

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Aline Cordeiro de Faria Fernandes

**Estudo da participação de receptores para
hormônio tireoideano na regulação da expressão
protéica da conexina40 (Cx40) atrial**



Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal do Rio de Janeiro
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Cordeiro, Aline

Estudo da participação de receptores para hormônio tireoideano na regulação da expressão protéica da conexina40 (Cx40) atrial / Aline Cordeiro de Faria Fernandes. Rio de Janeiro, 2009.

xvi, 106 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2009.

Orientadora: Carmen Cabanelas Pazos de Moura

1. Hormônio tireoideano. 2. Receptor para hormônio tireoideano. 3. Conexina40. 4. Átrio. I. Pazos-Moura, Carmen Cabanelas. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. III. Título.

Aline Cordeiro de Faria Fernandes

**Estudo da participação de receptores para
hormônio tireoideano na regulação da expressão
protéica da conexina40 (Cx40) atrial**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas do
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho,
como parte dos requisitos necessários à
obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas (Fisiologia)

Orientação: Prof^a. Dr^a. Carmen Cabanelas Pazos de Moura

Rio de Janeiro

2009

Aline Cordeiro de Faria Fernandes

Estudo da participação de receptores para hormônio tireoideano na regulação da expressão protéica da conexina40 (Cx40) atrial

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Fisiologia)

Rio de Janeiro, _____ de _____ de 20_____.

Carmen Cabanelas Pazos de Moura (orientadora)

Prof. Dr. João Pedro Saar Werneck de Castro

Prof. Dr. Celso Caruso Neves

Prof^ª. Dr^ª. Karen de Jesus Oliveira

Prof^ª. Dr^ª. Doris Rosenthal (suplente e revisora)

Aos meus pais Mariza Cordeiro de Faria Fernandes e Jorge Mauro Paranhos Fernandes e ao fiel companheiro Thiago Cerqueira Ladeira. Obrigada pelo carinho, amor e dedicação, sem os quais não seriam possíveis muitas das minhas conquistas pessoais e profissionais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de ter uma educação de qualidade, por ter conseguido concluir o curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia).

Aos meus pais, por todo amor, dedicação e compreensão todos esses anos.

Agradeço a minha família que de muitas formas me apoiou durante toda a minha formação e contribuíram para esse momento.

Ao Thiago, companheiro fiel, que esteve disponível a me escutar, incentivar e ajudar sempre que preciso. Certamente não conseguiria sem o seu apoio e dedicação. Nunca conseguirei retribuir tudo o que fez por mim.

Às amigas da graduação, Karina, Flavia, Carol e Daiana, e ao amigo Ivan, pelos bons momentos desde que nos conhecemos, seja de diversão, discussão de dados e desabafos em geral.

A todos do Laboratório de Endocrinologia Molecular com quem tive o prazer de conviver durante a realização desse trabalho: Tânia, Karen, Ricardo, Adriana, Camila, Letícia, Débora, Ana Cláudia, Raquel, Érika, Mariana, Márcio, e principalmente às amigas, Flavia, Gabi, Larissa e Luana, pela incrível felicidade que vocês trazem aos meus dias de trabalho.

Agradeço a co-orientação da Doutora Norma Aparecida dos Santos Almeida pelo conhecimento e pensamentos divididos comigo, fundamentais para o meu crescimento como pesquisadora. Obrigada também pela sua amizade e sinceridade.

À Professora Carmen Cabanelas Pazos de Moura, pela orientação e incentivo na realização desse projeto. Obrigada pelo apoio, pela paciência e confiança.

E a todas as pessoas que, embora não tenham sido citadas, foram fundamentais simplesmente por estarem ao meu lado durante toda a minha trajetória e estarão sempre em meu coração...

“Educar, podemos dizer, significa ajudar a acordar, ajudar a encontrar no próprio ser o ímpeto, a saudade, a vontade de movimentar-se e buscar e descobrir, de crescer, de progredir. E educar significa também aprender a lutar, aprender a intensificar a existência e cumpri-la com decisão e consciência. Educar, basicamente, é ajudar a assumir a vida; é levar o ser a procurar e a aspirar à verdade, a sentir e chamar a luz e a força encobertas nele mesmo; fazê-lo perceber a grande possibilidade que a vida é, o que com ela recebemos, e aprender, conscientemente, a querê-la, vivê-la, dá-la.”

Rolf Gelewski.

RESUMO

Estudo da participação dos receptores para hormônio tireoideano (TR) na regulação da expressão protéica da conexina40 (Cx40) atrial

Autora: Aline Cordeiro de Faria Fernandes

Orientadora: Carmen Cabanelas Pazos de Moura

Resumo da dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau do título de Mestre em Ciências Biológicas (Fisiologia).

O hormônio tireoideano (HT) participa da regulação da massa e da expressão protéica da conexina40 (Cx40) dos átrios, com a possível participação das isoformas TR α e TR β , dependendo da concentração sérica de T₃. Utilizou-se neste trabalho o animal KS, modelo que superexpressa isoforma TR β mutada somente no coração, o que provoca o prejuízo da sinalização normal das isoformas TR α e TR β . Este animal apresentou aumento do peso atrial e diminuição da expressão protéica da Cx40, indicando que o HT, atuando pelos TRs no coração, participa da regulação desses processos. No entanto, a variação da concentração sérica de HT, pela indução de hipo- e hipertireoidismo, não provocou alteração quer do peso atrial quer da expressão protéica da Cx40 atrial. Para melhor entender a participação das isoformas de TR na regulação desses dois processos, utilizou-se o animal KI, modelo que expressa a isoforma TR β mutada em substituição à normal em todos os tecidos do organismo e apresenta níveis séricos elevados de HT. Os homozigotos apresentaram aumento do peso atrial e diminuição da expressão protéica da Cx40, sugerindo a participação de TR β , pelo menos na presença de altos níveis de T₃ sérico. Para saber se este fenótipo ocorre devido, somente, à presença da mutação ou à combinação da presença da mutação com altos níveis de HT, animais KI foram submetidos a um protocolo para igualar a concentração sérica de T₃ entre os genótipos. Um grupo de animais foi induzido ao hipotireoidismo, única condição em que se observou diferença entre os resultados de machos e fêmeas. Os machos apresentaram aumento do peso atrial e expressão protéica da Cx40 inalterada, enquanto as fêmeas apresentaram peso atrial inalterado e diminuição da expressão protéica da Cx40. Tais resultados sugerem que, na condição de escassez de HT, existe ativação de mecanismos de regulatórios diferentes entre machos e fêmeas e, que, provavelmente, fatores femininos, como o estrogênio, sejam capazes de participar da regulação. Outros dois grupos de animais foram submetidos ao hipotireoidismo acrescido de tratamento com T₃ na dose 0,2 μ g/100g de peso corporal durante uma semana ou três semanas nas doses 0,2 μ g, 0,5 μ g e 1,0 μ g/100g de peso corporal, consecutivamente. Não se observou diferença entre os genótipos quanto ao peso atrial e expressão protéica da Cx40 atrial sob os diferentes tratamentos. Isto sugere que, nas condições de concentração sérica de T₃ baixa e normal, TR β não participa da regulação, que seria basicamente dependente de TR α .

Palavras-chave: 1- Hormônio tireoideano, 2- Receptor para hormônio tireoideano, 3- Conexina40, 4- Átrio.

ABSTRACT

Study of the participation of thyroid hormone receptor in the regulation of protein expression of atrial connexin40 (Cx40).

Thyroid hormone (TH) participates in the regulation of atrial mass and Cx40 proteic expression, with the possible involvement of the isoforms TR α and TR β , which depends on the serum concentration of T₃. In this work, we used KS animals, a model that superexpresses mutant TR β Δ 337T only in the heart, resulting in a disruption of TR α and TR β action. This animal presents an increase in the atrial mass and a reduction in Cx40 proteic expression, indicating that TH, via TRs, act in these processes regulation. However, the variation of the serum concentration of TH, by the induction of hypo- and hyperthyroidism, did not provoke changes in the atrial mass and in the Cx40 proteic expression. To better understand the role of TR isoforms in the regulation of these two processes, we used KI animal, model that express the same mutated TR β (Δ 337T) in substitution of the normal one in all over the organism, and presents elevated serum T₃ concentration. Homozygous mice for the mutation exhibit an increase in the atrial mass and a reduction in the Cx40 proteic expression, suggesting that TR β is important for the regulation, at least in the presence of elevated level of HT. To investigate whether KI phenotype is due to the mutation presence or to the combination of the mutation presence with elevated serum T₃, groups of KI animals were submitted to a protocol aiming the normalization of HT serum concentration among the genotypes. One group was induced to hypothyroidism, the only condition which there were differences between the results of male and female animals. The male animals presented an increase in the atrial mass and unaltered Cx40 proteic expression, while the female ones exhibited unaltered atrial mass and a reduction in Cx40 proteic expression. These results suggest that, in the presence of scarce TH, there is activation of different regulatory mechanisms in male and female animals, and probably that female factors, like estrogen, could participate in the regulation. Other two groups of animals were submitted to hypothyroidism plus T₃ in the dose of 0,2 μ g/100g of body weight during one week or during three weeks with doses of 0,2 μ g, 0,5 μ g e 1,0 μ g/100g of body weight consecutively. There were no differences among the genotypes in relation to atrial mass and Cx40 proteic expression by these different treatments. This suggests that, in the presence of reduced or normal levels of T₃, TR β does not participate in the regulation, which would be dependent principally on TR α .

Key-words: 1- Thyroid hormone, 2- Thyroid hormone receptor, 3- Connexin40, 4- Atrium.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura dos hormônios tireoideanos.....	4
Figura 2. Representação esquemática da biossíntese dos hormônios tireoideanos triiodotironina (T ₃) e tiroxina (T ₄) nas células foliculares da tireóide	6
Figura 3. Estruturas derivadas da ativação e inativação das iodotironinas desiodase (D) tipo 1, 2 e 3.....	7
Figura 4. Comparação esquemática das isoformas de TR.....	10
Figura 5. Esquema representativo da regulação positiva da expressão gênica pelo hormônio tireoideano	12
Figura 6. Esquema representativo de possíveis mecanismos de regulação negativa pelo hormônio tireoideano.....	13
Figura 7. Sítios de ação da triiodotironina nos cardiomiócitos	20
Figura 8. Modelo de resistência causada por mutação no TR em TRE positivo	24
Figura 9. Junções comunicantes	26
Figura 10. Modelo esquemático representando o ciclo de vida de uma conexina	29
Figura 11. Registro eletrocardiográfico de animais não anestesiados.....	41
Figura 12. Expressão do RNAm das conexinas 40 e 43 no átrio e da conexina43 no ventrículo de camundongos selvagens e transgênicos eutireoideos	41
Figura 13. Autoradiografia da membrana hibridizada com sonda radioativa	48
Figura 14. Foto representativa de um gel de agarose 2% após eletroforese de amostras de DNA submetidas PCR para genotipagem de animais da linhagem TR β KI Δ 337T	50
Figura 15. Esquema ilustrativo do tratamento de indução ao hipertireoidismo e hipotireoidismo	51
Figura 16. Esquema ilustrativo do tratamento de indução ao hipotireoidismo e hipotireoidismo seguido de administração de T ₃	52
Figura 17. Peso do átrio corrigido pelo peso corporal de camundongos machos selvagens (Wt) e transgênicos KS eutireoideos.....	57
Figura 18. Expressão da proteína conexina40 no átrio de camundongos machos selvagens (Wt) e transgênicos KS eutireoideos.....	57
Figura 19. Dosagem hormonal de camundongos machos selvagens (Wt) submetidos aos tratamentos de hipotireoidismo (Hipo) e hipertireoidismo (Hiper) comparados aos seus respectivos controles eutireoideos (Eu).....	58

Figura 20. Peso do átrio corrigido pelo peso corporal de camundongos machos selvagens (Wt) submetidos aos tratamentos de hipotireoidismo (Hipo) e hipertireoidismo (Hiper) comparados aos seus respectivos controles eutireoideos (Eu).....	60
Figura 21. Expressão da proteína conexina40 no átrio de camundongos machos selvagens (Wt) eutireoideos (Eu) e submetidos a tratamentos para indução de hipotireoidismo (Hipo) e hipertireoidismo (Hiper).....	60
Figura 22. Peso do átrio corrigido pelo peso corporal de camundongos machos e fêmeas selvagens (Wt) e transgênicos KI eutireoideos	63
Figura 23. Expressão da proteína conexina40 no átrio de camundongos machos e fêmeas selvagens (Wt) e transgênicos KI eutireoideos.....	63
Figura 24. Dosagem da concentração sérica de TSH de camundongos machos e fêmeas selvagens (Wt), heterozigotos (Het) e homozigotos (Homo) submetidos ao tratamento de hipotireoidismo acrescido de doses crescentes de T ₃	65
Figura 25. Dosagem da concentração sérica de T ₃ de camundongos machos e fêmeas selvagens (Wt), heterozigotos (Het) e homozigotos (Homo) submetidos ao tratamento de hipotireoidismo acrescido de doses crescentes de T ₃	65
Figura 26. Dosagem da concentração sérica de T ₃ de camundongos machos e fêmeas selvagens (Wt), heterozigotos (Het) e homozigotos (Homo) submetidos aos tratamentos de hipotireoidismo e hipotireoidismo acrescido de injeções de T ₃	66
Figura 27. Dosagem da concentração sérica de T ₃ de camundongos machos e fêmeas selvagens (Wt), heterozigotos (Het) e homozigotos (Homo) submetidos aos tratamentos de hipotireoidismo e hipotireoidismo acrescido de injeções de T ₃	66
Figura 28. Peso do átrio corrigido pelo peso corporal de camundongos fêmeas selvagens e transgênicas KI hipotireoideas	68
Figura 29. Expressão da proteína conexina40 no átrio de camundongos fêmeas selvagens e transgênicas KI hipotireoideas	68
Figura 30. Peso do átrio corrigido pelo peso corporal de camundongos machos selvagens (Wt) e transgênicos KI hipotireoideos	69
Figura 31. Expressão da proteína conexina40 no átrio de camundongos machos selvagens e transgênicos KI hipotireoideos.....	69

- Figura 32.** Peso do átrio corrigido pelo peso corporal de camundongos machos e fêmeas selvagens (Wt) e transgênicos KI hipotireoideos que receberam injeções diárias de T₃ na dose de 0,2µg/100g de peso corporal durante uma semana71
- Figura 33.** Expressão da proteína conexina40 no átrio de camundongos machos e fêmeas selvagens (Wt) e transgênicos KI hipotireoideos que receberam injeções diárias de T₃ na dose de 0,2µg/100g de peso corporal durante uma semana71
- Figura 34.** Peso do átrio corrigido pelo peso corporal de camundongos machos e fêmeas selvagens (Wt) e transgênicos KI hipotireoideos que receberam injeções diárias de T₃ na dose de 0,2µg, 0,5µg e 1,0µg/100g de peso corporal durante uma semana cada dose, consecutivamente.....73
- Figura 35.** Expressão da proteína conexina40 no átrio de camundongos machos e fêmeas selvagens (Wt) e transgênicos KI hipotireoideos que receberam injeções diárias de T₃ na dose de 0,2µg, 0,5µg e 1,0µg/100g de peso corporal durante uma semana cada dose, consecutivamente.....73
- Figura 36.** Peso do átrio corrigido pelo peso corporal de camundongos machos e fêmeas selvagens (Wt) hipotireoideos (Hipo), hipotireoideos que receberam injeções diárias de T₃ na dose de 0,2µg/100g de peso corporal durante uma semana (1D), e hipotireoideos que receberam injeções diárias de T₃ na dose de 0,2µg, 0,5µg e 1,0µg/100g de peso corporal durante uma semana cada dose, consecutivamente (3D)75
- Figura 37.** Expressão da proteína conexina40 no átrio de camundongos machos e fêmeas selvagens (Wt) hipotireoideos (Hipo), hipotireoideos que receberam injeções diárias de T₃ na dose de 0,2µg/100g de peso corporal durante uma semana (1D), e hipotireoideos que receberam injeções diárias de T₃ na dose de 0,2µg, 0,5µg e 1,0µg/100g de peso corporal durante uma semana cada dose, consecutivamente (3D)75
- Figura 38.** Peso do átrio corrigido pelo peso corporal de camundongos machos e fêmeas homozigotos hipotireoideos (Hipo), hipotireoideos que receberam injeções diárias de T₃ na dose de 0,2µg/100g de peso corporal durante uma semana (1D), e hipotireoideos que receberam

injeções diárias de T₃ na dose de 0,2μg, 0,5μg e 1,0μg/100g de peso corporal durante uma semana cada dose, consecutivamente (3D)77

Figura 39. Expressão da proteína conexina40 no átrio de camundongos machos e fêmeas homocigotos KI hipotireoideos (Hipo), hipotireoideos que receberam injeções diárias de T₃ na dose de 0,2μg/100g de peso corporal durante uma semana (1D), e hipotireoideos que receberam injeções diárias de T₃ na dose de 0,2μg, 0,5μg e 1,0μg/100g de peso corporal durante uma semana cada dose, consecutivamente (3D)77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α-MHC	cadeia pesada da miosina α
β-MHC	cadeia pesada da miosina β
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
ANGII	angiotensina II
Ca²⁺	íon cálcio
CFT	células foliculares tireoideanas
Cx40	conexina40
Cx40^{-/-}	animal <i>knockout</i> (homozigoto) para o gene da Cx40
Cx43	conexina43
Cx43^{+/-}	animal <i>knockout</i> (heterozigoto) para o gene da Cx43
DNA	ácido desoxirribonucleico
D1	iodotironina-desiodase tipo 1
D2	iodotironina-desiodase tipo 2
D3	iodotironina-desiodase tipo 3
DIT	diiodotirosina
ECA2	enzima conversora de angiotensina do tipo 2
ECG	registro eletrocardiográfico
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
ET-1	endotelina 1
Eu	animal eutireoideo
FSH	hormônio folículo estimulante
H⁺	íon hidrogênio
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
HDAC	histona deacetilase
HEPES	ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico
Het	animais heterozigotos
Hipo	animal hipotireoideo
Hiper	animal hipertireoideo
Homo	animais homozigotos
HT	hormônios tireoideanos
I⁻	iodeto
IDD	desordens por deficiência de iodo
KI	animal que expressa TR β mutado em todo o seu organismo

