da NTPDase 1, enzima “chave” por modular ativação plaquetária e formação de trombos, encontrada principalmente em leitos vasculares (células endoteliais) (MARCUS *et al.*, 2003), demonstrando então, juntamente com o já citado (BARRETO-CHAVES *et al.*, 2006), a presença e a coexistência das NTPDases 1, 2 e 3 no tecido cardíaco. Ainda, com relação à expressão dessas enzimas no tecido cardíaco, assim como SÉVIGNY *et al.* (2002), ZINCHUK *et al.* (1999 e 2002) caracterizaram a presença da NTPDase 2 em cardiomiócitos e YEUNG *et al.* (2000) identificaram a presença da NTPDase 6, tanto solúvel quanto associada à membrana plasmática, além da sua localização clássica (em retículo endoplasmático e aparelho de golgi) (BRAUN *et al.*, 2000).

Portanto, embora a análise dessas razões de atividades enzimáticas sugerirem um ou outro tipo de NTPDase envolvida, estudos complementares que permitam a avaliação da

expressão protéica em cada uma das frações subcelulares, frente ao mesmo estímulo, deverão ser realizados para a confirmação de qual enzima ou enzimas estariam de fato envolvidas na hidrólise desses nucleotídeos. Além disso, recentemente, ROBSON *et al* (2006) sugeriram um outro tipo completamente diferente de abordagem para a avaliação do tipo específico de NTPDase, a qual não leva em consideração qualquer razão de hidrólise de nucleotídeos, mas sim a cinética de hidrólise dos mesmos, que parece ser diferente conforme a enzima envolvida. Desta forma, estas abordagens mais novas, descritas recentemente na literatura, mostram que a utilização da razão de hidrólise dos nucleotídeos pode levar à produção de resultados errôneos e de difícil interpretação.

Além dos objetivos principais deste estudo foi avaliada, paralelamente, a diferença da hidrólise promovida pelo T3, em comparação à observada pelo T4, utilizando doses equimolares à dose fisiológica de cada um dos hormônios tiroideanos (TROST *et al.*, 2000; PANTOS *et al.*, 2002). Considerando que, na sua maior parte, o efeito biológico do T4 se dá a partir da sua conversão em T3, cuja atividade é expressivamente maior, seria de esperar que, ao usar o tratamento direto com T3 (10 vezes a dose fisiológica), uma resposta mais intensa quanto à hidrólise dos nucleotídeos fosse observada, em comparação àquela do grupo T4-10. Esta hipótese não foi confirmada uma vez que o T3 não foi capaz de modular a atividade das ectonucleotidases, exceto na hidrólise de ATP na FS. As dosagens séricas de T3 e T4 realizadas no grupo T3-10 e os dados referentes à hipertrofia, permitem que se descarte qualquer possibilidade de não eficiência do protocolo experimental. Neste sentido, os níveis séricos de T4 se apresentaram extremamente inferiores a todos os grupos tratados com o T4, inclusive em relação ao controle. Este fato pode ser elucidado com base na retroalimentação negativa regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-tireóide devido ao aumento exacerbado de T3. Resultados similares já foram demonstrados em camundongos por FREITAS *et al.*

(2005). Uma possível hipótese para explicar a ausência do efeito do T3 sobre a hidrólise dos nucleotídeos pode ser o fato da dose utilizada, que, apesar de corresponder a 10 vezes a fisiológica, pode ser que não seja suficiente, em virtude da rápida metabolização do hormônio, para provocar qualquer tipo de ação sobre a atividade dessas enzimas no coração.

Por fim, um ponto que merece ser levado em consideração é que nenhuma associação entre a hidrólise dos nucleotídeos e o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca induzida pelos hormônios tiroideanos pode ser estabelecida. Portanto, os efeitos sobre as atividades ectonucleotidásicas observados nos diferentes grupos experimentais, seja na FS como na FM, representam uma ação direta do excesso ou da diminuição (ou ausência) dos hormônios tiroideanos e não um efeito mediado pelas alterações (hemodinâmicas ou morfológicas) que os estados de hiper e de hipotiroidismo deflagram, fazendo com que possamos considerá-los processos absolutamente independentes.

6 – CONCLUSÕES

Com base no exposto anteriormente podemos concluir que:

1 – A metodologia para análise da hidrólise do ATP, ADP e AMP em frações subcelulares cardíacas foi eficientemente estabelecida.

2 – O Hipertiroidismo (grupo T4-50) modula positivamente a atividade ATPásica da FS e negativamente a atividade da 5'-nucleotidase da mesma fração, contribuindo para uma menor produção de adenosina neste modelo, reduzindo então o efeito cardioprotetor mediado por este nucleosídeo;

3 – O Hipotiroidismo modula positivamente toda a cascata enzimática da FM (NTPDase e 5'-nucleotidase) e a atividade ATPásica e AMPásica da FS, favorecendo uma maior produção de adenosina, o que poderia contribuir com a manutenção da função cardíaca prejudicada pela falta de hormônio tiroideano;

4 – A Reposição Hormonal após o estabelecimento do hipotiroidismo foi capaz de reverter o aumento da atividade AMPásica na FS e ADPásica na FM, além de aumentar a atividade ATPásica e ADPásica na FS;

5 – As alterações no trofismo cardíaco ou em parâmetros hemodinâmicos, como consequência dos estados de hipo ou hipertiroidismo são eventos absolutamente independentes da modulação da atividade ectonucleotidásica, não se estabelecendo qualquer relação causal entre estes eventos.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBRACCHIO, M. P.; BOEYNAEMS, J. M.; BARNARD, E. A.; BOYER, J. L.; KENNEDY, C.; MIRAS-PORTUGAL, M. T.; KING, B. F.; GACHET, C.; JACOBSON, K. A.; WEISMAN, G. A.; BURNSTOCK, G. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 2, p. 52-55, 2003.

AIRAS, L.; NIEMELA, J.; SALMI, M.; PUURUNEN, T.; SMITH, D. J.; JALKANEN, S. Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells. **J. Cell. Biol.**, v. 136, n. 2, p. 421-431, 1997.

ALLEVA, K. E.; ESPELT, M. V.; KRUMSCHNABEL, G.; SCHWARZBAUM, P. J. Identification of two distinct E-NTPDases in liver of goldfish (*Carassius auratus* L.). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 131, n. 4, p. 725-731, 2002.

ANDRE, P.; DELANEY, S.; LAROCCA, T.; VINCENT, D.; DEGUZMAN, F.; JUREK, M.; KOLLER, B.; PHILLIPS, D. R.; CONLEY, P. P2Y₁₂ regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth and thrombus stability in injured arteries. **J. Clin. Invest.**, v. 112, p. 398-406, 2003.

ANJOS-RAMOS, L.; CARNEIRO-RAMOS, M. S.; DINIZ, G. P.; MARTINS-SILVA, J.; BARRETO-CHAVES, M. L. M. Early cardiac hypertrophy induced by thyroxine is accompanied by an increase in VEGF-A expression but not by an increase in capillary density. **Virchows Arch.**, v. 448, p. 472-479, 2006.

BAKKER, W. W.; POELSTRA, A.; BARRADAS, K.; MIKHAILIDIS, M. A. Platelets and ectonucleotidases. **Platelets**, v. 5, p. 121-129, 1994.

BARRETO-CHAVES, M. L. M.; CARNEIRO-RAMOS, M. S.; COTOMACCI, G.; COUTINHO, M. B. Jr.; SARKIS, J. J. F. E-NTPDase 3 (ATP diphosphohydrolase) from cardiomyocytes, activity and expression are modulated by thyroid hormone. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 251, n. 1-2, p. 49-55, 2006.

BASSET, A.; BLANC, J.; MESSAS, E.; HAGÈGE, A.; ELGHOZI, J. L. Renin-angiotensin system contribution to cardiac hypertrophy in experimental hyperthyroidism: an echocardiographic study. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 37, n. 2, p. 163-172, 2001.

BATTASTINI, A. M. O.; OLIVEIRA E. M.; MOREIRA, C. M.; BONAN, C. D.; SARKIS, J. J. F., DIAS, R. D. Solubilization and characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) from rat brain synaptic plasma membranes. **Biochem. Mol. Int.**, v. 37, n. 2, p. 209-219, 1995.

BIANCO, A. C.; SALVATORE, D.; GEREBEN, B.; BERRY, M. J.; LARSEN, P. R. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 1, p. 38-89, 2002.