KS	animal que superexpressa TR β mutado somente no coração
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LH	hormônio luteinizante
MCT8	<i>monocarboxylate transporter 8</i>
MIT	moniodotirosina
MMI	metimazol
N-CoR	<i>nuclear receptor corepressor</i>
NIS	sistema de co-transporte de Na ⁺ e I ⁻
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCR	reação em cadeia da polimerase
PKA	proteína quinase A
PKC	proteína quinase C
PLB	fosfolambam
PLC	fosfolipase C
PTU	propil-tiouracil
PVDF	<i>polyvinylidene difluoride</i>
RE	retículo endoplasmático
RNA	ácido ribonucleico
RNA_m	RNA mensageiro
rT₃	3,3',5 triiodotironina (T ₃ reverso)
RTEF-1	<i>transcription enhancer factor-1 – related factor</i>
RTH	resistência a hormônio tireoideano
RXR	receptores para ácido retinóico
SDS	duodecilsulfato de sódio
SERCA-2a	isoforma 2a da Cálcio-ATPase de retículo sarcoplasmático
SMRT	<i>silencing mediator of retinoid and thyroid receptors</i>
T₃	3,5,3' triiodotironina
T₄	3,5,3',5' tetraiodotironina ou tiroxina
Tg	tireoglobulina
TBG	globulina ligadora de tiroxina
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
TPO	tireoperoxidase
TR	receptor para hormônio tireoideano
TRα1^{-/-}	animal <i>knockout</i> (homozigoto) para o gene TR α 1
TRβ^{-/-}	animal <i>knockout</i> (homozigoto) para o gene TR β

TRE	elemento responsivo a hormônio tireoideano
TRH	hormônio liberador de tireotrofina
TSH	hormônio estimulador da tireóide
V_j	voltagem transjuncional
V_m	voltagem transmembrana
Wt	animais <i>wild type</i> (selvagens)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1- TIREÓIDE	1
2- HORMÔNIOS TIREOIDEANOS	2
2.1- Regulação da função tireoideana	3
2.2- Síntese dos hormônios tireoideanos	4
2.3- Mecanismo de ação	8
3- EFEITOS PROVOCADOS POR HORMÔNIO TIREOIDEANO	13
3.1- Hormônios tireoideanos e efeitos cardíacos.....	18
4- JUNÇÕES <i>GAP</i> OU JUNÇÕES COMUNICANTES	25
4.1- Regulação do acoplamento da junção comunicante.....	27
4.2- Junções comunicantes no coração.....	32
4.3- Regulação da condutância e da expressão da Cx40 no coração.....	36
5- JUSTIFICATIVA DO TRABALHO	39
OBJETIVO	44
MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
1- ANIMAIS.....	45
1.1- Linhagens de animais TR β KS Δ 337T e animais TR β KI Δ 337T	45
1.2- Genotipagem dos animais TR β KS Δ 337T	47
1.3- Genotipagem dos animais TR β KI Δ 337T	49
1.4- Indução ao hipotireoidismo, hipertireoidismo e hipotieoidismo acrescido de tratamento com T ₃	51
1.5- Procedimentos gerais	52
2- DOSAGEM HORMONAL PELO MÉTODO DE RADIOIMUNOENSAIO.....	53
3- ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTÉICA DA CONEXINA40 UTILIZANDO A TÉCNICA <i>WESTERN BOLTING</i>	54
4- ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
RESULTADOS.....	56
1- ANIMAIS TR β KS Δ 337T (MODELO QUE SUPEREXPRESSA ISOFORMA TR β MUTADA EXCLUSIVAMENTE NO CORAÇÃO).....	56
2- ANIMAIS SELVAGENS HIPO- E HIPERTIREOIDEOS	58

3- ANIMAIS TR β KI Δ 337T (MODELO QUE EXPRESSA ISOFORMA TR β MUTADA EM TODOS OS TECIDOS DO ORGANISMO)	61
4- ANIMAIS TR β KI Δ 337T INDUZIDOS AO HIPOTIREOIDISMO E HIPOTIREOIDISMO ACRESCIDO DE TRATAMENTO COM T ₃	63
4.1- Animais TR β KI Δ 337T induzidos ao hipotireoidismo (Hipo).....	67
4.2- Animais TR β KI Δ 337T induzidos ao hipotireoidismo acrescido de tratamento com T ₃ na dose 0,2 μ g/100g de peso corporal (1D)	70
4.3- Animais TR β KI Δ 337T induzidos ao hipotireoidismo acrescido de tratamento com T ₃ nas doses 0,2 μ g, 0,5 μ g e 1,0 μ g/100g de peso corporal (3D)	72
4.4- Comparação entre animais selvagens (Wt) submetidos ao hipotireoidismo e hipotireoidismo acrescido de tratamento com T ₃	74
4.5- Comparação entre animais homozigotos submetidos ao hipotireoidismo e hipotireoidismo acrescido de tratamento com T ₃	76
RESUMO DOS RESULTADOS	78
DISCUSSÃO	79
CONCLUSÃO	93
ANEXO (VALORES TSH E T₃)	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

INTRODUÇÃO

Atualmente, as disfunções no metabolismo tireoideano estão entre as mais comuns causas de doenças endócrinas. Assim, o estudo sobre os efeitos provocados por hormônios tireoideanos (HT) possui importantes implicações biológicas e médicas (Yen, 2001). Após o isolamento do T₄, em 1915 (Kendall), e do T₃, em 1954 (Gross & Pitt-Rivers), muitas outras contribuições em diversas áreas da pesquisa, como medicina clínica, fisiológica, bioquímica e genética molecular têm contribuído para um melhor entendimento da função da glândula tireóide.

1- TIREÓIDE

Em mamíferos, a glândula tireóide é localizada na região anterior do pescoço. Esta glândula possui dois diferentes tipos celulares, as células foliculares tireoideanas e as parafoliculares, também chamadas de células C, capazes de produzir os hormônios tireoideanos e a calcitonina, respectivamente. As células foliculares tireoideanas constituem a população celular de maior número na glândula, e se dispõem formando folículos tireoideanos. Estes são estruturas esféricas compostas de uma camada de células polarizadas circundando uma cavidade fechada, em que se acumula grande quantidade de colóide, estrutura composta principalmente pela glicoproteína tireoiglobulina (Mauchamp *et al.*, 1998).

Esses tipos celulares possuem origem de estruturas embrionárias distintas. As células foliculares tireoideanas derivam de um pequeno grupo de células do endoderma, localizado na parte posterior da cavidade bucal embrionária (Mansouri *et al.*, 1998). Por outro lado, os precursores das células C têm origem a partir de um par simétrico de estruturas embrionárias transientes, que migram a partir da crista neural e são

remanescentes das glândulas ultimobranquiais presentes nos peixes, anfíbios, répteis e aves (Polak *et al.*, 1974).

Durante a migração, dos seus respectivos sítios de origem até o local do desenvolvimento da tireóide, os precursores tendem a desaparecer como estruturas individuais e se organizam no local onde se desenvolverá a glândula adulta. Neste local, a organogênese se completa simultaneamente ao programa de diferenciação das células. Essas passam a expressar uma série de proteínas importantes para a biosíntese dos hormônios (De Felice & Di Lauro, 2004).

2- HORMÔNIOS TIREOIDEANOS

Os HTs modulam vários processos fisiológicos no organismo, sendo necessários para o bom funcionamento da maioria dos tecidos. Atuam durante os períodos de desenvolvimento embrionário e neonatal e ainda durante a vida adulta. As funções principais do HT é aumentar o consumo de oxigênio e a taxa metabólica, assim como influenciar os processos de proliferação e diferenciação celular. Além disso, eles participam da regulação da secreção de hormônios e da homeostase metabólica, estimulando a síntese e utilização de substratos energéticos (Yen, 2001).

Em humanos, a partir de 11 a 12 semanas de vida embrionária, a tireóide do feto é capaz de sintetizar, armazenar e secretar os hormônios tireoideanos 3,5,3'-triiodotironina (T₃) e 3,5,3',5'-tetraiodotironina ou tiroxina (T₄). O aumento das concentrações séricas fetais do hormônio estimulador da tireóide ou tireotrofina (TSH), da globulina ligadora de tiroxina (TBG), e do T₃ e T₄ livres e totais durante a gestação, refletem a maturação de órgãos como a hipófise, o fígado e a tireóide. De forma que, aproximadamente na 36ª semana gestacional, as concentrações séricas fetais de T₄ livre e total alcançam a média dos valores adultos (Thorpe-Beeston *et al.*, 1991).

2.1- Regulação da função tireoideana

A função tireoideana é regulada por um sistema de retroalimentação negativa ou *feedback* negativo, envolvendo a tireóide, a hipófise e o hipotálamo. Esta regulação é extremamente sensível, de forma a manter disponível e constante a concentração sérica dos hormônios tireoideanos, dentro de uma estreita faixa de normalidade. Neste sistema, o hipotálamo secreta o hormônio liberador de tireotrofina (TRH), que age na hipófise estimulando a secreção de TSH. Por sua vez, o TSH atua na glândula tireóide, promovendo a síntese e a liberação dos hormônios tireoideanos. E estes, por fim, são capazes de suprimir a síntese e a secreção de TSH e de TRH (Wondisford *et al.*, 1989; Hollenberg *et al.*, 1995).

O TRH é um tripeptídeo, piroglutamina-histidina-prolina-amido (PyroGlu-His-Pro), sintetizado no núcleo paraventricular do hipotálamo. Este é transportado através de axônios até a eminência média, onde fica armazenado, até sua liberação para atingir suas células-alvo na hipófise (tireotrofos), através da veia porta hipofisária. Na membrana plasmática dos tireotrofos, o TRH interage com seus receptores específicos, membros de uma família de receptores com 7 domínios transmembrana e acoplados à proteína G_q . Esta interação estimula uma série de reações citoplasmáticas como a ativação da fosfolipase C (PLC), a mobilização de cálcio e a ativação da proteína quinase C (PKC), que culminam na exocitose do TSH armazenado nas vesículas dos tireotrofos e na síntese *de novo* TSH (Yen, 2001).

O TSH é um membro da família de hormônios glicoprotéicos da adenohipófise, constituído de duas subunidades α e β . A subunidade α é comum a outros membros desta família, como o hormônio folículo estimulante (FSH), o hormônio luteinizante (LH) e a gonadotrofina coriônica. Ao contrário, a subunidade β é única, conferindo especificidade da atividade biológica de cada proteína heterodimérica desta família. O

TSH é o principal regulador da liberação do HT e de várias etapas críticas da sua síntese, atuando através da interação com receptores específicos de 7 domínios transmembrana acoplados à proteína G_s, na membrana das células foliculares da tireóide. Ele também tem um importante papel no crescimento e desenvolvimento da tireóide, de forma que o estímulo sustentado do TSH leva à hipertrofia e hiperplasia das células foliculares. Nesta condição, as células apresentam um volume aumentado do retículo endoplasmático, números aumentados de ribossomos, um complexo de Golgi maior e mais complexo, e um aumento na síntese de DNA. Os capilares também proliferam, e o fluxo sanguíneo tireoideano aumenta. Ao contrário, na ausência de TSH, ocorre uma atrofia marcante da glândula (Yen, 2001).

2.2- Síntese dos hormônios tireoideanos

Os produtos secretórios da glândula tireóide são iodotironinas, uma série de compostos resultantes da ligação de duas moléculas de tirosina iodadas (figura 1). Quando o meio ambiente não é rico em iodeto, a população apresenta uma série de anormalidades funcionais e no desenvolvimento, agrupadas na categoria de doenças por deficiência de iodo (IDD). Aproximadamente 1 bilhão de pessoas estão propensas a uma IDD (Delange, 1994). A absorção do iodeto é realizada por um sistema especializado e eficiente na tireóide, uma vez que é oriundo de uma única fonte, a dieta, e é essencial na composição dos HTs (De La Vieja *et al.*, 2000).

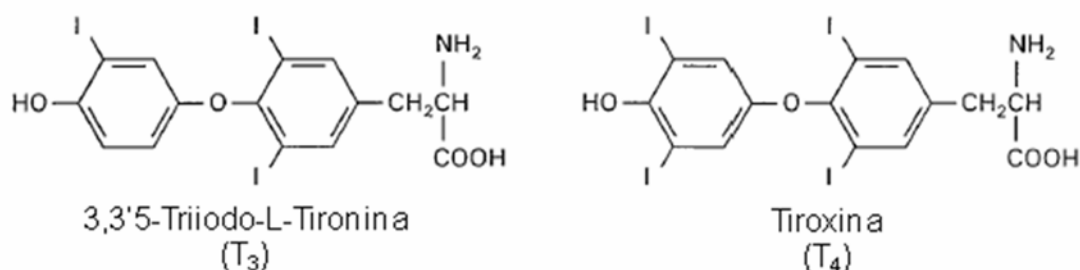


Figura 1. Estrutura dos hormônios tireoideanos. Adaptado de Yen, 2001.

Na tireóide, o iodeto é ativamente transportado para o interior da glândula contra gradientes químico e elétrico por um sistema de co-transporte de Na^+ e I^- (NIS) (simporte), localizado na membrana basal das células foliculares tireoideanas (De La Vieja *et al.*, 2000). Uma vez dentro da glândula, o iodeto rapidamente se desloca para a superfície apical das células epiteliais, a partir de onde é transportado ao lúmen do folículo por um transportador de iodeto/cloreto, chamado pendrina. Na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), cada iodeto (I^-) transportado é imediatamente oxidado a I^0 e incorporado aos resíduos de tirosina presentes em uma glicoproteína de 660 kDa, a tireoglobulina (Tg) (Yen, 2001) (figura 2). Este processo é chamado de organificação.

A enzima tireoperoxidase (TPO) catalisa a reação de adição de um ou dois átomos de iodo aos resíduos de tirosina, de forma que o acoplamento enzimático de uma moniodotirosina (MIT) com uma diiodotirosina (DIT) ou de duas diiodotirosinas (DITs), dará origem aos hormônios tireoideanos T_3 e T_4 , respectivamente. A Tg contendo resíduos de MIT, DIT, T_3 e T_4 é estocada no colóide presente no lúmen folicular (Yen, 2001) (figura 2).

Para que ocorra a secreção dos HT, é necessária a endocitose da Tg iodada, que é mediada por uma molécula presente na membrana apical, similar ao receptor de colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL), chamada megalina. Às vesículas contendo o colóide, são incorporados lisossomos com atividade proteolítica, o que leva a liberação de radicais iodados da proteína. Enquanto os resíduos de MIT e DIT são degradados e o iodeto é reaproveitado pela célula, os HTs, T_3 e T_4 , são liberados na corrente sanguínea, através da membrana basal (Yen, 2001) (figura 2).

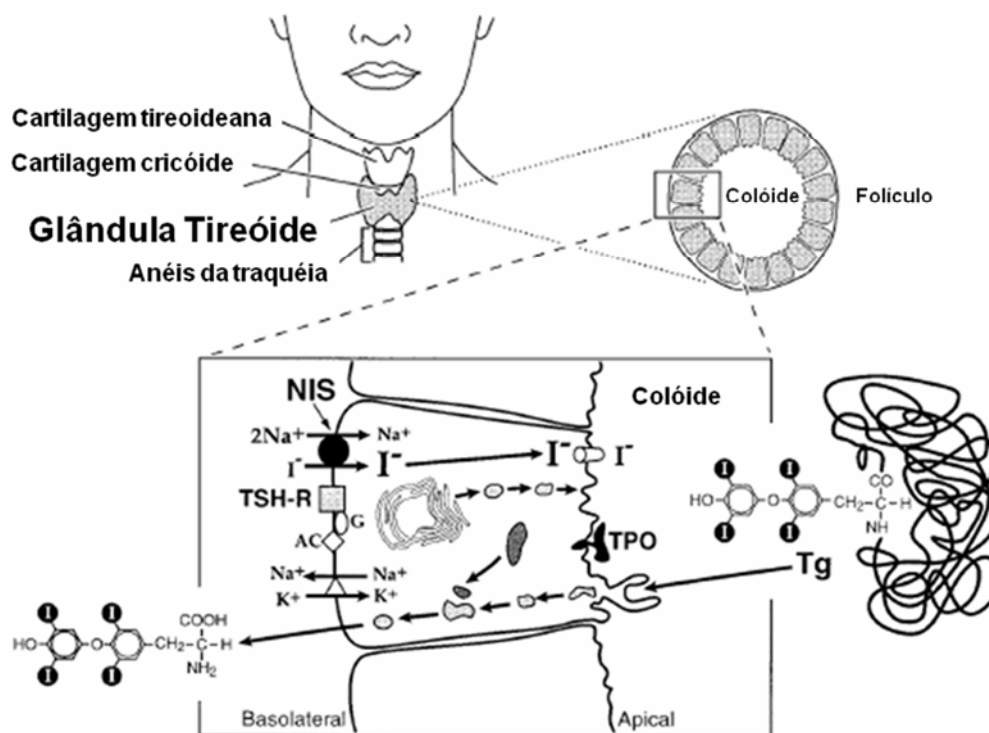


Figura 2. Representação esquemática da biossíntese dos hormônios tireoideanos triiodotironina (T₃) e tiroxina (T₄) nas células foliculares da tireóide. Os foliculos tireoideanos são compostos por uma camada de células epiteliais envolvendo o colóide. A superfície basolateral é mostrada à esquerda e a superfície apical, à direita. Círculo, acumulação ativa de iodeto, mediada pelo co-transportador de Na⁺/I⁻ (NIS); triângulo, Na⁺-K⁺ ATPase; quadrado, receptor para tireotrofina (TSH); losango, adenilato ciclase; elipse, proteína G; cilindro, pendrina transportador de I⁻ para o colóide; TPO, tireoperoxidase. Adaptado de De La Vieja *et al.*, 2000.