BIEDERBICK, A.; ROSE, S.; ELSÄSSER, H. P. A human intracellular apyrase-like protein, LALP70, localizes to lysosomal/autophagic vacuoles. **J. Cell. Sci.**, v. 112, p. 2473-2484, 1999.

BIGONNESSE, F.; LEVESQUE, S. A.; KUKULSKI, F.; LECKA, J.; ROBSON, S. C.;
FERNANDES, M. J. G.; SEVIGNY, J. Cloning and characterization of mouse nucleoside
triphosphate diphosphohydrolase-8. **Biochemistry**, v. 43, n. 18, p. 5511-5519, 2004.

BODIN, P.; BAILEY, D.; BURNSTOCK, G. Increased flow-induced ATP release from
isolated vascular endothelial cells but not smooth muscle cells. **Br. J. Pharmacol.**, v. 103,
n. 1, p. 1203-1205, 1991.

BORST, M. M.; SCHRADER, J. Adenine nucleotide release from isolated perfused guinea
pig hearts and extracellular formation of adenosine. **Circ. Research**, v. 68, n. 3, p. 797-
806, 1991.

BOWDITCH, J.; NIGDIKAR, S.; BROWN, A. K.; DOW, J. W. 5' Nucleotidase activity of
isolated mature rat cardiac myocytes. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 845, n. 1, p. 21-26,
1985.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical
Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAUN, N.; FENGLER, S.; EBELING, C.; SERVOS, J.; ZIMMERMANN, H. Sequencing,
functional expression and characterization of rat NTPDase6, a nucleoside diphosphatase
and novel member of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family.
Biochem. J., v. 351, pt. 3, p. 639-647, 2000.

BRUNO, A. N.; DINIZ, G. P.; RICACHENEVSKY, F. K.; POCHMANN, D.; BONAN, C. D.; BARRETO-CHAVES, M. L. M.; SARKIS, J. J. F. Hypo- and hyperthyroidism affect the ATP, ADP and AMP hydrolysis in rat hippocampal and cortical slices. **Neuroscience Research**, v. 52, n. 1, p. 61-68, 2005.

BUCKWALTER, J. B.; TAYLOR, J. C.; HAMANN, J. J.; CLIFFORD, P. S. Do P2X purinergic receptors regulate skeletal muscle blood flow during exercise? **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 286, n. 2, p. H633-H639, 2004.

BURNSTOCK, G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 1, p. 58-86, 2006.

CALDWELL, C.; NORMAN, V.; URBINA, A.; JARVIS, A.; QUINONEZ, C.; STEMM, M.; DAHMS, A. S. Regulatory differences among avian ecto-ATPases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 238, n. 3, p. 728-732, 1997.

CARNEIRO-RAMOS, M. S.; DA SILVA, V. B.; COUTINHO, M. B. Jr.; BATTASTINI, A. M. O.; SARKIS, J. J. F.; BARRETO-CHAVES, M. L. M. Thyroid hormone stimulates 5'-ecto-nucleotidase of neonatal rat ventricular myocytes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 265, n. 1-2, p. 195-201, 2004.

CARNEIRO-RAMOS, M. S.; SILVA, V. B.; SANTOS, R. A.; BARRETO-CHAVES, M. L. M. Tissue-specific modulation of angiotensin-converting enzyme (ACE) in hyperthyroidism. **Peptides**, 2006.

CHADWICK, B.P., FRISCHAUF, A.M. Cloning and mapping of a human and mouse gene with homology to ecto-ATPase genes. **Mamm. Genome**, v. 8, n. 9, p. 668-672, 1997.

CHAN, K-M.; DELFERT, D.; JUNGER, K. D.; A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 157, n. 2, p. 375-380, 1986.

DAVIS, P. J.; DAVIS, F. B. Nongenomic actions of thyroid hormone on the heart. **Thyroid**, v. 12, n. 6, p. 459-466, 2002.

DEGENS H.; GILDE, A. J.; LINDHOUT, M.; WILLEMSSEN, P. H. M.; VAN DER VUSSE G. J.; VAN BILSEN, M. Functional and metabolic adaptation of the heart to prolonged thyroid hormone treatment. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 284, p. H108-H115, 2003.

DI VIRGILIO, F. The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. **Immunol. Today**, v. 16, n. 11, p. 524-528, 1995.

DI VIRGILIO, F. SOLINI, A. P2 receptors: new potential players in atherosclerosis. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, n. 4, p. 831-842, 2002.

DILLMANN, W. H. Cellular action of thyroid hormone on the heart. **Thyroid**, v. 12, n. 6, p. 447-452, 2002.

ESCALADA, A.; NAVARRO, P.; ROS, E.; ALEU, J.; SOLSONA, C. Gadolinium inhibition of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity in *Torpedo* electric organ. **Neurochemical Research**, v. 29, n. 9, p. 1711-1714, 2004.

FADEL, B. M.; ELLAHHAM, S.; RINGEL, M. D.; LINDSAY, J. Jr.; WARTOFSKY, L.; BURMAN, K. D. Hyperthyroid heart disease. **Clin. Cardiol.**, v. 23, n. 6, p. 402-408, 2000.

FLOREANI, M.; NAPOLI, E.; QUINTIERI, L.; PALATINI, P. Oral administration of *trans*-resveratrol to guinea pigs increases cardiac DT-diaphorase and catalase activities, and protects isolated atria from menadione toxicity. **Life Sciences**, v. 72, n. 24, p. 2741-2750, 2003.

FOLEY, C. M.; McALLISTER, R. M.; HASSER, E. M. Thyroid status influences baroreflex function and autonomic contributions to arterial pressure and heart rate. **Am. J. Physiol.**, v. 280, p. 2061-2068, 2001.

FRASSETTO, S. S.; DIAS, R. D.; SARKIS, J. J. F. Characterization of an ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase, EC 3.6.1.5) in rat blood platelets. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 129, n. 1, p. 47-55, 1993.

FREITAS, F. R. S.; CAPELO, L. P.; O'SHEA, P. J.; JORGETTI, V.; MORISCOT, A. S.; SCANLAN, T. S.; WILLIAMS, G. R.; ZORN, T. M. T.; GOUVEIA, C. H. A. The thyroid hormone receptor β -specific agonist GC-1 selectively affects the bone

development of hypothyroid rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 20, n. 2, p. 294-304, 2005.

FROLDI, G.; PANDOLFO, L.; CHINELLATO, A.; RAGAZZI, E.; CAPARROTTA, L.; FASSINA, G. Dual effect of ATP and UTP on rat atria: which types of receptors are involved? **Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 349, n. 4, p. 381-386, 1994.

FROLDI, G.; VARANI, K.; CHINELLATO, A.; RAGAZZI, E.; CAPARROTTA, L.; BOREA, P. A. P2X-purinoceptors in the heart: actions of ATP and UTP. **Life Science**, v. 60, n. 17, p. 1419-1430, 1997.

GIANNOCCO, G. DOS SANTOS, R. A.; NUNES, M. T. Thyroid hormone stimulates myoglobin gene expression in rat cardiac muscle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 226, n. 1-2, p. 19-26, 2004.

GODING, J. W. Ecto-enzymes: physiology meets pathology. **J. Leukocyte Biol.**, v. 67, n. 3, p. 285-311, 2000.

GOLDENTHAL, M. J.; WEISS, H. R.; MARÍN-GARCIA, J. Bioenergetic remodeling of heart mitochondria by thyroid hormone. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 265, p. 97-106, 2004.

GORDON, J. L. Extracellular ATP: effects, sources and fate. **Biochem. J.**, v. 233, n. 2, p. 309-319, 1986.

HARVEY, C. B.; WILLIAMS, G. R. Mechanism of thyroid hormone action. **Thyroid**, v. 12, n. 6, p. 441- 446, 2002.

HU, L. W.; BENVENUTI, L. A.; LIBERTI, E. A.; CARNEIRO-RAMOS, M. S.; BARRETO-CHAVES, M. L. M. Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: influence of adrenergic nervous system versus rennin-angiotensin system on myocyte remodeling. **Am. J. Physiol.**, v. 285, p. 1473-1480, 2003.

JACOBSON, K. A.; HOFFMANN, C.; CATTABENI, F.; ABBRACCHIO, M. P. Adenosine-induced cell death: evidence for receptor-mediated signaling. **Apoptosis**, v. 4, n. 3, p. 197-211, 1999.

KAHALY, G. J.; DILLMANN, W. H. Thyroid hormone action in the heart. **Endocrine Reviews**, v. 26, n. 5, p. 708-728, 2005.