O principal produto secretório da tireóide é o T₄. Entretanto, o T₃ é considerado o hormônio biologicamente ativo já que este é o ligante para o qual o receptor para HT (TR) tem maior afinidade (Yen, 2001). Assim, grande parte do T₃ circulante é formada a partir da monodesiodação do T₄, por enzimas que possuem atividade iodotironinas desidase, capazes de remover seqüencialmente os átomos de iodo (Braverman *et al.*, 1970) (figura 3). A desidase tipo 1 (D1) é encontrada em maior abundância em tecidos periféricos como o fígado e o rim, e é responsável pela conversão de grande parte do T₄ em T₃ presente na circulação (Bianco *et al.*, 2002). A desidase tipo 2 (D2) é expressa predominantemente no cérebro, hipófise e tecido adiposo marrom, onde converte T₄ em T₃ principalmente para uso intracelular. No entanto, a D2 também é encontrada na musculatura esquelética, que, no estado eutiroideo em humanos, é considerada a fonte

de maior parte do T₃ presente na circulação (Maia *et al.*, 2005). A desidase tipo 3 (D3), encontrada principalmente na placenta, cérebro e pele, converte T₄ em T₃ reverso (rT₃), diminuindo a quantidade de T₃ disponível (Hernandez, 2005) (figura 3). O rT₃ não possui atividade biológica conhecida, por isto a conversão de T₄ em rT₃ é considerada uma via inativadora. Um estudo observou a presença de D1 em cardiomiócitos em cultura (Yonemoto *et al.*, 1999) e, no coração de camundongo, foi detectada a presença de D2 (Wagner *et al.*, 2003) e de D3 em baixa quantidade, sendo esta última mais expressa em modelos de infarto do miocárdio (Olivares *et al.*, 2007). Além disso, o T₃ e o rT₃ ainda podem ser convertidos a diiodotironina (T₂). Apesar deste processo ser chamado de inativação na figura abaixo, efeitos biológicos de T₂ já foram descritos, como a sua ação em aumentar a atividade da cadeia respiratória (Lombardi *et al.*, 1998).

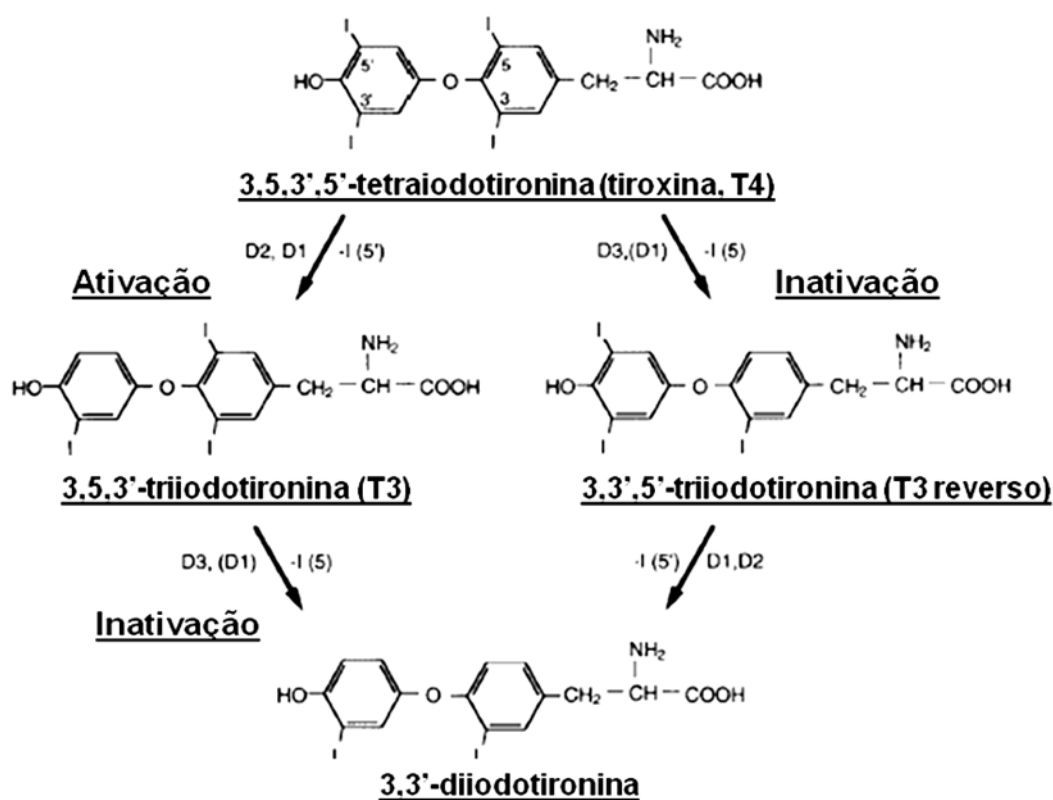


Figura 3. Estruturas derivadas da ativação e inativação das iodotironinas desidase (D) tipo 1, 2 e 3. Adaptado de Bianco *et al.*, 2002.

Somente uma pequena fração do total de HT, presente na circulação, se apresenta na sua forma ativa, a forma livre. A ligação a proteínas plasmáticas, como a albumina, transtirretina e principalmente a globulina ligadora de tiroxina (TBG), garante aos HT uma baixa metabolização e excreção e, conseqüentemente, uma meia-vida prolongada (Schussler, 2000).

A concentração intracelular do HT pode ser controlada por proteínas ligadoras de HT presentes no citoplasma da célula e no meio extracelular (Yen, 2001). Somente a forma livre deste hormônio (não ligada a proteína) é capaz de entrar na célula-alvo através de transportadores e receptores para HT presentes na membrana. Já foram identificadas diversas proteínas transmembrana que seriam capazes de funcionar como transportadores de HT para dentro da célula, entre elas o transportador MCT8 (do inglês, *monocarboxylate transporter 8*) tem se mostrado muito ativo e específico (Friesema *et al.*, 2003). Mutação em MCT8 origina um fenótipo particular caracterizado por concentração sérica de T₃ muito elevada na presença de concentração sérica de TSH normal ou elevada, e por retardo psicomotor severo (Dumitresco *et al.*, 2004).

2.3- Mecanismo de ação

Os hormônios tireoideanos possuem efeitos intracelulares rápidos, que duram de segundos a minutos, considerados não-genômicos. Esses efeitos, cujos mecanismos são pouco entendidos, dispensam o uso de maquinaria transcricional e, provavelmente, consistem na sinalização através de receptores transmembrana não identificado, da qual participam proteínas classicamente envolvidas em vias de sinalização rápidas, incluindo cinases e/ou calmodulina. O HT parece interagir com algum receptor transmembrana, e assim estimula a transdução de uma cascata de sinalização envolvendo fosfolipase C (PLC), que culmina na mobilização de cálcio intracelular e na fosforilação de proteínas

(D'arezzo *et al.*, 2004). E, ainda, em alguns casos de sinalização rápida, participam até mesmo os TRs atuando de maneira independente e alternativa à nuclear. Em 2006, Storey e colaboradores demonstraram que a isoforma 2 do receptor TR β (TR β 2) atua no citoplasma, mais especificamente na proteína p85 localizada adjacente à membrana, subunidade regulatória da PI3 kinase, regulando a atividade do canal de potássio KCNH2. Entre outras ações não-genômicas estão a estimulação de bombas e canais iônicos, observada em células intactas e em membranas isoladas (Davis & Davis, 2002), e o relaxamento de células de músculo liso vascular e endotélio aórtico em cultura (Ojamaa *et al.*, 1996). No entanto, ainda não foram identificados receptores de membrana específicos para os HT e, portanto, este mecanismo ainda não é claro.

No entanto, grande parte dos efeitos provocados pelos HTs descritos na literatura ocorre através da ação nuclear, através de uma família de receptores de alta afinidade, os TRs (Lazar, 2003). Foram identificadas várias isoformas de TRs, que por comparação das seqüências genéticas, descobriu-se serem homólogos de produtos do oncogene viral v-erb-A. Constituem a grande família c-erb-A, não só os TRs, mas também receptores para os hormônios glicocorticoides, mineralocorticoides, esteróides sexuais, vitamina D e ácido retinóico (Evans, 1988).

Os TRs são codificados por dois genes, o TR α (NR1A1) e o TR β (NR1A2), encontrados nos cromossomos humanos 17 e 3, respectivamente (Thompson *et al.*, 1987). A partir destes genes, foram identificadas algumas isoformas de TRs α e β , que apresentavam alta afinidade pelo HT (Weinberger *et al.*, 1986).

Em mamíferos, foram identificadas as isoformas TR α 1, TR β 1, TR β 2 e TR β 3, as quais, todas, são capazes de interagir com o T₃ e atuar como um receptor nuclear funcional. Além destas, foram isoladas as variantes de *splicing*, TR α 2, TR $\Delta\alpha$ 1, TR $\Delta\alpha$ 2 e TR $\Delta\beta$ 3. A isoforma TR α 2, apesar de não interagir com o T₃, ainda é capaz de se dimerizar com as isoformas funcionais e competir pela interação com o DNA. As

demais são incapazes de interagir com o DNA e com o ligante (figura 4) (Flamant & Samarut, 2003).

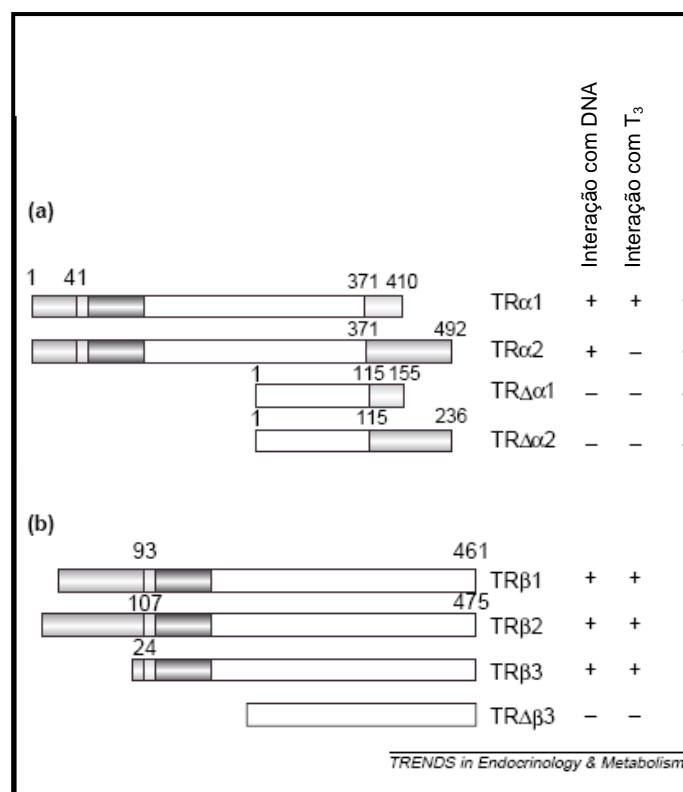


Figura 4. Comparação esquemática das isoformas de TR. Isoformas originadas a partir do gene (a) TRα (NR1A1) e (b) e TRβ (NR1A2). As isoformas de TR compartilham grande homologia em suas seqüências, mas existem algumas particularidades. Por exemplo, TRα1, TRβ1, TRβ2 e TRβ3 interagem com HT, enquanto que TRα2, TRΔα1, TRΔα2 e TRΔ β3 são incapazes de fazê-lo. Cores diferentes representam seqüências correspondentes aos domínios de ativação A/B, de interação com o DNA, e de interação com T₃. Adaptado de Flamant & Samarut, 2003.

A expressão das isoformas de TR apresenta padrões distintos nos diversos tecidos. O TRα1 é expresso de forma ubíqua em todos os tecidos, assim como o TRβ1, que de forma particular é abundante no fígado e no rim (Lazar, 1993). Já o TRβ2 é altamente expresso na retina, na hipófise e no hipotálamo, mas de maneira geral a sua expressão é considerada relativamente restrita (Hodin *et al.*, 1989; Cook *et al.*, 1992).

Como a maioria dos receptores nucleares, a porção central dos TRs contém um domínio capaz de interagir com seqüências específicas da fita dupla de DNA, chamadas

de elementos responsivos a hormônio tireoideano (TREs). As isoformas de TRs reconhecem a seqüência AGGTCA, com a qual são capazes de interagir na forma de monômeros, homodímeros e heterodímeros. Além disso, elas também podem formar heterodímeros com os receptores para ácido retinóico (RXR), para vitamina D ou para estrogênio (Mangelsdorf & Evans, 1995).

Esta regulação pelos TRs envolve uma complexa rede de interações coordenadas com outras proteínas co-reguladoras, incluindo co-ativadores e co-repressores. Alguns complexos co-repressores possuem atividade deacetilase que permite modificar a estrutura da cromatina, de forma a limitar o acesso da maquinaria transcricional basal. De forma oposta, os complexos co-ativadores podem apresentar atividades histona acetiltransferase e metiltransferase, que facilitam a transcrição por deixarem a cromatina mais acessível a outros fatores transcricionais (Smith & O'Malley, 2004).

Os TRs modulam a expressão gênica na presença ou ausência de ligante. Na ausência do hormônio tireoideano, a interação dos TRs com os elementos responsivos de genes alvo, por si só, promove uma modulação da transcrição gênica, efeito conhecido como independente de ligante. A interação do TR, não ligado ao hormônio tireoideano, com o TRE positivo resulta na repressão da transcrição gênica. Esta repressão é mediada pela interação do TR com um complexo repressor, do qual participam o *nuclear receptor corepressor* (N-CoR), o *silencing mediator of retinoid and thyroid receptors* (SMRT) e a proteína histona deacetilase (HDAC) (Hu & Lazar, 2000). A ligação do HT ao TR induz mudanças na sua conformação que resulta na liberação do complexo repressor e favorece o recrutamento de co-ativadores, levando a ativação transcricional (McKenna *et al.*, 1999) (figura 5).

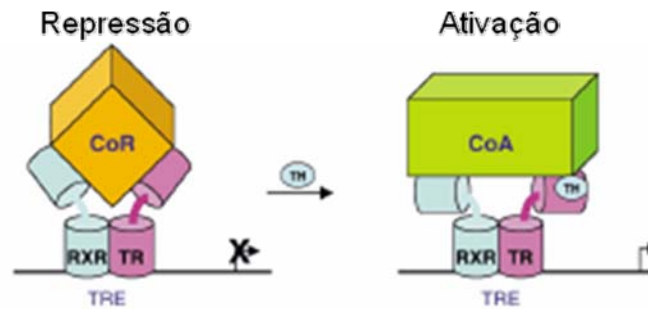


Figura 5. Esquema representativo da regulação positiva da expressão gênica pelo hormônio tireoideano. A ligação do hormônio tireoideano (HT) no seu receptor (TR) promove mudanças conformacionais, que favorecem a liberação do co-repressor (CoR) e o recrutamento do co-ativador (CoA). Adaptado de Lazar, 2003.

Menos caracterizados são os TREs negativos, nos quais a transcrição é estimulada na ausência de T_3 e, de forma oposta, reprimida na presença de T_3 . Um importante efeito fisiológico do HT, envolvendo esta regulação negativa, é a modulação da expressão dos genes que codificam as subunidades do TSH na hipófise. Esse processo é essencial para o funcionamento normal do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (Lazar, 2003). No entanto, o mecanismo molecular em que se baseia esse tipo de regulação é muito pouco entendido, de forma que há dúvidas se a interação do TR com o DNA seria necessária. Foi sugerido que o TR não estaria diretamente ligado ao DNA, mas que esta interação fosse mediada por proteínas componentes do complexo AP1, ou até mesmo que simplesmente não houvesse interação TR-DNA e sim uma interação proteína-proteína: TR-SMRT e TR-NcoR, por exemplo (Pfahl, 1993 ; Tagami *et al.*, 1997). Entretanto em 2003, Shibusawa e colaboradores demonstraram, em experimentos *in vivo*, a importância da interação TR-DNA. Animais mutantes, cujas isoforma de TR β eram incapazes de interagir com o DNA, apresentavam deficiência na supressão dos níveis de TSH. Ainda assim, o mecanismo da regulação negativa é pouco conhecido. Mas de forma geral, em todos os modelos propostos, a interação do HT com seu receptor resulta em uma mudança conformacional deste TR. Isto favoreceria a troca de

uma maquinaria repressora por uma ativadora para um gene alvo positivo ou de uma maquinaria ativadora por uma repressora para um gene alvo negativo (figura 6).