KENNEDY, C.; LEFF, P. How should P2X purinoceptors be classified pharmacologically? **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 16, n. 5, p. 168-174, 1995.

KENNEDY, C. ATP as a cotransmitter in perivascular sympathetic nerves. **J. Auton. Pharmacol.**, v. 16, n. 6, p. 337-340, 1996.

KLEIN, I.; OJAMAA, K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. **New Engl. J. Med.**, v. 344, n. 7, p. 501-509, 2001.

KNÖFEL, T.; STRÄTER, N. X-ray structure of the *Escherichia coli* periplasmic 5'-nucleotidase containing a dimetal catalytic site. **Nature Struct. Biol.**, v. 6, n. 5, p. 448-453, 1999.

KÖHRLE, J. The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 57, n. 13-14, p. 1853-1863, 2000.

KOMOSZYNSKI, M.; WOJTCZAK, A. Apyrases (ATP-diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1310, n. 2, p. 233-241, 1996.

KUZMAN, J. A.; VOGELANG, K. A.; THOMAS, T. A.; GERDES, A. M. L-Thyroxine activates Akt signaling in the heart. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 2, p. 251-258, 2005.

KUZMIN, A. I.; LAKOMKIN, V. L.; KAPELKO, V. I.; VASSORT, G. Interstitial ATP level and degradation in control and postmyocardial infarcted rats. **Am. J. Physiol.**, v. 275, n. 3 pt 1, p. C766-C771, 1998.

LEWIS, C. S. A.; SMITH, T. M.; KIRLEY, T. L. Cross-linking induces homodimer formation and inhibits enzymatic activity of chicken stomach ecto-apyrase. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v. 44, n. 3, p. 463-470, 1998.

LIANG, B. T.; JACOBSON, K. A. A physiological role of the adenosine A3 receptor: sustained cardioprotection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, n. 12, p. 6995-6999, 1998.

LIAO, Y.; TAKASHIMA, S.; ASANO, Y.; ASAKURA, M.; OGAI, A.; SHINTANI, Y.; MINAMINO, T.; ASANUMA, H.; SANADA, S.; KIM, J.; OGITA, H.; TOMOIKE, H.; HORI, M.; KITAKASE, M. Activation of adenosine A₁ receptor attenuates cardiac hypertrophy and prevents heart failure in murine left ventricular pressure-overload model. **Circ. Res.**, v. 93, p. 759-766, 2003.

LIU, C.; MATHER, S.; HUANG, Y.; GARLAND, C. J.; YAO, X. Extracellular ATP facilitates flow-induced vasodilatation in rat small mesenteric arteries. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 286, n. 5, p. H1688-H1695, 2004.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. E. **Biologia Celular e Molecular**. 4ª edição. Rio de Janeiro: Ed. Revinter, 2002. Cap. 5; 17, p. 172-173; 691-694.

MARCUS, A. J.; BROEKMAN, M. J.; DROSOPOULOS, J. H.; ISLAM, N.; PINSKY, D. J.; SESTI, C.; LEVI, R. Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). **J. Thromb. Haemost.**, v. 1, p. 2497-2509, 2003.

MARSHALL, J. M. Adenosine and muscle vasodilatation in acute systemic hypoxia. **Acta Physiol. Scand.**, v. 168, n. 4, p. 561-573, 2000.

MATOS, J. A. A.; BRUNO, A. N.; OSES, J. P.; BONAN, C. D.; BATTASTINI, A. M. O.; BARRETO-CHAVES, M. L. M.; SARKIS, J. J. F. In vitro effects of thyroid hormones on

ectonucleotidase activities in synaptosomes from hippocampus of rats. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 22, n. 3, p. 345-352, 2002.

MEGHJI, P.; PEARSON, J. D.; SLAKEY, L. L. Regulation of extracellular adenosine production by ectonucleotidases of adult rat ventricular myocytes. **American Physiological Society**, v. 263, p. H40-H47, 1992.

MEYERHOF, O. The origin of the reaction of Harden and Young in cell-free alcoholic fermentation. **J. Biol. Chem.**, v. 157, p. 105-109, 1945.

MUBAGWA, K.; FLAMENG, W. Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview. **Cardiovascular Research**, v. 52, n. 1, p. 25-39, 2001.

MULERO, J. J.; YEUNG, G.; NELKEN, S. T.; FORD, J. E. CD39L4 is a secreted human apyrase, specific for the hydrolysis of nucleoside diphosphates. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 29, p. 20064-20067, 1999.

NAITO, Y.; LOWENSTEIN, J. M. 5'-nucleotidase from rat heart membranes: inhibition by adenine nucleotides and related compounds. **Biochem. J.**, v. 226, p. 645-651, 1985.

NINOMIYA, H.; OTANI, H.; LU, K.; UCHIYAMA, T.; KIDO, M.; IMAMURA, H. Complementary role of extracellular ATP and adenosine in ischemic preconditioning in the rat heart. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 282, p. H1810-H1820, 2002.

NOVAK, I. ATP as a signaling molecule: the exocrine focus. **News Physiol. Sci.**, v. 18, p. 12-17, 2003.

OLIVEIRA, E. M.; BATTASTINI, A. M. O.; MEIRELLES, M. N. L.; MOREIRA, C. M. DIAS, R. D.; SARKIS, J. J. F. Characterization and localization of an ATP diphosphohydrolase activity (EC 3.6.1.5) in sarcolemmal membrane from rat heart. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 170, p. 115-123, 1997.

OLSSON, R. A.; PEARSON, J. D. Cardiovascular purinoceptors. **Physiol. Rev.**, v. 70, p. 761-845, 1990.

OSES, J. P.; CARDOSO, C. M.; GERMANO, R. A.; KIRST, I. B.; RUCKER, B.; FURSTENAU, C. R.; WINK, M. R.; BONAN, C. D.; BATTASTINI, A. M. O.; SARKIS, J. J. F. Soluble NTPDase: An additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. **Life Sciences**, v. 74, p. 3275-3284, 2004.

PANTOS, C. I.; MALLIOPOULOU, V. A.; MOUROUZIS, I. S.; KARAMANOLI, E. P.; PAIZIS, I. A.; STEIMBERG, N.; VARONOS, D. D.; COKKINOS, D. V. Long-term thyroxine administration protects the heart in a pattern similar to ischemic preconditioning. **Thyroid**, v. 12, n. 4, p. 325-329, 2002.

PILLA, C.; EMANUELLI, T.; FRASSETTO, S. S.; BATTASTINI, A. M. O.; DIAS, R. D.; SARKIS, J. J. F. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. **Platelets**, v. 7, p. 225-230, 1996.

PLESNER, L. Ecto-ATPases: Identities and Functions. **International Review of Cytology**, v. 158, p. 141-214, 1995.

POCHMANN, D.; RUCKER, B.; BATTASTINI, A. M. O.; SARKIS, J. J. F. Ovariectomy and estradiol replacement therapy alters the adenine nucleotide hydrolysis in rat blood serum. **Thromb. Res.**, v. 114, n. 4, p. 275-281, 2004.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacological Reviews**, v. 50, n. 3, p. 413-492, 1998.

ROBSON, S. C.; SÉVIGNY J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationship and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, p. 409-430, 2006.

RONGEN, G. A.; FLORAS, J. S.; LENDERS, J. W. M.; THIEN, T.; SMITS, P. Cardiovascular pharmacology of purines. **Clin. Sci.**, v. 92, n. 1, p. 13-14, 1997.

SABIROV, R. Z.; DUTTA, A. K.; OKADA, Y.; Volume-dependent ATP-conductive large-conductance anion channel as a pathway for swelling-induced ATP release. **The Journal of General Physiology**, v. 118, n. 3, p. 251-266, 2001.

SARKIS, J. J. F.; BATTASTINI, A. M. O.; OLIVEIRA, E. M.; FRASSETTO, S. S.; DIAS, R. D. ATP diphosphohydrolases: An overview. **Ciência e Cultura - Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 47, n. 3, p. 131-136, 1995.

SASAYAMA, S.; ROSS, J. Jr.; FRANKLIN, D.; BLOOR, C. M.; BISHOP, S.; DILLEY, R. B. Adaptation of the left ventricle to chronic pressure overload. **Circ. Res.**, v. 38, n. 3, p. 172-178, 1976.