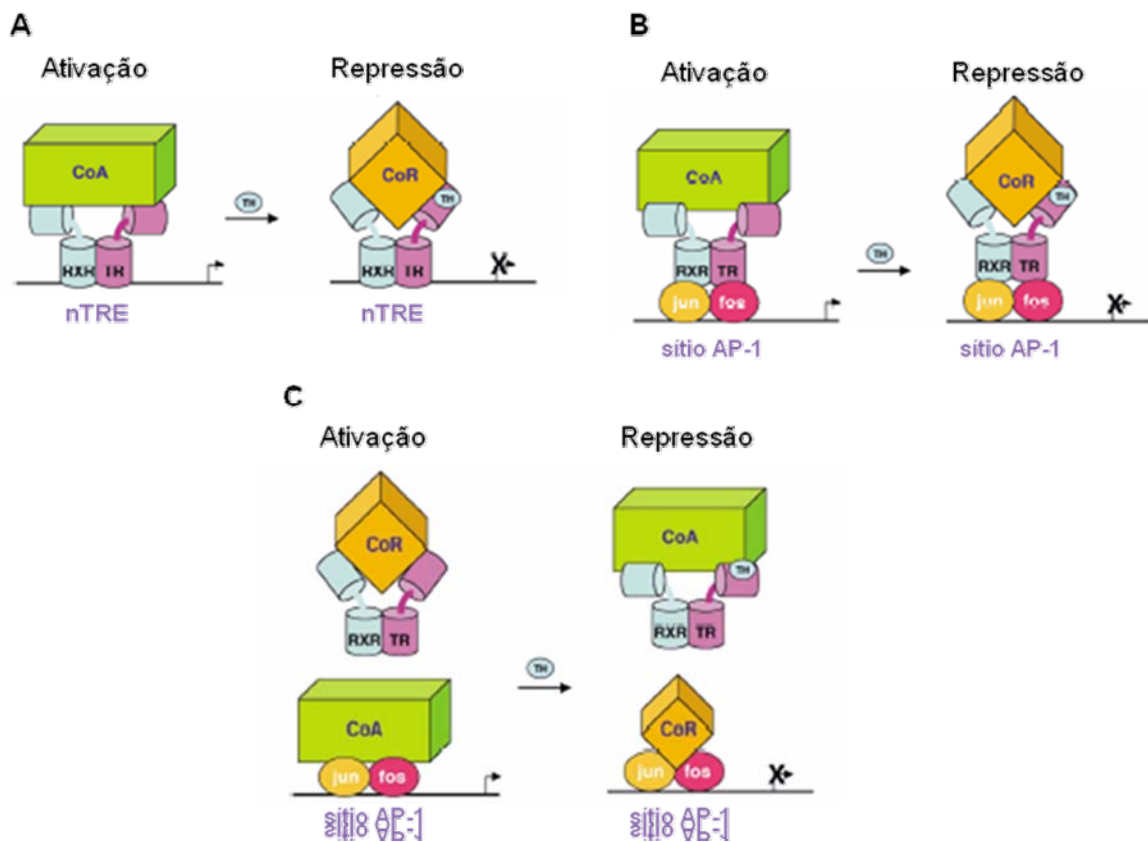


Figura 6. Esquema representativo de possíveis mecanismos de regulação negativa pelo hormônio tireoideano. A ligação do hormônio tireoideano (HT) no seu receptor (TR) promove mudanças conformacionais, que favorecem a liberação do co-ativador (CoA) e o recrutamento do co-repressor (CoR) em um elemento responsivo para hormônio tireoideano negativo (nTRE). **(A)** Esse mecanismo requer a interação direta entre o receptor e o DNA. **(B)** Esse mecanismo é baseado em uma interação proteína-proteína, representada por proteínas do complexo AP-1 (jun/fos)-TR. **(C)** A ligação do hormônio tireoideano a seu receptor recruta o co-ativador, sem interagir com o DNA e a maquinaria repressora, representada por proteínas do complexo AP-1 (jun/fos). Adaptado de Lazar, 2003.

3- EFEITOS PROVOCADOS POR HORMÔNIO TIREOIDEANO

É muito conhecida a participação do HT no desenvolvimento embrionário. Durante o segundo trimestre da gravidez, o hipotireoidismo na mãe pode causar ao feto um déficit intelectual (Hadow *et al.*, 1999). Da mesma forma, a ausência de produção de HT pelo feto em desenvolvimento pode gerar anormalidades na função neural se não houver reposição hormonal logo após o nascimento. Não só durante o desenvolvimento,

mas também após o nascimento, a manutenção do HT dentro da faixa de normalidade é extremamente importante para os processos corretos de desenvolvimento do cerebelo, migração neuronal, mielinização, sinaptogênese e arborização (Oppenheimer & Schwartz, 1997).

O HT ainda exerce efeito no crescimento do esqueleto e sua mineralização durante o desenvolvimento (Fraichard *et al.*, 1997), podendo atuar diretamente através dos TRs que, por sua vez, interagem com outros receptores nucleares como o da vitamina D (Williams *et al.*, 1994). E, ainda, podem atuar indiretamente, por exemplo, regulando a concentração sérica de osteocalcina (Gouveia *et al.*, 1997; Brent, 2000), que possui um papel importante na mineralização do osso. Assim, o HT participa desta regulação importante para a homeostase do tecido ósseo.

Os efeitos fisiológicos mais conhecidos dos HTs são o aumento da taxa basal de consumo de oxigênio e a produção de calor, que ocorre na maioria dos tecidos (Goglia *et al.*, 1999). Além disso, o HT estimula processos que visam melhorar o suprimento para esta maior demanda de oxigênio, entre eles, o aumento da taxa respiratória de repouso e ventilação por minuto (Pino-García *et al.*, 1998) e, ainda, efeitos sobre o sistema cardiovascular (melhor detalhados no item 3.1). O HT também provoca o aumento da produção de eritropoietina, que resulta no aumento do número de hemácias e, conseqüentemente, uma melhora na capacidade carreadora de oxigênio (Popovic *et al.*, 1977).

Outro efeito do HT é o aumento da provisão dos substratos necessários para a oxidação, por exemplo, através dos estímulos da absorção gastrointestinal de glicose e das vias de glicogenólise e gliconeogênese, as quais aumentam a disponibilidade de glicose para as células (Moller *et al.*, 1996).

O sinal do HT em cada tecido ou tipo celular pode ser modulado em vários níveis, incluindo na expressão de isoformas de TR, nos elementos responsivos de genes

regulados, na disponibilidade de receptores nucleares capazes de interagir com TR, nas interações com co-ativadores e co-repressores, e na disponibilidade do ligante (Brent, 2000). No entanto, através de estudos *in vitro*, tornou-se difícil identificar funções específicas das isoformas. Por isso, foram desenvolvidos modelos de animais geneticamente modificados, nos quais são afetadas as funções e a expressão dos receptores de hormônios tireoideanos. Eles são ferramentas de busca de novos alvos fisiológicos da ação dos hormônios tireoideanos, para o entendimento do papel das diferentes isoformas de TR e para compreensão do mecanismo de regulação da transcrição gênica exercido pelo TR.

O animal *knockout* seletivo de TR α 1, cuja expressão de TR α 2 é preservada, apresenta diminuição da temperatura corporal e da frequência cardíaca, ambas não responsivas ao tratamento com T₃ (Wikström *et al.*, 1998). Já o animal *knockout* combinado de TR α 1/TR α 2, em que ocorre a deleção das duas isoformas, possui um fenótipo mais severo, incluindo defeitos na mineralização óssea e no desenvolvimento intestinal, e não sobrevive após cinco semanas de vida (Fraichard *et al.*, 1997). Ambos os modelos apresentam concentração sérica de HT e TSH ligeiramente reduzidas, de forma que a existência de um quadro mais severo quando existe a deleção de uma isoforma não ligadora de T₃ sugere que esta, assim como as outras variantes de *splicing* Δ TR α 1 e Δ TR α 2, exerçam papéis importantes na sinalização do HT ou na sua modulação (Brent, 2000).

E ainda, resultado do cruzamento dos modelos de *knockout* dos genes TR α 1 e TR β , os camundongos TR β ^{-/-} TR α 1^{-/-} apresentam glândula tireóide aumentada e concentração sérica elevada de T₄, T₃ e TSH (Göthe S *et al.*, 1999). Outra característica relevante é o crescimento atenuado associado às baixas concentrações séricas de GH e IGF-I, e ao desenvolvimento e mineralização óssea prejudicados. Os animais também apresentam redução da frequência cardíaca e da temperatura corporal (Johansson *et al.*,

1999), e as fêmeas possuem fertilidade diminuída, assim como redução da sobrevivência dos filhotes (Brent, 2000).

Aparentemente, a isoforma TR β é importante no desenvolvimento da cóclea e retina e, ainda, parece ser o principal regulador da homeostase do fígado e do *feedback* hipotalâmico-hipofisário. Nos animais *knockout* de TR β , a concentração sérica de TSH, T₄ e T₃ estão elevadas e o excesso de T₃ pode ativar o receptor TR α 1, de forma que o efeito em cada tecido depende do padrão de expressão das isoformas. Assim, o fenótipo deste animal pode variar entre o hipotireoidismo, por causa da falta de TR β , e hipertireoidismo, pela concentração sérica elevada de T₃ atuando em TR α (Flamant & Samarut, 2003).

Este fenômeno também acontece em pacientes, nos quais foi isolada uma variedade de mutações no TR β . A maioria corresponde a mutações na região do receptor responsável pela interação com o HT. Estas mutações levam ao desenvolvimento da Síndrome de Resistência a Hormônio Tireoideano (RTH), a qual é caracterizada por alta concentração de HT livre no sangue e pela falha na supressão da secreção do TSH. Pacientes portadores desta síndrome exibem bócio, baixa estatura, perda de peso, taquicardia, perda de audição, desordem de hiperatividade com déficit de atenção, baixo QI e dislexia (Brucker-Davis *et al.*, 1995).

Na Síndrome de Resistência a Hormônio Tireoideano, de maneira similar aos *knockouts*, ocorrem sinais de hipo- e hipertireoidismo, o que sugere resistência variável em diferentes tecidos. Esta variação tecidual depende principalmente da distribuição tecido-específica das isoformas de receptor de hormônios tireoideanos. A severidade da resistência depende do grau de falha na interação com o ligante e na interação com co-fatores nucleares tecido-específicos (Yen, 2003).

Dois modelos de camundongos com mutações *knock-in* no gene do TR β foram desenvolvidos para reproduzir a Síndrome de Resistência a Hormônio Tireoideano, são

eles: TR β KI Δ 337T (Hashimoto *et al.*, 2001) e TR β PV (Kaneshige *et al.*, 2000). No primeiro modelo, ocorre a deleção do aminoácido treonina na posição 337, e no segundo, a mutação elimina a função de ativação C terminal (domínio AF-2) necessária para a transativação. Ambas as modificações impedem o receptor de interagir com HT, mas a capacidade de interagir com o DNA e com co-fatores aparentemente permanece intacta (Cheng, 2005).

Os animais TR β KI Δ 337T exibem profundas anomalias no desenvolvimento cerebral (Hashimoto *et al.*, 2001), além de apresentarem expressão anormal de opsinas na retina (Pessoa *et al.*, 2008). Em estudo realizado no nosso laboratório, foi verificado que camundongos machos homozigotos apresentam diminuição do crescimento linear e alterações metabólicas, como maior sensibilidade à insulina e menor conteúdo de glicogênio hepático (Santiago, 2007).

Os camundongos heterozigotos para a mutação PV apresentam características típicas da Síndrome de Resistência a Hormônio Tireoideano como regulação anormal do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide e déficit do crescimento. Já os homozigotos apresentam um quadro severo de Síndrome de Resistência a Hormônio Tireoideano, além de retardo no crescimento, anormalidade na regulação da concentração sérica de colesterol, defeitos auditivos, redução do peso corporal e comportamento hiperativo (Cheng, 2005). Mutações no gene do TR α ainda não foram identificadas em pacientes. Pesquisadores desenvolveram camundongos com a mesma mutação PV inserida no gene do TR α (Kaneshige *et al.*, 2001). Os animais heterozigotos sobrevivem após o nascimento, apesar de apresentarem alta taxa de mortalidade e diminuição na fertilidade. Já os homozigotos TR α ^{PV/PV} são raramente obtidos e morrem logo após o nascimento. Animais heterozigotos e homozigotos apresentam concentração sérica elevada de T₃ e TSH apesar de níveis normais de T₄ (Kaneshige *et al.*, 2001). Esta

combinação de TSH elevado e proporção T_4/T_3 reduzida sugere disfunção tireoideana moderada (Flamant & Samarut, 2003).

Os distintos fenótipos observados nos camundongos heterozigotos $TR\alpha^{PV}$ (Kaneshige *et al.*, 2001) e $TR\beta^{PV}$ (Kaneshige *et al.*, 2000) demonstram que as funções dos TRs mutantes *in vivo* são específicas de cada isoforma e dependem da quantidade de proteína mutante expressa em cada tecido. Além disso, esses estudos sugerem que mesmo não tendo sido documentada nenhuma mutação no gene do $TR\alpha$ em humanos com Síndrome de Resistência a Hormônio Tireoideano, as mutações que afetam $TR\alpha$ não são silenciosas. Então, acredita-se, que as mutações em $TR\alpha$ provavelmente ocorram em humanos, mas seus fenótipos gerais resultantes seriam distintos dos descritos para a Síndrome de Resistência a Hormônio Tireoideano associada com as mutações em $TR\beta$ (O'Shea & Williams, 2002).

3.1- Hormônio tireoideano e efeitos cardíacos

O coração, assim como todo o sistema cardiovascular, é um dos alvos da ação do HT, tanto no início do desenvolvimento como na idade adulta. Em roedores, antes do nascimento, os ventrículos expressam altos níveis de β -MHC (cadeia pesada da miosina β) e baixos níveis de α -MHC (cadeia pesada da miosina α). No entanto, após o nascimento, os níveis de α -MHC aumentam, talvez para substituir os de β -MHC, que diminuem (Lompré *et al.*, 1984). Esta mudança de expressão para um padrão adulto tem sido relacionada ao aumento dos níveis de HT circulantes (Chizzonite & Zak, 1984). De forma parecida, a isoforma 2a da Cálcio-ATPase de retículo sarcoplasmático (SERCA-2a) e a sua subunidade regulatória fosfolambam (PLB) são pouco expressas no coração durante a fase embrionária, mas têm seus níveis aumentados após o nascimento em resposta a alterações nas concentrações plasmáticas de HT (Reed *et al.*, 2000).

Muitos outros processos moleculares essenciais à função cardíaca são influenciados pela concentração sérica de hormônio tireoideano. Entre eles, a regulação da expressão de vários canais iônicos, genes que codificam proteínas envolvidas na contração do músculo cardíaco e genes que codificam enzimas e proteínas envolvidas em vários processos regulatórios (Klein & Ojamaa, 2001) (figura 7).

A combinação de efeitos provocados por HT em nível molecular resulta em efeitos sistêmicos como o aumento da frequência cardíaca, da velocidade e força de contração, assim como a diminuição do tempo de relaxamento diastólico e da resistência vascular periférica. E todos estes fatores, por sua vez, contribuem para o aumento do débito cardíaco (Klein & Ojamaa, 2001). A administração de antagonista do receptor β adrenérgico a pacientes hipertireoideos não provoca alteração na performance contrátil ventricular, porém é capaz de atenuar o aumento da frequência cardíaca. Isto demonstra que o HT possui efeitos diretos no sistema cardiovascular, enquanto uma parte deles é mediada pelo sistema adrenérgico. Além disso, geralmente, o bloqueio β -adrenérgico somente atenua a taquicardia, de forma que a frequência cardíaca ainda permanece um pouco elevada. Isto sugere que o HT afeta diretamente o nodo sinoatrial (Fazio *et al.*, 2004).

Outro efeito indireto provocado por HT é o aumento de volume sanguíneo, através da ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona e da secreção de eritropoietina. Esta mudança no volume é acompanhada por aumento do retorno venoso, que é acomodado sem alterações na pressão e volume no ventrículo esquerdo no fim da diástole, em parte, devido ao relaxamento mais eficiente da musculatura (Fazio *et al.*, 2004).

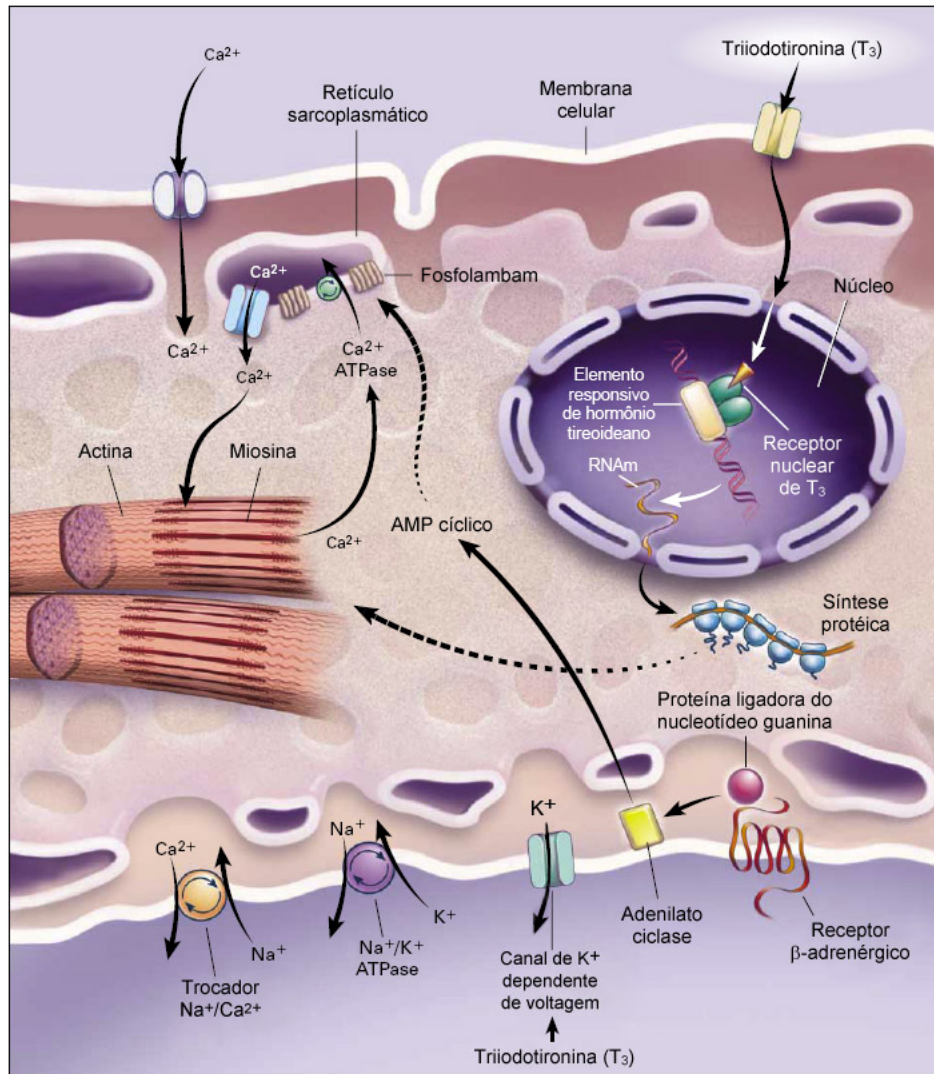


Figura 7. Sítios de ação da triiodotironina nos cardiomiócitos. A triiodotironina entra na célula, possivelmente através de um mecanismo de transporte específico, e interage com o receptor nuclear para triiodotironina. A seguir, o complexo se liga a elementos responsivos para hormônio tireoideano de genes de diversos constituintes celulares e regula a transcrição destes genes, incluindo aqueles para Ca^{2+} -ATPase (SERCA) e fosfolambam no retículo sarcoplasmático, miosina, receptores β -adrenérgicos, adenilato ciclase, proteínas ligadoras do nucleotídeo guanina (também chamadas de proteínas G), trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, Na^+/K^+ -ATPase, e canais de potássio voltagem dependentes. Ações não-nucleares da triiodotironina sobre canais iônicos de K^+ e Ca^{2+} estão indicadas na membrana. As setas descontínuas indicam sinalizações com múltiplas etapas e RNAm corresponde a RNA mensageiro. Adaptado de Klein & Ojamaa, 2001.

O HT também provoca efeitos importantes na vasculatura, entre eles, o relaxamento das células musculares lisas dos vasos, que resulta na redução da resistência vascular periférica (Ojamaa *et al.*, 1996).

O hipotireoidismo possui efeitos opostos aos causados pelo excesso de HT, no entanto, alguns pacientes apresentam poucos sintomas, sendo bradicardia e hipertensão

sistêmica os mais comuns (Klein & Ojamaa, 2001). Alguns ainda apresentam anormalidades no registro eletrocardiográfico (ECG), incluindo o alongamento do intervalo QT, que corresponde ao período entre o início da despolarização e o fim da repolarização ventriculares (Klein & Ojamaa, 2001). A hipertensão sistêmica no hipotireoidismo pode ser explicada em parte pelo aumento da resistência vascular periférica (Klein & Ojamaa, 2001). A anormalidade mais consistente é a diminuição da função diastólica do ventrículo esquerdo, caracterizada pela lentificação do relaxamento miocárdico e diminuição do enchimento ventricular esquerdo. Isto pode levar a uma diminuição no volume de ejeção, e, conseqüentemente, na função sistólica do ventrículo esquerdo. Estes fatores combinados podem levar a um débito cardíaco subnormal. (Fazio *et al.*, 2004).

Alguns trabalhos indicam que desordens cardiovasculares agudas e crônicas podem alterar o metabolismo do HT. Após quatro horas de infarto agudo do miocárdio, as concentrações séricas de T₃ e T₄ estão reduzidas em aproximadamente 20% e 40%, respectivamente (Franklyn *et al.*, 1984). Ainda pode ocorrer uma mudança no padrão de expressão das desidases cardíacas, por exemplo, o aumento de D3 em modelo de injúria dos cardiomiócitos (Olivares *et al.*, 2007). Desta forma, o *status* tireoideano alterado em paciente com desordens cardiovasculares poderia contribuir para o prejuízo da função cardíaca (Fazio *et al.*, 2004).

Como mencionado anteriormente, a maioria dos efeitos provocados pelo HT descritos na literatura é mediada por sua ação nuclear, através dos TRs. No coração e na vasculatura estão presentes as isoformas de TR codificadas pelos genes α e β . Um dos fatores que contribui para o fato do HT provocar diversos efeitos em diferentes tecidos é a expressão diferencial das isoformas de TR. Por exemplo, no ventrículo, a isoforma TR α 1 é a isoforma predominantemente expressa, apresentando uma taxa de

3:1 em relação à isoforma TR β (Stoykov *et al.*, 2006). Por isso, no ventrículo, TR α 1 é a isoforma que aparentemente mais interage com T₃.

Além disso, no coração, assim como em outros tecidos, a expressão das isoformas de TR é heterogênea, variando de acordo com a região do órgão ou ainda mais especificamente com o tipo celular e com a fase da vida. Durante a vida embrionária, ambos TR α 1 e TR β 1 são expressos no miocárdio, porém na vida adulta a expressão de TR β permanece confinada ao átrio, aos nodos sinoatrial e atrioventricular e ao sistema de condução ventricular (Stoykov *et al.*, 2006). Já TR α 1 continua amplamente expresso, sendo encontrado no átrio, nos cardiomiócitos de trabalho, nos nodos sinoatrial e atrioventricular e no sistema de condução atrioventricular. Assim, ambos TR α 1 e TR β são encontrados no nodo sinoatrial, no nodo atrioventricular e no feixe de His. Durante todos os períodos da vida em que foi observada, a expressão das isoformas TR α 1, TR α 2 e TR β se mostrava sempre mais marcante no átrio que no ventrículo (Stoykov *et al.*, 2006).

Estudos em camundongos com mutações *knockout* nos genes dos dois principais receptores para hormônio tireoideano, TR α e TR β , mostraram que nos camundongos em que falta a isoforma TR α 1 ocorre diminuição na frequência cardíaca e repolarização ventricular prolongada (Wikstrom *et al.*, 1998). No entanto, a deleção de TR α 1 e TR β resulta em um fenótipo cardíaco similar ao obtido quando se tem somente a deleção de TR α 1, indicando que este último é o receptor mais importante na mediação dos efeitos provocados por HT no coração (Johansson *et al.*, 1999).

No entanto, outros estudos indicam que tanto TR α 1 quanto TR β 1 possuem importância realizando diferentes papéis (Weiss *et al.*, 2002). De forma contrária aos camundongos deficientes em TR α 1, que ainda respondem ao estímulo do T₃, os camundongos deficientes em TR β apresentam fenótipo oposto, como taquicardia e

intervalo QT encurtado, que não se altera com administração de T_3 (Weiss *et al.*, 2002; Wikstrom *et al.*, 1998; Johansson *et al.*, 1999). Além disso, o nodo sinoatrial, região que comanda a frequência cardíaca, apresenta expressão de $TR\alpha$ e $TR\beta$, indicando que as duas isoformas podem ter importância na regulação do ritmo cardíaco (Stoykov *et al.*, 2006). Outra demonstração desta hipótese é que animais $TR\beta^{PV/PV}$ (que apresentam níveis elevados de HT), quando submetidos à condição de eutireoidismo, apresentam diminuição da frequência cardíaca (Swanson *et al.*, 2003).

Frente aos diversos alvos de atuação do HT, entre eles o sistema vascular e outros sistemas reguladores da função cardíaca, a caracterização dos efeitos do hiper- ou hipotireoidismo diretamente sobre a função cardíaca é dificultada. Por exemplo, simultaneamente aos efeitos provocados diretamente no coração, os HTs também influenciam a hemodinâmica vascular. Desta forma, a falta ou excesso de hormônio tireoideano atuando sobre a musculatura lisa dos vasos, através de mudanças na pré- e pós-carga (resistências proporcionadas pelo volume de sangue no ventrículo após o enchimento e pela circulação, respectivamente, as quais a força de contração ventricular deve superar para bombear o sangue adequadamente), modulam a função cardíaca, o que pode compensar ou alterar as anormalidades que o HT provocaria diretamente no coração (Klein & Ojamaa, 2001).

Em 2000, Pazos-Moura e colaboradores desenvolveram uma linhagem de camundongos transgênicos (KS) nos quais a expressão do $TR\beta$ contendo a mutação de deleção do aminoácido treonina na posição 337 ($\Delta 337T$) foi direcionada exclusivamente aos cardiomiócitos, utilizando o promotor cardíaco-específico α -MHC. Esta mutação foi isolada a partir de pacientes com Síndrome de Resistência a Hormônio Tireoideano, e como mencionado anteriormente, torna o receptor incapaz de interagir com o T_3 (Hashimoto *et al.*, 2001). Contudo, ele ainda é capaz de se ligar ao DNA e competir pelos TREs (Usala *et al.*, 1991), o que o transforma em um co-repressor constitutivo. O

receptor permanece ligado ao DNA e a co-repressores (figura 8) (Hashimoto, *et al.*, 2001), exercendo efeito independente de ligante. Além disso, o receptor mutante é capaz de dimerizar com as isoformas normais, agindo como um dominante negativo. (Yen & Chin, 1994).

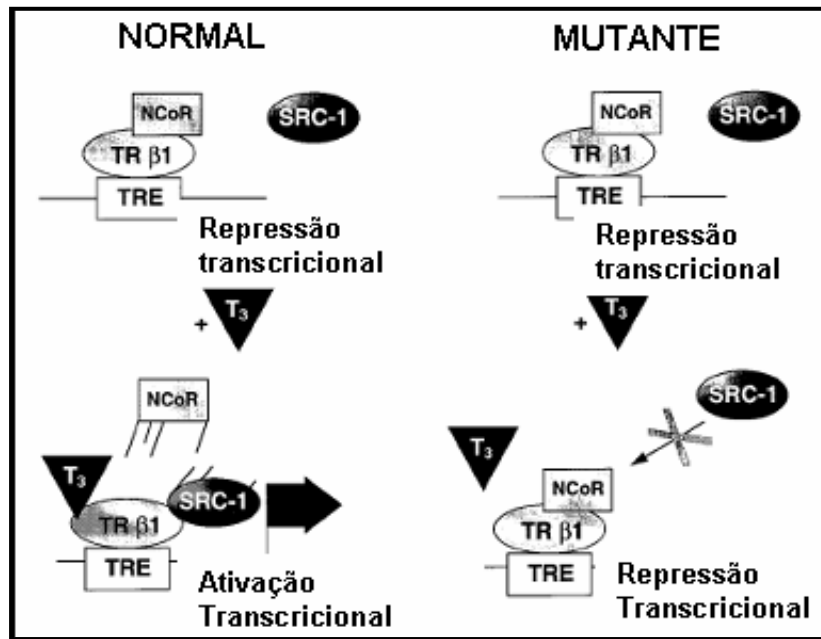


Figura 8. Modelo de resistência causada por mutação no TR em TRE positivo. Quando o TR normal se liga ao DNA, a adição de T₃ resulta na dissociação do co-repressor, permitindo o recrutamento do co-ativador e ativação da transcrição. Quando o TR mutante se liga ao DNA, o T₃ adicionado não interage com o TR mutante, o co-repressor NCoR não se dissocia, o co-ativador SRC-1 não é recrutado, e por fim, a transcrição gênica permanece reprimida. (TRE) elemento responsivo ao hormônio tireoideano; (T₃) triiodotironina. Adaptado de Safer *et al.*, 1998.

Os camundongos KS, mesmo na presença de concentração sérica de HT normal, apresentam fenótipo semelhante ao observado no coração de animais com hipotireoidismo, incluindo bradicardia e prolongamento dos seguintes parâmetros eletrocardiográficos, intervalo PR, complexo QRS e intervalo QT, que correspondem ao início da despolarização atrial até o início da despolarização ventricular, à despolarização ventricular, e à repolarização atrial e principalmente ventricular, respectivamente. Nos ensaios funcionais *ex vivo*, foi observada diminuição da função contrátil. Nesses animais, a expressão da α -MHC, predominante em roedores adultos

eutireoideos, encontra-se diminuída, e a isoforma β superexpressa. Este fato explica, em parte, a citada disfunção contrátil (observada em corações isolados), já que a β -MHC possui menor atividade ATPásica que a α -MHC (Lompré *et al.*, 1984). No entanto, experimentos *in vivo* demonstraram que os animais KS possuem função contrátil relativamente igual aos selvagens (Pazos-Moura, *et al.*, 2000), demonstrando a existência de mecanismos compensatórios da função cardíaca.

O prolongamento dos intervalos no ECG indica redução na velocidade de propagação do potencial de ação de uma célula cardíaca para outra. A propagação da atividade elétrica no miocárdio depende da transferência intercelular de corrente, que ocorre via junções comunicantes (figura 9A).

4- JUNÇÕES GAP OU JUNÇÕES COMUNICANTES

As junções comunicantes ou junções do tipo *gap* são discretas áreas de contato célula-célula, que se apresentam na forma de canais e permitem a comunicação simples e rápida entre duas ou mais células. Os compartimentos citoplasmáticos de células vizinhas permanecem conectados, sendo rota de passagem de moléculas com tamanho inferior a 1kDa, incluindo mensageiros secundários como o Ca^{2+} , inositol fosfatos, nucleotídeos cíclicos e íons (Hervé, 2004) (figura 9A). Desta forma, as junções comunicantes possuem papel dinâmico na regulação de vias de transdução de sinal, além de prover um caminho direto para metabólitos que medeiam a homeostase celular e íons que propagam sinais elétricos no coração e no sistema nervoso central (Sosinsky & Nicholson, 2005).

Estes canais resultam da junção de dois hemicanais ou conexons, compostos cada um por seis unidades protéicas da família das conexinas dispostas de maneira a formar um poro aquoso. O conexon pode ser dividido em três domínios funcionais: (1)

o domínio extracelular, importante no reconhecimento célula-célula e acoplamento das conexinas; (2) o domínio transmembrana, principal constituinte do poro; e (3) o domínio citoplasmático, o qual tem influência sobre os estados de abertura do canal (Sosinsky & Nicholson, 2005).

Até o momento, foram descritos vinte membros da família de genes da conexina expressos no genoma de camundongo. Muitos tipos celulares expressam variadas isoformas de conexinas, que podem formar construções de conexons homo-oligoméricos, compostos de conexinas similares. No entanto, conexinas diferentes também podem se reunir para compor conexons hetero-oligoméricos. E por fim, ainda podem ser formados canais homotípicos ou heterotípicos, constituídos por dois conexons iguais e dois diferentes, respectivamente (figura 9B) (Hervé, 2004).

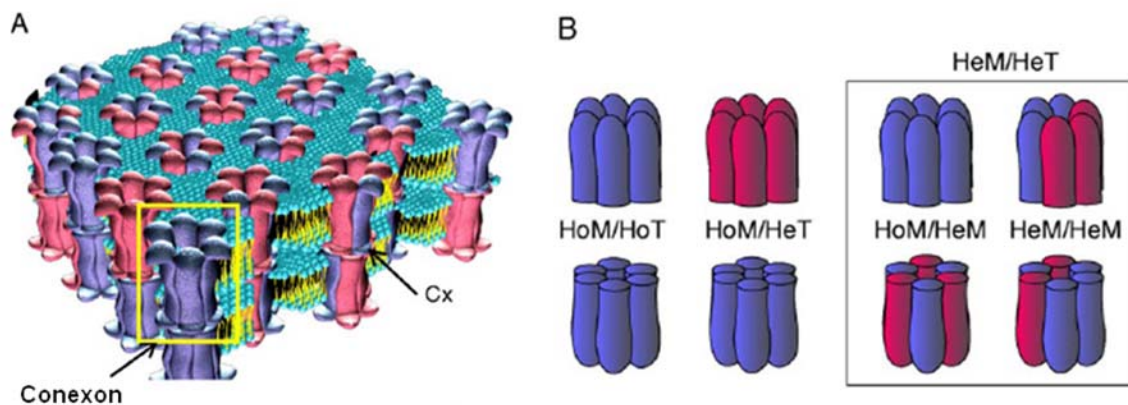


Figura 9. Junções comunicantes. (A) Possibilidades de formar diferentes canais junccionais entre células que co-expressam CxA (azul) e CxB (rosa). (B) Conexons compostos por somente uma isoforma de conexina são chamados de homoméricos (HoM), enquanto que conexons formados por mais de uma isoforma de conexina são heteroméricos (HeM). Quando dois conexons idênticos se acoplam, eles formam um canal homotípico (HoT), enquanto que o acoplamento de conexons não idênticos originam um canal heterotípico (HeT). Existem dois tipos de canais HeM/HeT: os que contém conexons HoM e HeM (HoM/HeM) e os que contém somente conexons HeM (HeM/HeM). Adaptado de Cottrell & Burt, 2005.

Tais combinações conferem a cada tipo de junção propriedades seletivas quanto à carga e ao tamanho do poro, e, conseqüentemente, especificidade significativa em relação às moléculas que podem atravessá-lo. Assim, junções heterotípicas podem ter permeabilidades moleculares distintas das junções homotípicas (Sosinsky & Nicholson,

2005). As conexinas, assim como as diferentes junções por elas formadas, apresentam padrão distinto de expressão em diferentes tecidos, desempenhando papéis variados em cada um deles. Por isso, a deficiência de uma determinada isoforma de conexina está associada a uma variedade de doenças incluindo algumas formas de neuropatias, surdez hereditária, catarata, doenças de pele e do coração e câncer (Sáez *et al.*, 2003).

4.1 – Regulação do acoplamento da junção comunicante

O grau de acoplamento intercelular é modulado pelo número de canais presentes na membrana e por seus estados funcionais. A disponibilidade dos canais pode ser regulada pela quantidade de proteínas sintetizadas pelo retículo endoplasmático (RE) e por seu sistema de qualidade, que verifica se as proteínas que saem do RE estão corretamente montadas. No complexo de Golgi, proteínas podem ser transportadas para a membrana ou redirecionadas aos lisossomos. E, ainda, as proteínas já presentes na membrana podem ser selecionadas para serem endocitadas, sendo posteriormente destinadas à degradação ou a retornar para a membrana (Hervé *et al.*, 2004) (figura 10).