SEBASTIÃO, A. M.; CUNHA, R. A.; CASCALHEIRA, J. F.; RIBEIRO, J. A. Adenine nucleotides as inhibitors of synaptic transmission: role of localized ectonucleotidases. **Prog. Brain Res.**, v. 120, p. 183-192, 1999.

SÉVIGNY, J.; SUNDBERG, C.; BRAUN, N.; GUCKELBERGER, O.; CSIZMADIA, E.; QAWI, I.; IMAI, M.; ZIMMERMANN, H.; ROBSON, S. C. Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase 1) and NTPDase 2 have implications for thromboregulation. **Blood**, v. 99, p. 2801-2809, 2002.

SHI, J. D.; KUKAR, T.; WANG, C. Y.; LI, Q. Z.; CRUZ, P. E.; DAVOODI-SEMIROMI, A.; YANG, P.; GU, Y.; LIAN, W.; WU, D. H.; SHE, J. X. Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo-apyrase (LALP1). **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 20, p.17474-8, 2001.

SPIER, A. P.; SARKIS, J. J. F. Hidrólise de ATP e ADP em fração microssomal e fração solúvel em tecido cardíaco de ratos adultos. **Trabalho apresentado na XIX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, 2004.

SPYCHALA, J.; ZIMMERMANN, A. G.; MITCHELL, B. S. Tissue-specific regulation of the ecto-5'-nucleotidase promoter. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 22705-22712, 1999.

STEFAN, C.; JANSEN, S.; BOLLEN, M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. **Trends in Biochemical Sciences**, v.30, n. 10, p. 542-550, 2005.

TANG, Y. D.; KUZMAN, J. A.; SAID, S.; ANDERSON, B. E.; WANG, X.; GERDES, A. M. Low thyroid function leads to cardiac atrophy with chamber dilatation, impaired myocardial blood flow, loss of arterioles, and severe systolic dysfunction. **Circulation**, v. 112, n. 20, p. 3122-30, 2005.

TROST, S. U.; SWANSON, E.; GLOSS, B.; WANG-IVERSON, D. B.; ZHANG, H.; VOLODARSKY, T.; GROVER, G. J.; BAXTER, J. D.; CHIELLINI, G.; SCANLAN, T. S.; DILLMANN, W. H. The thyroid hormone receptor- β -selective agonist GC-1 differentially affects plasma lipids and cardiac activity. **Endocrinology**, v. 141, n. 9, p. 3057-3064, 2000.

UOZUMI, H.; KUDOH, S.; ZOU, Y. HARADA, K.; YAMAZAKI, T.; KOMURO, I. Autocrine release of ATP mediates mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. **Circulation**, v. 98, p. I-624, 1998.

VALENZUELA, M. A.; LOPEZ, J.; DEPIX, M.; MANCILLA, M.; KETTLUN, A. M.; CATALAN, L.; CHIONG, M.; GARRIDO, J.; TRAVERSO-CORI, A. Comparative subcellular distribution of apyrase from animal and plant sources. Characterization of microsomal apyrase. **Comp. Biochem. Physiol. B.**, v. 93, n. 4, p. 911-919, 1989.

VASSORT, G. Adenosine 5'-triphosphate: a P₂-purinergic agonist in the myocardium. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 2, p. 767-806, 2001.

VIALS, A. J.; BURNSTOCK, G. ATP release from the isolated perfused guinea pig heart in response to increased flow. **J. Vasc. Res.**, v. 33, p. 1-4, 1996.

VILLARREAL, F.; ZIMMERMANN, S.; MAKHSUDOVA, L.; MONTAG, A. C.; ERION, M. D.; BULLOUGH, D. A.; ITO, B. R. Modulation of cardiac remodeling by adenosine: *in vitro* and *in vivo* effects. **Mol. Cellular Biochemistry**, v.251, p. 17-26, 2003.

VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; MARZILLI, M.; ORSINI, E.; FAVILLA, S.; DURANTI, P.; TADDEI, S.; MARRACCINI, P.; SALVETTI, A. Adenosine causes the release of active renin and angiotensin II in the coronary circulation of patients with essential hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 33, n. 6, p. 1677-84, 1999.

WAGNER, M. S.; MORIMOTO, R.; DORA, J. M.; BENNEMAN, A.; PAVAN, R.; MAIA, A. L. Hypothyroidism induces type 2 iodothyronine deiodinase expression in mouse heart and testis. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 31, p. 541-550, 2003.