As conexinas, assim como outras proteínas transmembrana, são sintetizadas nos ribossomos do RE, podendo ou não passar pelo complexo de Golgi antes de chegar à membrana. Cada subunidade é formada por quatro domínios transmembrana e a organização de sua estrutura é atingida durante a integração na membrana do RE. A formação do canal acontece após a interação das subunidades prontas. As combinações possíveis excedem muito o número real de diferentes subtipos de canais normalmente montados, sugerindo a existência de uma regulação na montagem das subunidades. De fato, a interação entre as isoformas é seletiva, de forma que a existência de seqüências sinal na cadeia polipeptídica permite a interação de conexinas compatíveis. Esta montagem pode ocorrer tanto no RE quanto no complexo de Golgi, sendo necessária

para a translocação do canal à membrana. Isto ocorre por difusão, em casos de proximidade das membranas, ou através de vesículas transportadas ao longo de microtúbulos e filamentos de actina (Segretain & Falk, 2004) (figura 10).

O conexon pode se mover lateralmente no plano da membrana, e por afinidade, permanecer próximo de outros conexons como acontece nas áreas de placas de junções comunicantes, regiões especializadas que contém centenas de canais (Segretain & Falk, 2004). Canais recém sintetizados são adicionados sozinhos ou em pequenos grupos nas regiões terminais da placa, já canais mais antigos do centro são retirados. A meia-vida das conexinas varia de 1 a 5 horas e a degradação é um processo complexo, pois, em condições fisiológicas, uma vez formado, o canal não pode ser mais dividido em dois hemicanais. O canal inteiro deve sofrer invaginação e ser transportado em vesícula para o citosol à espera de ser degradado, ou até mesmo retornar à membrana como forma de reciclagem. Após internalização de forma isolada ou em grupo (formação de junções anulares), os canais podem sofrer degradação por proteassoma e lisossomos, respectivamente (Segretain & Falk, 2004) (figura 10).

Como já mencionado, o estado funcional dos canais é uma particularidade determinante no acoplamento. A passagem de moléculas através das junções comunicantes é regulada por mudanças específicas na voltagem transjuncional (V_j) e na composição iônica do citosol, por eventos de fosforilação e ainda pelas interações com outras moléculas (Bukauskas & Verselis, 2004).

Junções comunicantes possuem algumas propriedades comuns aos canais iônicos, entre elas a de alterar a condutância frente a variações na voltagem. Apesar de apresentarem pouca ou nenhuma sensibilidade a voltagem transmembrana (V_m), possuem algum grau de sensibilidade a V_j , que pode variar entre as conexinas, de modo a conferir um padrão de condutância relacionada à voltagem para cada tipo de junção (Bukauskas & Verselis, 2004).

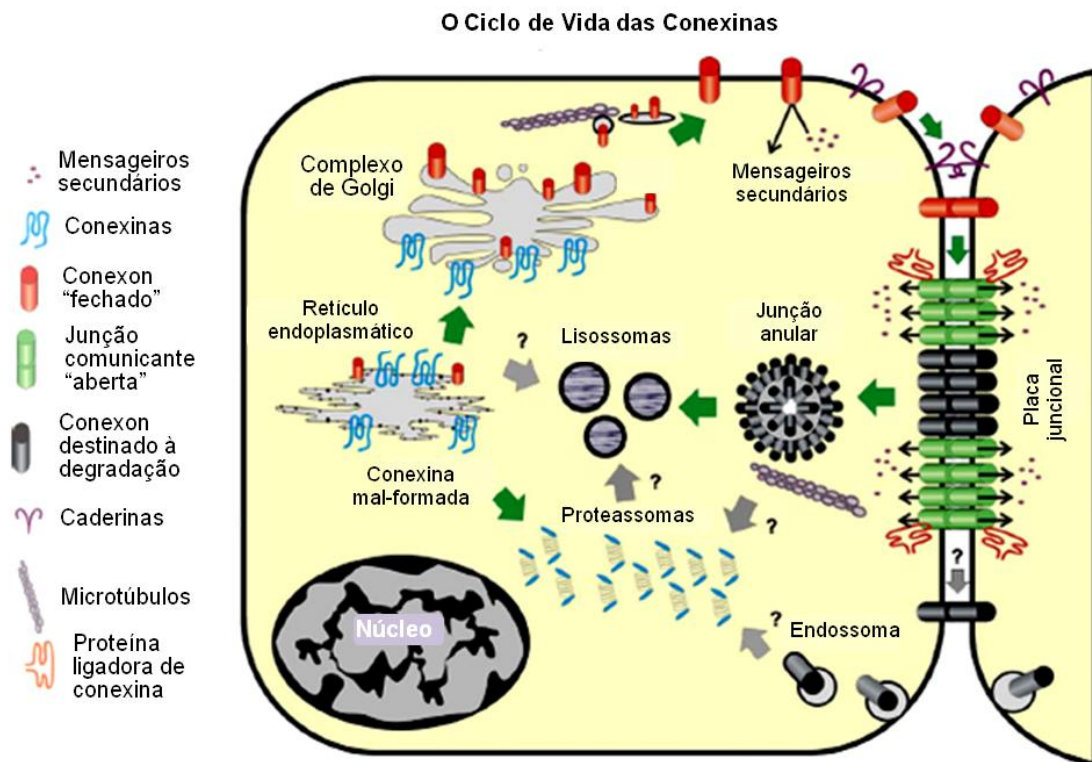


Figura 10. Modelo esquemático representando o ciclo de vida de uma conexina. A síntese da cadeia polipeptídica das conexinas ocorre no retículo endoplasmático, podendo ou não passar pelo complexo de Golgi. Essas organelas também são os sítios de oligomerização e formação de conexons. As proteínas formadas incorretamente sofrem degradação em proteassomas, enquanto que os conexons viáveis são destinados à membrana através de vesículas de transporte, processo que pode ser facilitado por microtúbulos. Proteínas de adesão e proteínas ligadoras de conexinas parecem ter um papel na disposição correta dos canais, que tendem a se aglomerar e formar a placa juncional. Pela extremidade, conexons novos são inseridos, enquanto que os canais centrais eventualmente perdem a função e são internalizados em estruturas formadas por bicamadas lipídicas oriundas da membrana, chamadas de junções anulares. Posteriormente, estes sofrem degradação por proteassomas e/ou lisossomas, sendo a meia-vida de uma conexina inferior a 5 horas. Adaptado de Laird, 2005.

O aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular, principalmente por entrada a partir do meio externo, está associado à diminuição da condutância das junções em células de acinos pancreáticos. Baixas concentrações de acetilcolina (100nM), o suficiente para causar somente liberação parcial de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, não afeta o acoplamento, enquanto concentrações mais elevadas (1 μM) induzem entrada de Ca^{2+} e desacoplamento das células (Peracchia, 2004). Além disto, frente a uma acidificação do citosol, a condutância dos canais diminui. Este processo pode existir

através de um sinergismo entre Ca^{2+} e H^+ na redução da condução, ou ainda que o Ca^{2+} possa mediar o desacoplamento observado durante a mudança no pH. Em situações em que ocorre somente acidose, o acoplamento é reduzido em 10%, enquanto que acidose simultânea ao aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular diminui a condução em 78% (Peracchia, 2004).

Em termos de regulação, a resposta das junções comunicantes à fosforilação parece ser mais relevante. Existem muitos alvos para diferentes kinases na região C terminal das conexinas, sendo que, dependendo do sítio de fosforilação, ocorre a indução de fenômenos variados, incluindo abertura ou fechamento, inserção ou retirada da membrana e a degradação do canal (Sosinsky & Nicholson, 2005).

A condutância de cada canal pode ser afetada pelo grau de fosforilação das conexinas da célula, que na maioria dos casos favorece e estabiliza a passagem de moléculas pelo canal. Algumas junções, entre elas as compostas por conexina43 (Cx43), chegam a apresentar pelo menos três estágios de condução diferentes. Para não causar variações no ambiente intracelular é esperado que a maioria dos conexons esteja no estado fechado assim que são inseridos na membrana. Neste caso, os eventos de fosforilação que ocorrem nas organelas, durante a síntese das conexinas, devem corresponder a um processo necessário para mantê-los fechados. Neste caso, a função da fosforilação seria aumentar a probabilidade de fechamento dos canais. Conexons não justapostos de uma célula encontram-se fechados, mas, ao interagirem com os de uma célula adjacente, se abrem e este processo pode ser novamente favorecido por fosforilação (Moreno, 2005).

A maioria das conexinas se encontra fosforilada *in vivo*, principalmente em resíduos serina e em menor proporção em resíduos treonina e tirosina. A Cx43 é uma das mais expressas e aparentemente é necessário um nível basal de fosforilação em, no mínimo, cinco sítios serina para a montagem e função das junções comunicantes (Solan

& Lampe, 2005). Estudos têm demonstrado a participação de fatores de crescimento, hormônios e mediadores inflamatórios na regulação da comunicação juncional através de fosforilação (Warn-Cramer & Lau, 2004). Em células tumorais originadas da mama, assim como em outros tipos celulares, agentes que elevam a concentração intracelular de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) aumentam a comunicação intercelular, por estimular a síntese de Cx43 fosforilada e/ou aumento do tráfego de conexons para a membrana. O aumento do número de junções formadas induzido por AMPc parece ser mediado pela ativação de proteína cinase A (PKA) (Solan & Lampe, 2005).

As placas juncionais são compostas de conexinas fosforiladas e outras não fosforiladas, enquanto as junções anulares contêm principalmente proteínas fosforiladas. Estudos demonstraram que as isoformas fosforiladas de Cx43 têm essencialmente a mesma meia-vida que as não fosforiladas, sugerindo que eventos de fosforilação de Cx43 não alteram drasticamente o tempo de *turnover* da proteína (Laird, 2005). Em geral, a fosforilação de conexinas não é um pré-requisito genérico para as proteínas serem marcadas para degradação como evidenciado pelo fato da Cx26 não sofrer fosforilação e ainda apresentar uma curta meia-vida. Apesar de grandes mudanças na degradação de conexinas não estarem associadas à seu grau de fosforilação, a cinética de degradação para algumas isoformas e para mutantes em sítios de fosforilação não são idênticas, levando à possibilidade de que o estado de fosforilação possa ter um papel no refinamento da taxa de degradação (Laird, 2005).

Além disso, o grau de fosforilação pode afetar ainda a estabilidade e regular a degradação protéica por lisossomos e proteassomas das junções internalizadas em vesículas anulares e endossomais, respectivamente. Outro aspecto importante na regulação da fosforilação de conexinas é a ativação de proteínas fosfatases, as quais defosforilam as proteínas de forma a terminar a ação das kinases. Portanto, as fosfatases podem participar da regulação dos mesmos processos que as kinases, abertura ou

fechamento, inserção ou retirada da membrana e degradação do canal (Warn-Cramer & Lau, 2004).

Além de todos os resultados sugerirem que a fosforilação direta dos canais altera sua função, é importante lembrar que estes interagem com outras proteínas adjacentes à membrana e formam aglomerados cuja interação proteína-proteína pode ser afetada por fosforilação. Desta maneira também podem sofrer mudanças na permeabilidade e atividade do canal (Moreno, 2005). Um exemplo disto é a interação com as proteínas de ancoramento, as quais conectam as conexinas a elementos do citoesqueleto, como os filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários, para formar estruturas complexas ordenadas espacialmente (Segretain & Falk, 2004).

Existe um grande aumento da eficiência na cinética da reação quando uma enzima está localizada no mesmo ambiente que seu substrato, necessitando de pouca difusão. Junções aderentes e desmossomas estão dispostas muito próximas das placas juncionais nos discos intercalares, podendo desempenhar um papel na limitação da movimentação dos canais para outras regiões da membrana. Da mesma forma, a caveolina-1, proteína estrutural presente em microdomínios ricos em colesterol e esfingolípídeos, co-localiza com a Cx43. A presença nesta região especializada poderia regular não só o trânsito, mas também a atividade das junções (Hervé *et al.*, 2004). Além disso, aparentemente, diferentes conexinas possuem suas preferências por certos ambientes lipídicos e isto poderia estar envolvido na segregação de diferentes canais (Segretain & Falk, 2004).

4.2 – Junções comunicantes no coração

No coração, as junções comunicantes são especialmente importantes, pois é através delas que ocorre a passagem de corrente entre os miócitos. Cada tipo celular

presente no coração possui um padrão de expressão de conexinas, que permite a propagação coordenada do impulso elétrico e a contração seqüencial das câmaras cardíacas. A Cx43 é a mais expressa, sendo encontrada no átrio e no ventrículo de várias espécies (Gourdie *et al.*, 1991). A conexina40 (Cx40) tem um padrão de expressão mais restrito que a Cx43 no coração de mamíferos, e está presente somente no miocárdio atrial (dependendo da espécie) e no sistema de condução atrioventricular (Hervé, 2004).

Os cardiomiócitos de trabalho do ventrículo são conectados por grupos de junções compostas por Cx43 localizadas principalmente nos discos intercalares. Já os cardiomiócitos atriais são células menores e mais alongadas, contendo discos intercalares também menores e menos elaborados compostos, principalmente, de Cx40, podendo haver co-localização com Cx43 nas mesmas placas juncionais. A Cx40 não é expressa no ventrículo, e a conexina45 (Cx45) é encontrada tanto em átrio quanto em ventrículo, sendo que, neste último, a expressão é menor (Severs *et al.*, 2004).

Os cardiomiócitos responsáveis por gerar e conduzir o impulso são morfologicamente distintos das células atriais e ventriculares. Os miócitos do nodo sinoatrial, sítio de geração do impulso, e os miócitos do nodo atrioventricular, sítio em que a velocidade do impulso é diminuída antes de ser direcionada aos ventrículos, são equipados com poucas e dispersas junções comunicantes constituídas principalmente por Cx45, uma conexina que forma canais de baixa condução *in vitro*. A propriedade de baixo acoplamento está relacionada com a diminuição da condução da área e assim permite a contração seqüencial dos átrios e dos ventrículos (Severs *et al.*, 2004).

Os cardiomiócitos do sistema de condução His-Purkinje na maioria dos mamíferos expressa além da Cx45, a Cx40, cujos canais possuem característica de alta condução. Elas formam grandes e abundantes junções comunicantes que estão associadas à propriedade de condução rápida das fibras deste sistema, o que facilita a

distribuição rápida do impulso para todas as células de trabalho do miocárdio ventricular (Severs, *et al.*, 2004).

Alterações na organização e na expressão das junções comunicantes podem desencadear mudanças na condução e na contração das células cardíacas, e, assim, estar associadas ao desenvolvimento de algumas doenças cardíacas. As células que circundam a cicatriz do infarto, em ventrículo de pacientes que sofreram isquemia, expressam Cx43 em menor quantidade e de forma anormal, aparecendo nas superfícies laterais em detrimento à disposição polar dos discos intercalares. Uma lateralização aparentemente similar é encontrada nos ventrículos direito e esquerdo hipertrofiados de ratos (Severs *et al.*, 2004). Algumas doenças, entre elas as doenças isquêmicas, podem evoluir para falência cardíaca, situação em que se observa além da diminuição da Cx43, um aumento dos transcritos de Cx40 (Dupont *et al.*, 2001b). Acredita-se que isto seria um tipo de resposta compensatória que poderia melhorar a despolarização do tecido de condução frente ao declínio da expressão de Cx43, mas também poderia levar a heterogeneidade da propagação do impulso entre regiões adjacentes do miocárdio, aumentando a susceptibilidade a arritmias. O mesmo pode ocorrer no átrio frente à expressão atípica da Cx40 (Severs *et al.*, 2004).

Novas oportunidades para a investigação do papel das conexinas cardíacas apareceram com o desenvolvimento de animais transgênicos em que a expressão de uma conexina específica foi abolida. No entanto, alguns modelos são limitados pelo fato de algumas conexinas serem essenciais durante o desenvolvimento. O primeiro modelo de camundongo *knockout* demonstrou que a ausência de Cx43 era compatível durante a vida embrionária, porém o animal morria logo após o nascimento devido à obstrução da artéria pulmonar, uma anormalidade adquirida no desenvolvimento resultante da migração incorreta de células da crista neural (Sullivan *et al.*, 1998). Outro estudo mostrou os efeitos da falta da Cx43 nos cardiomiócitos após o nascimento em animais

knockout para Cx43 somente no coração (Gustein *et al.*, 2001). Os camundongos apresentaram redução da velocidade de condução ventricular e arritmia ventricular espontânea, letal com dois meses de idade, indicando que a Cx43 seria mais essencial para a função do ventrículo maduro do que para o neonato, no qual pequenas quantidades de Cx45 ainda presentes seriam aparentemente capazes de manter a propagação do impulso (Gustein *et al.*, 2001).

O animal *knockout* para Cx45 não sobrevive após o décimo dia de vida embrionária, demonstrando que a expressão desta conexina é vital durante o desenvolvimento (Krüger *et al.*, 2000). Já o *knockout* para a Cx40 é compatível com a vida, mas apresentou diminuição da velocidade do impulso elétrico através do sistema de condução atrioventricular (Simon *et al.*, 1998; Kirchhoff *et al.*, 1998). A capacidade residual do sistema His-Purkinje de suportar a condução na ausência da Cx40 foi atribuída à presença da Cx45.

Camundongos *knockouts* heterozigotos para a expressão da Cx43 (Cx43^{+/-}) apresentam diminuição de 38% na velocidade de condução ventricular, enquanto nenhuma alteração foi observada na propagação elétrica atrial. Isto indica que a Cx43 possui um importante papel na condução intercelular de corrente nos miócitos ventriculares, e que, no átrio, a presença da Cx40 seria capaz de prevenir o desenvolvimento de um fenótipo de condução alterado, mesmo quando a expressão da Cx43 está reduzida à metade (Thomas *et al.*, 1998). Portanto, as junções formadas pela Cx40 parecem ser as principais responsáveis pela condução elétrica no átrio.

A importância da Cx40 na regulação e na coordenação da contração cardíaca foi confirmada a partir da utilização de camundongos *knockouts* em conexina40 (Cx40^{-/-}). Dois trabalhos publicados em 1998 avaliaram alguns parâmetros eletrocardiográficos desses animais (Simon *et al.*, 1998; Kirchhoff *et al.*, 1998). Em ambos os estudos, quando comparados com animais selvagens, camundongos *knockouts* para Cx40

apresentavam mudanças na velocidade de condução atrioventricular. O intervalo PR (correspondente ao tempo entre o início da despolarização atrial e início da despolarização ventricular) foi, em média, 21% mais longo nos *knockouts* que nos animais selvagens ou heterozigotos. Mais tarde, Verheule e colaboradores, em 1999, descreveram que em camundongos Cx40^{-/-} a condução do impulso elétrico se encontrava alterada não só no sistema de condução atrioventricular, mas também no átrio, mostrando uma velocidade de condução reduzida em aproximadamente 30% nos animais transgênicos quando comparados aos selvagens.

4.3 – Regulação da condutância e da expressão da Cx40 no coração

Ainda pouco se sabe sobre a regulação da Cx40 no coração, alguns poucos trabalhos descrevem, em níveis moleculares, meios de regulação da condutância do canal composto por Cx40. Um estudo, utilizando cultura de células, demonstrou aumento da condutância das junções compostas por Cx40 após fosforilação por PKA (van Rijen *et al.*, 2000). Além do sítio de fosforilação para PKA, a Cx40 também apresenta em sua estrutura, sítios de fosforilação para PKC e PKG. No entanto, a relevância deles para o controle da atividade do canal ainda é desconhecida. Além do controle por fosforilação, a defosforilação da Cx40 foi associada a condução atrial defeituosa em camundongos que superexpressam RTEF-1 (*transcription enhancer factor-1 – related factor*) no coração. Este fator, por sua vez, aumenta a expressão da proteína fosfatase 1β (PP1 β), o que resulta na defosforilação das conexinas cardíacas, diminuição da condução e arritmias (Chen *et al.*, 2004). De forma similar ao animal *knockout* para Cx40, o camundongo que superexpressa RTEF-1 apresenta prolongamento do intervalo PR e arritmias atriais.

Outros estudos, em sua maioria realizados com células isoladas de ventrículo de rato, demonstram a atuação, ou a aparente não participação, de alguns fatores na regulação da expressão da Cx40. A estimulação das células com diferentes concentrações de agonistas α - e β -adrenérgicos não foi capaz de alterar a expressão da Cx40 (Salameh *et al.*, 2006), e da mesma forma, concentrações variadas de Endotelina-1 (ET-1) e Angiotensina II (ANGII) não alteram a expressão de Cx40 (Polontchouk *et al.*, 2002). No entanto, a participação de outros fatores do sistema renina-angiotensina (RAS) não pode ser excluída. Animais que superexpressam no coração a enzima conversora de angiotensina do tipo 2 (ECA2), enzima conversora de angiotensina I (ANGI) em angiotensina 1-7, apresentaram problemas de condução, distúrbios de ritmo, taquicardia ventricular sustentada e alta incidência de morte súbita, provocados, pelo menos em parte, pela diminuição da expressão das proteínas juncionais Cx40 e Cx43 (Donoghue *et al.*, 2003). No entanto, não se sabe se esse fenótipo é devido ao aumento dos níveis de angiotensina 1-7 ou pela diminuição dos níveis de ANGI, já que haveria menos ANGI disponível para a conversão em ANGI.

Uma condição em que se observa aumento da expressão da Cx40 é a fibrilação atrial, em pacientes e em modelo de rato induzido a ritmo cardíaco não sinusal (Polontchouk *et al.*, 2001). Alguns tipos de fibrilação atrial estão associados a um quadro inflamatório, na presença de citocinas inflamatórias, entre eles o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Um estudo demonstrou a importância deste fator na regulação da Cx40, ao utilizar um modelo transgênico que superexpressa TNF- α somente no coração. Os animais apresentaram diminuição da expressão da Cx40, fato que explica, pelo menos em parte, as anormalidades nas conduções atrial e ventricular e arritmias atriais (Sawaya *et al.*, 2007).

Além disso, sabe-se que a expressão da Cx40 pode ser temporal e espacialmente regulada através da interação de fatores transcricionais com seqüências específicas de

DNA presentes na região regulatória dos genes. A comparação dos genomas de humano e camundongo pré-processados permitiu a identificação de seqüências conservadas entre as espécies, entre elas, as regiões responsáveis por direcionar a atividade promotora da Cx40 (Teunissen & Bierhuizen, 2004).

Linhagens celulares de cardiomiócitos e músculo liso têm sido usadas no estudo da região promotora da Cx40, com o objetivo de identificar quais fatores são capazes de modular a expressão gênica. Foi identificada uma seqüência que pode corresponder a um elemento negativo, cuja função é reprimir fortemente a atividade promotora, no entanto, os fatores transcricionais que com ele interagem são desconhecidos (Seul *et al.*, 1997). Também foi verificada a existência de cinco sítios Sp1/Sp3 na região promotora da Cx40, que permitem igual interação dos fatores Sp1 e Sp3 a fim de ativar a região promotora da Cx40 (Teunissen *et al.*, 2002).

Trabalhos utilizando animais transgênicos identificaram outros fatores estimuladores. Entre eles, o Hf-1b também chamado Sp4, demonstrado pela diminuição da expressão de Cx40 e localização incorreta dos canais por ela formados no modelo animal deficiente na expressão do fator Sp4 (Nguyễn-Trân *et al.*, 2000). E ainda, animais que apresentam a superexpressão de um mutante de Nkx2.5 ou a expressão em heterozigose de Tbx5 possuem redução dos níveis de RNAm e proteína de Cx40 (Kasahara *et al.*, 2001; Bruneau *et al.*, 2001). Estes fatores transcricionais podem atuar sozinhos ou sinergicamente de modo a ativar o promotor da Cx40 (Bruneau *et al.*, 2001). Além disso, o sítio no DNA para interação do fator ativador Tbx5 também permite a interação de outros fatores ativadores e inibidores da mesma família, como o fator transcricional inibidor Tbx2 expresso no coração (Teunissen & Bierhuizen, 2004).

Os fatores transcricionais Sp1 e Sp3 são ubiquamente expressos em diversos tipos celulares de mamíferos, e assim, juntamente ao complexo RNA polimerase, devem prover a expressão basal da Cx40 nesses tipos celulares (Bierhuizen *et al.*, 2000). Já

Nkx2.5 e Tbx5 devem servir como ativadores da expressão da Cx40 no coração, já que interferência na expressão desses fatores diminui os níveis da proteína Cx40 cardíaca (Teunissen & Bierhuizen, 2004).

Em 2004, Linhares e colaboradores demonstraram que além de Nkx2.5 e Tbx5, GATA4, um outro fator específico de células musculares, se faz importante na regulação da Cx40. A deleção de porções da seqüência correspondente a região promotora do gene da Cx40, permitiu a identificação dos elementos mínimos para atividade transcricional. Ensaio de co-transfecção demonstraram que, associados a esses elementos mínimos, os fatores NKx2.5 e GATA4 foram capazes ativar a transcrição, ao passo que Tbx5 reprimiu.

As evidências existentes sugerem que a regulação da Cx40 é um processo complexo e preciso, dependente de diversos fatores, cuja caracterização ainda demanda muitos estudos.

5 – JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Sabe-se que a propagação do impulso elétrico entre as células miocárdicas atriais é dependente da expressão e funcionamento corretos da proteína Cx40. É também bem definida a influência do HT em controlar a velocidade de condução do impulso elétrico. Almeida e colaboradores (2009) demonstraram, pela primeira vez, a associação entre estes dois fenômenos. A diminuição da velocidade de condução atrial (prolongamento da onda P) observada nos animais KS (figura 11), modelo de hipotireoidismo cardíaco seletivo, se mostrou associada à diminuição da expressão do RNA mensageiro (RNAm) da Cx40 no átrio (figura 12), enquanto que a expressão do RNAm da Cx43 estava inalterada. O fato dos animais KS, que apresentam uma superexpressão da isoforma do TR β mutado, possuem esta etapa transcricional suprimida, nos permite concluir que o

HT, atuando pelos TRs, está envolvido na regulação do gene da Cx40 no átrio. Assim, é necessário estudar melhor, primeiramente, a regulação da expressão da Cx40 atrial pelo HT, assim como, mais especificamente, a participação das isoformas de TR nesta regulação.

Primeiramente, devemos observar se o padrão de expressão do RNAm das conexinas atriais é refletido na produção da proteína Cx40 nos animais que expressam a mutação TR β KS Δ 337T. E, assim, saber se, através da ação direta dos receptores nucleares, o HT regula a expressão protéica da Cx40 diretamente no tecido atrial.

Além disso, não podemos deixar de comparar este animal transgênico, um modelo característico de hipotireoidismo cardíaco seletivo, a um animal induzido a condições de hipotireoidismo e hipetireoidismo sistêmico. Desta forma, saberemos se os efeitos do HT em outros alvos além do coração, no sistema vascular, por exemplo, poderiam também participar da regulação da expressão destas proteínas.

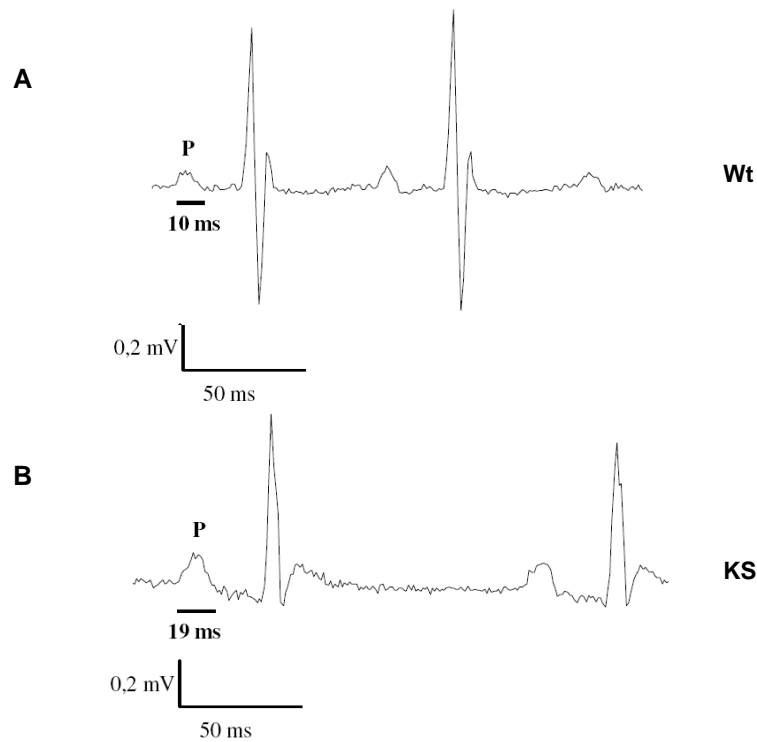


Figura 11. Registro eletrocardiográfico de animais não anestesiados. (A) Animais selvagens (Wt) e **(B)** KS. Os intervalos do ECG, com exceção do complexo QRS, se encontram prolongados no animal KS. Notar variação da onda P. Wt $10\text{ms} \pm 0,6$ (n=7); KS $19\text{ms} \pm 0,8$ (n=8), $p < 0,05$ (Almeida *et al.*, 2009).

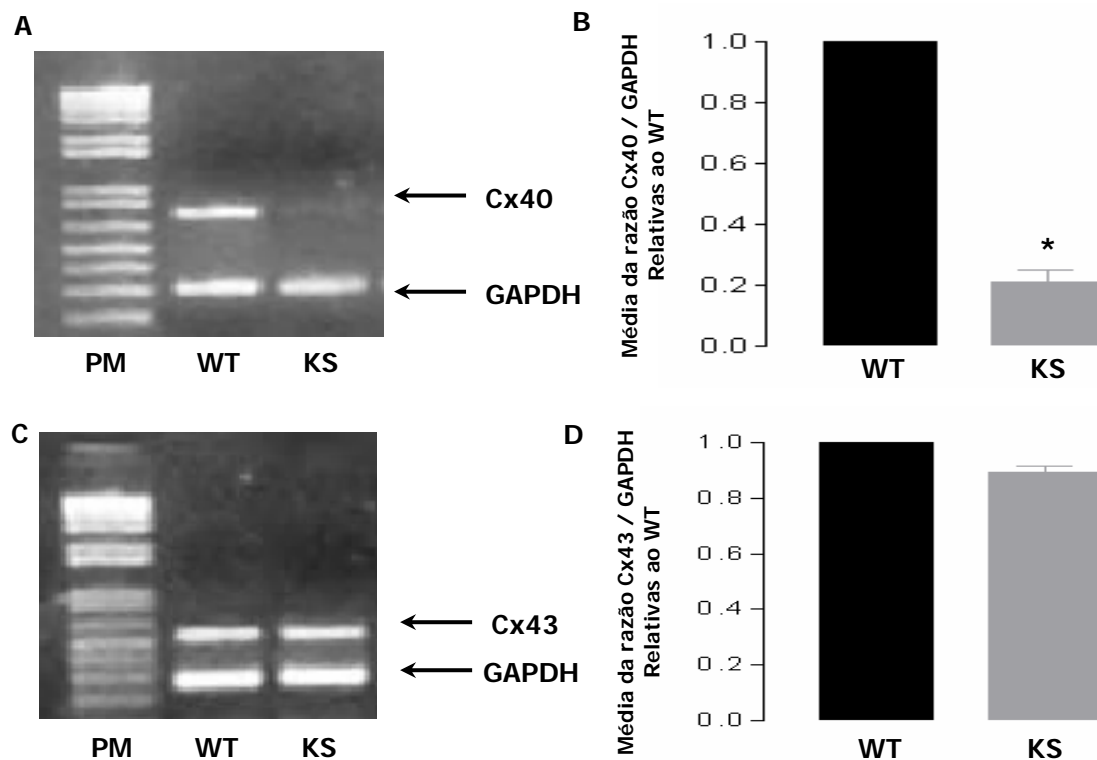


Figura 12. Expressão do RNAm das conexasinas 40 e 43 no átrio e da conexina 43 no ventrículo de camundongos selvagens e transgênicos eutireoideos. (A) Gel de agarose 1,5% representativo do PCR utilizando iniciadores para Cx40 e GAPDH no átrio. **(B)** Gráfico da média da razão dos valores densitométricos Cx40/GAPDH relativo ao WT no átrio. **(C)** Gel de agarose 1,5% representativo do PCR utilizando iniciadores para Cx43 e GAPDH no átrio. **(D)** Gráfico da média da razão dos valores densitométricos Cx43/GAPDH relativo ao WT no átrio. WT n=7; KS n=6. Os valores representam a média \pm erro-padrão, * $p < 0,05$ (Adaptado de Almeida *et al.*, 2009).

Outra estratégia interessante é a observação da expressão da Cx40 em outro modelo disponível no nosso laboratório, o camundongo que expressa a mutação TR β Δ 337T introduzida na linhagem germinativa por recombinação homóloga, o que faz a isoforma mutada ser expressa em substituição à normal. A isoforma TR β é considerada a principal responsável pelo controle do *feedback* hormonal na hipófise e no hipotálamo (Weiss *et al.*, 1997; Abel *et al.*, 2001). Por isso, nos animais TR β KI Δ 337T, a inibição da secreção de TSH e TRH pelo HT está prejudicada, de forma que animais heterozigotos e homozigotos para esta mutação apresentam aumento, em graus distintos, de TSH, T₄ e T₃ livres e totais séricos, caracterizando um modelo de Síndrome de Resistência a Hormônio Tireoideano. Os animais heterozigotos apresentam TSH sérico levemente aumentado apesar dos níveis elevados de T₃ e T₄ livres, enquanto que os homozigotos apresentam concentrações extremamente elevadas de TSH sérico, T₄ e T₃ livres e totais, indicando regulação anormal do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (Hashimoto *et al.*, 2001).

Pelo fato da mutação ser seletiva aos cardiomiócitos, o modelo TR β KS Δ 337T não apresenta alterações no *feedback* hormonal do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide e, portanto, possuem concentração sérica de HT normal.

Portanto, enquanto o modelo KS apresenta hiperexpressão do mutante de TR β em todos os cardiomiócitos (afetando a sinalização do TR β e do TR α) e concentração dos hormônios tireoideanos normais; o modelo KI tem expressão do mutante em todas as suas células e de forma semelhante ao TR β endógeno, que é baixa e restrita no coração, no entanto apresenta altas concentrações de hormônio tireoideano na circulação. Portanto, comparando os dois modelos, poderemos ter indicações da importância relativa das duas isoformas de TR presentes no coração na mediação dos efeitos dos HTs sobre a regulação da conexina40. Se o fenótipo dos dois modelos for semelhante, teremos uma indicação da importância da isoforma TR β na regulação.

Além da análise no estado basal, em que existe uma enorme diferença das concentrações hormonais séricas entre os genótipos, a expressão protéica da Cx40 nos animais KI também será avaliada após indução de hipotireoidismo e hipotireoidismo acrescido de doses de T₃. Estas últimas condições visam igualar a concentração sérica de HT entre os genótipos e, desta forma, permitem a comparação entre eles, ressaltando a importância do mutante.

OBJETIVO

⇒ Estudar o papel dos hormônios tireoideanos na regulação da expressão protéica da conexina40, e melhor entender a influência das isoformas α e β de receptores para hormônio tireoideano nesta regulação.

- Avaliar a expressão da conexina40 no átrio dos seguintes modelos animais:
 - Hipotireoideo cardíaco seletivo, transgênicos TR β KS Δ 337T, animais que superexpressam a isoforma TR β mutada exclusivamente no coração;
 - Hipotireoideo sistêmico, modelo de indução farmacológica de hipotireoidismo em animais selvagens por adição da droga propiltiouracil (PTU) na ração;
 - Hipertireoideo sistêmico, animais selvagens submetidos a injeções subcutâneas diárias de T₃;
 - Transgênicos TR β KI Δ 337T, animais que expressam isoforma TR β mutada em todos os tecidos do organismo, por recombinação homóloga;
 - Animais TR β KI Δ 337T submetidos ao hipotireoidismo e ao hipotireoidismo associado a injeções diárias de T₃, condições que visam igualar a concentração sérica de HT entre os genótipos.