WANG, T. F.; GUIDOTTI, G. CD39 is an ecto-(Ca²⁺, Mg²⁺)-apyrase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 17, p. 9898-9901, 1996.

WANG, T. F.; GUIDOTTI, G. Golgi localization and functional expression of human uridine diphosphatase. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 11392-11399, 1998.

WATERHOUSE, N. J. The cellular energy crisis: mitochondria and cell death. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 35, n. 1, p. 105-110, 2003.

- WEBB, T. E.; BOLUYT, M. O.; BARNARD, E. A. Molecular biology of P2Y purinoceptor: expression in the heart. **J. Auton. Pharmacol.**, v. 16, p. 303-307, 1996.
- WEBER, K. T.; BRILLA, C. G. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. **Circulation**, v. 83, n. 6, p. 1849-65, 1991.
- WINK, M. R.; TAMAJUSUKU, A. S. K.; BRAGANHOL, E.; CASALI, E. A.; BARRETO-CHAVES, M. L. M.; SARKIS, J. J. F.; BATTASTINI, A. M. O. Thyroid hormone upregulates ecto 5'-nucleotidase/CD73 in C6 rat glioma cells. **Mol. Cellular Endocrinol.**, v. 205, n. 1- 2, p. 107-114, 2003.
- YEGUTKIN, G. G. Kinetic analysis of enzymatic hydrolysis of ATP in human and rat blood serum. **Biochemistry (Moscow)**, v. 62, n. 6, p. 619-622, 1997.
- YEGUTKIN, G.; BODIN, P.; BURNSTOCK, G. Effect of shear stress on the release of soluble ecto-enzymes ATPase and 5'-nucleotidase along with endogenous ATP from vascular endothelial cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 129, p. 921-926, 2000.
- YEGUTKIN, G. G.; HENTTINEN, T.; JALKANEN, S. Extracellular ATP formation on vascular endothelial cells is mediated by ecto-nucleotide kinase activities via phosphotransfer reactions. **Faseb Journal**, v. 15, p. 251-260, 2001.
- YEN, P. M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 3, p. 1097-1142, 2001.

YEUNG, G.; MULERO, J. J.; MCGOWAN, D. W.; BAJWA, S. S.; FORD, J. E. CD39L2, a gene encoding a human nucleoside diphosphatase, predominantly expressed in the heart.

Biochemistry, v. 39, p. 12916-12923, 2000.

ZHAO, T. Xi. L.; CHELLIAH, J.; LEVASSEUR, J. E.; KUKREJA, R. C. Inducible nitric oxide synthase mediates delayed myocardial protection induced by activation of adenosine A(1) receptors: evidence from gene-knockout mice. **Circulation**, v. 102, n. 8, p. 902-907, 2000.

ZERNECKE, A.; BIDZHEKOV, K.; OZUYAMAN, B.; FRAEMOHS, L.; LIEHN, E. A.; LUSCHER-FIRZLAFF, J. M.; LUSCHER, B.; SCHRADER, J.; WEBER, C. CD73/Ecto-5'-nucleotidase protects against vascular inflammation and neointima formation. **Circulation**, v. 113, p. 2120-2127, 2006.

ZIMMERMANN, H. 5'-nucleotidase: molecular structure and functional aspects. **Biochem. J.**, v. 285, p. 345-365, 1992.

ZIMMERMANN, H. Biochemistry, Localization and Functional Roles of Ecto-Nucleotidases in the Nervous System. **Prog. Neurobiol.**, v. 49, n. 6, p. 589-618, 1996.

ZIMMERMANN, H. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. **Trends in Pharmacological Science**, v. 20, n. 6, p. 231-236, 1999.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Development Research**, v. 52, p. 44-56, 2001.

ZINCKUC, V. S; OKADA, T.; KOBAYASHI, T. Ecto-ATPase activity in the rat cardiac muscle: biochemical characteristics and histocytochemical localization. **Cell Tissue Res.**, v. 298, n. 3, p. 499-509, 1999.

ZINCKUC, V. S; OKADA, T.; SEGUCHI, H. Combined biochemistry and histocytochemistry as a toll to investigate ecto-ATPase in the cardiac muscle. **Microsc. Res. Tech.**, v. 58, p. 427-431, 2002.

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](#)