MATERIAIS E MÉTODOS

1- ANIMAIS

Todos os camundongos utilizados neste trabalho foram acondicionados em ambiente com temperatura constante de 24°C, com dieta e água *ad libitum*, e expostos a um ciclo temporal regulado (dia e noite de 12 horas cada um, com luzes acesas a partir das 7 horas da manhã). A manutenção dos animais em biotério, bem como os procedimentos realizados com os mesmos, foram aprovados pela Comissão de Avaliação da Utilização de Animais em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ (CAUAP/UFRJ) pelo Comitê de Biosegurança do IBCCF.

Foram utilizados camundongos machos selvagens (Wt) e transgênicos (KS) para a mutação TR β KS Δ 337T, machos selvagens submetidos ao hipo- e hipertireoidismo, e camundongos machos e fêmeas selvagens (Wt), heterozigotos (Het) e homozigotos (Homo) para a mutação TR β KI Δ 337T. Todos os animais tinham entre 2 e 3 meses de idade no início do tratamento.

1.1- Linhagens de animais TR β KS Δ 337T e animais TR β KI Δ 337T

Esses animais foram gerados no Laboratório do Dr. Wondisford, no Departamento de Endocrinologia, do *Beth Israel Medical Deaconess – Harvard Medical School*, com a participação do nosso grupo (Pazos-Moura *et al.*, 2000; Hashimoto *et al.*, 2001). A mutação Δ 337T no TR β , encontrada em pacientes com Síndrome de Resistência a Hormônios Tiroideanos, da família Kindred S, foi utilizada na construção dos animais transgênicos. Nessa mutação ocorre a deleção dos nucleotídeos CAC na posição 1295-1297, resultando na perda do aminoácido treonina

na posição 337 na região do gene que codifica a área de ligação do hormônio tireoideano no receptor (Pazos-Moura *et al.*, 2000). Então, este receptor mutado é incapaz de se ligar aos hormônios tireoideanos, mas consegue interagir com os elementos responsivos a hormônio tireoideano encontrados na região promotora de genes alvo (Hashimoto *et al.*, 2001), exercendo efeito dominante negativo sobre as isoformas de TR normais.

O promotor murino da cadeia pesada da miosina tipo α (α -MHC) foi usado para direcionar a expressão seletiva do transgene TR β KS Δ 337T aos cardiomiócitos. Assim, essa linhagem de animais superexpressa o receptor para hormônio tireoideano (TR β) mutado exclusivamente no coração, apresentando um fenótipo hipotireoideo cardíaco seletivo independente das concentrações séricas de hormônio tireoideano (Pazos-Moura *et al.*, 2000).

Na linhagem TR β KI Δ 337T, o transgene foi introduzido no locus do gene TR β utilizando recombinação homóloga. Portanto, os animais homozigotos expressam somente a isoforma mutada em substituição à normal. Além disso, os animais apresentam concentração sérica elevada dos hormônios T₃, T₄ e TSH, devido à deficiência no *feedback* negativo na hipófise e no hipotálamo, dependente de TR β .

As linhagens foram mantidas em heterozigose, sendo os animais TR β KS Δ 337T genotipados por *Southern blot* e os TR β KI Δ 337T, por reação em cadeia da polimerase (PCR).

1.2- Genotipagem dos animais TR β KS Δ 337T

Os animais da linhagem TR β KS Δ 337T são genotipados utilizando a técnica *Southern blot*, em que aproximadamente 1cm da cauda de cada animal serve como fonte para isolamento de DNA. Este material é incubado em uma solução contendo 200 μ g/mL de proteinase K (PROMEGA), SDS 10%, NaCl 150mM, citrato de sódio 15mM, Tris-HCl 500mM EDTA 1mM, pH 7,5, durante um período de 18 horas à 37°C. Após a digestão, o material é centrifugado a 16.110xg durante 15 minutos, ao sobrenadante é adicionado um volume igual de fenol:clorofórmio:isoamil (25:24:1), e este foi centrifugado por mais 10 minutos. A fase aquosa é coletada e acrescida de 450 μ L de isopropanol. Após nova centrifugação de 15 minutos, o sobrenadante é descartado e o DNA solubilizado em água destilada autoclavada.

As amostras são quantificadas por espectrofotometria a 260nm (Sambrook *et al.*, 1989). Em seguida, aproximadamente 10 μ g de DNA genômico de cada amostra são utilizados para reação com a enzima de restrição *Bgl II* (GIBCO), a 37°C, por 18 horas, para a liberação do fragmento de interesse, o qual está presente somente no animal mutante e corresponde à parte da construção do TR β mutado acoplada à região promotora do α -MHC. Tal fragmento possui aproximadamente 2.4Kb e se encontra flanqueado por dois sítios de corte da enzima *Bgl II*. Assim, após esta reação, somente na amostra do animal TR β KS Δ 337T, o fragmento é liberado.

Após fracionamento do material oriundo da reação com enzima de restrição em eletroforese em gel de agarose 1%, o material do gel é transferido, por capilaridade, para uma membrana de nylon (Amersham) durante 24 horas em uma solução contendo NaCl 0,4M e NaOH 0,6M. Após a transferência, a membrana é embebida por 20

minutos em uma solução de neutralização, e pré-hibridizada por 4 horas em tampão de hibridização *Rapid Hyb Buffer* (Amersham).

O fragmento de interesse é reconhecido por uma sonda marcada com CTP-P³², utilizando *Random Primers DNA Labeling System* (Invitrogen), de acordo com instruções do fabricante. A sonda é desnaturada por aquecimento a 95°C, durante 3 minutos, e adicionada ao tampão de hibridização juntamente com a membrana. A hibridização é realizada por 18 horas a 65°C. Em seguida, a membrana é submetida a duas lavagens na solução de lavagem SSC 2X (NaCl 0,3M, citrato de sódio 0,03M, pH 7,0), por 15 minutos cada lavagem, à temperatura ambiente. Outras duas lavagens são realizadas em SSC 0,1X (NaCl 15mM, citrato de sódio 1,5mM, pH 7,0), mais SDS 1%, por 20 minutos, a 65°C (Pazos-Moura *et al.*, 2000).

Finalmente, os híbridos são visualizados através de autoradiografia. São visualizadas bandas somente nos *slots* correspondentes aos animais transgênicos, pois somente eles possuem o fragmento de 2.4Kb (figura 13).

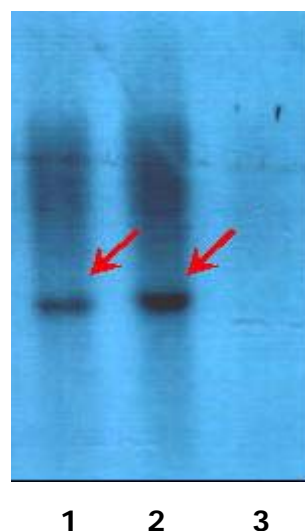


Figura 13. Autoradiografia da membrana hibridizada com sonda radioativa. 1- Animal transgênico KS; 2- Controle positivo; 3- Controle negativo (animal Wt). As setas vermelhas indicam bandas correspondentes ao fragmento de 2.4Kb presente somente nos animais KS.

1.3- Genotipagem dos animais TR β KI Δ 337T

Os animais da linhagem TR β KI Δ 337T são genotipados utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), em que aproximadamente 0,5cm da cauda de cada animal serve como fonte de DNA. O segmento da cauda, após adição de 200 μ L NaOH 0,2N, é incubado à 75°C por 25 minutos, e depois é agitado com uso de vórtex durante 15 segundos para destruir completamente os restos teciduais. Adiciona-se 800 μ L de Tris-HCl 0,2N e as amostras são centrifugadas a 500xg por 1 minuto. Ao final deste procedimento o DNA do animal se encontra disperso no sobrenadante e o precipitado é descartado.

A genotipagem é realizada utilizando a técnica PCR, usando 100nM de iniciadores específicos (tabela 1), 2mM de dATP, dCTP, dTTP, dGTP (Promega, EUA), 1U da enzima Taq polimerase (Biotools, Espanha) e um tampão contendo Tris HCl 75mM (pH=9,0), MgCl₂ 2mM, KCl 50mM, (NH₄)₂SO₄ 20mM (Biotools, Espanha).

Tabela 1. Sequência de iniciadores específicos utilizados para a amplificação do gene do TR β no PCR de genotipagem dos animais TR β KI Δ 337T.

Iniciador	Seqüência
5' Normal	ATGGGGAAATGGCAGTGCAC
5' Mutante	ATGGGGAAATGGCAGTGGAC
3' Comum	AGCACACTCACCTGAAGACAT

O produto da amplificação de ambos os iniciadores é uma banda de 180pb, sendo necessário proceder a amplificação em duas reações, diferindo apenas no acréscimo do iniciador normal em uma e do iniciador mutante na outra. Os parâmetros de ciclagem foram os seguintes: após desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos seguiram-se 30 ciclos de 95°C por 45 segundos, 62°C por 45 segundos e 72°C por 1

minuto, ao final a reação foi mantida a 72°C por 7 minutos e resfriada em seguida a 8°C. Após a amplificação das seqüências do gene, as amostras são submetidas à eletroforese em gel de agarose 2% diluído em TAE 1X (Tris acetato 0,04M e EDTA 1mM) com brometo de etídeo 0,8%, a 100V. As bandas são visualizadas em transiluminador ultravioleta (figura 14).

As linhas 2, 3, 5, 6 e 7 só apresentaram amplificação na reação que continha iniciador WT sendo assim os animais são selvagens, na linha 1 só observou-se amplificação utilizando-se o iniciador mutante, portanto o animal é homozigoto para a mutação, e por fim, quando existe amplificação em ambas as reações como ilustram as linhas 4, 8, 9 e 10, os animais são heterozigotos (figura 14).

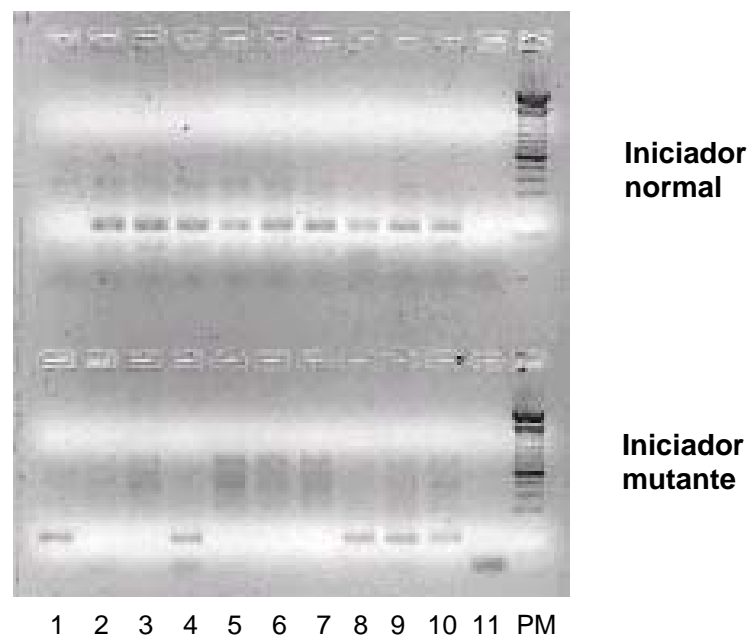


Figura 14. Foto representativa de um gel de agarose 2% após eletroforese de amostras de DNA submetidas PCR para genotipagem de animais da linhagem TR β KI Δ 337T. 1- Animal homozigoto; 2, 3, 5, 6, 7- Animais selvagens; 4, 8, 9- Animais heterozigotos; 10- Controle positivo; 11- Controle negativo; 12- Padrão de Peso Molecular Hi-Lo DNA Marker (Minnesota Molecular, EUA).

1.4- Indução ao hipotireoidismo, hipertireoidismo e hipotireoidismo acrescido de tratamento com T₃

Camundongos machos selvagens com aproximadamente 3 meses de idade foram submetidos a um quadro de hipotireoidismo sistêmico, através da ingestão de ração contendo propil-tiouracil (PTU - Sigma) 0,15% durante 4 semanas (figura 15). Esta droga inibe a síntese de hormônios tireoideanos, já que bloqueia a atividade da enzima tireoperoxidase, responsável pela organificação do iodo, além de inibir a conversão de T₄ a T₃ pela desidase tipo 1.

Outro grupo de animais com a mesma idade recebeu injeções subcutâneas diárias de T₃ (50µg para 100g de peso corporal – Sigma-Aldrich, EUA) durante 2 semanas a fim de induzir uma situação de hipertireoidismo (figura 15).

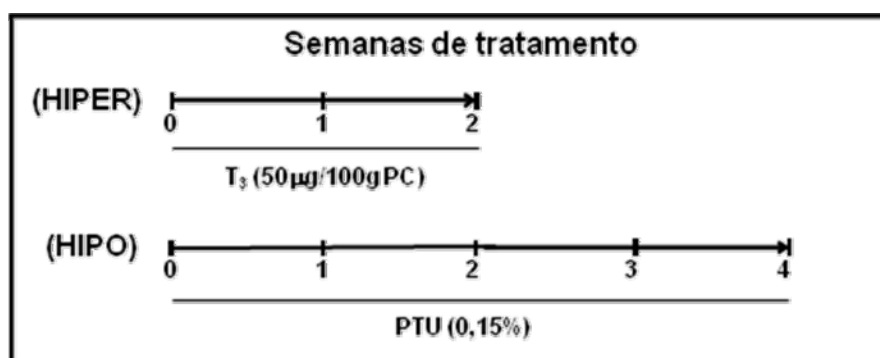


Figura 15. Esquema ilustrativo do tratamento de indução ao hipertireoidismo e hipotireoidismo. Descrição no texto. (HIPER) Grupo hipertireoideo; (HIPO) Grupo hipotireoideo; (PTU) propil-tiouracil; (T₃) triiodotironina (PC) Peso corporal.

Além disso, outro tipo de tratamento foi efetuado com doses mais baixas de T₃ (0,2µg, 0,5µg e 1,0µg corrigidas por 100g de peso corporal) para observar a resposta dos animais homozigotos para a mutação TRβ KI Δ337T à normalização da concentração sérica de T₃ aos níveis de um animal eutireoideo. Animais selvagens, heterozigotos e homozigotos para a mutação KI foram submetidos a um quadro de hipotireoidismo sistêmico através do consumo de ração contendo 0,15% de PTU

(Sigma-Aldrich, EUA) e 0,05% de metimazol (MMI - Sigma-Aldrich, EUA) na água de beber durante cinco semanas (figura 16).

Após as cinco semanas de tratamento com PTU e MMI, um grupo de animais passou a receber, além deste tratamento, injeção subcutânea diária de T_3 na dose de $0,2\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso corporal durante uma semana (grupo chamado de 1D). Da mesma forma, outro grupo passou a receber injeções diárias subcutâneas de T_3 em doses crescentes de $0,2\mu\text{g}$, $0,5\mu\text{g}$ e $1,0\mu\text{g}$ corrigidas por 100g de peso corporal durante três semanas consecutivas, sendo cada dose administrada durante uma semana (grupo chamado de 3D) (figura 16).

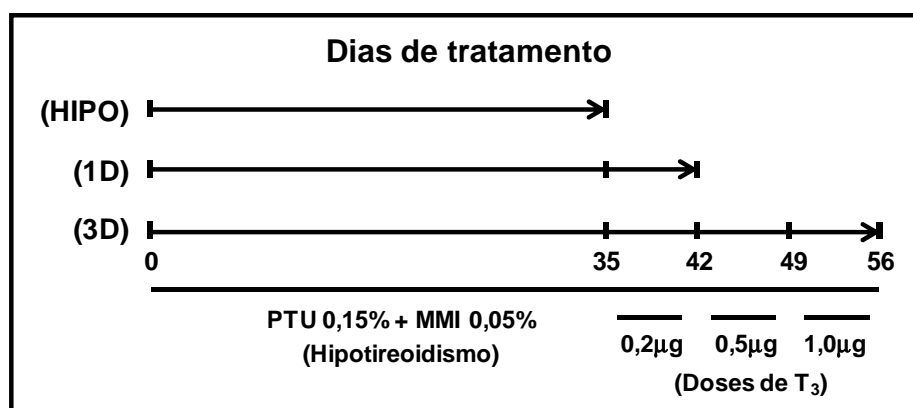


Figura 16. Esquema ilustrativo do tratamento de indução ao hipotireoidismo e hipotireoidismo seguido de administração de T_3 . Descrição no texto. (HIPO) Grupo hipotireoideo; (1D) Grupo hipotireoideo + 1 dose de T_3 [$0,2\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso corporal durante uma semana]; (3D) Grupo hipotireoideo + 3 doses de T_3 [$0,2\mu\text{g}$, $0,5\mu\text{g}$ e $1,0\mu\text{g}$ corrigidas por 100g de peso corporal durante três semanas consecutivas, uma em cada semana]; (PTU) propil-tiouracil; (MMI) metimazol; (T_3) triiodotironina.

1.5- Procedimentos Gerais

Os animais foram sacrificados em atmosfera de dióxido de carbono e, em seguida decapitados. O sangue do tronco foi recolhido e submetido à centrifugação de $800\times g$ durante 15 minutos, sendo o soro armazenado para dosagem de T_3 e TSH. A partir dos corações excisados, os átrios e ventrículos são separados, pesados e armazenados a -70°C . Neste trabalho, somente a expressão atrial foi analisada.

2- DOSAGEM HORMONAL PELO MÉTODO DE RADIOIMUNOENSAIO

As concentrações séricas de T₃ total e TSH são avaliadas por radioimunoensaio. A técnica consiste em um ensaio de competição pela ligação ao anticorpo entre a amostra (fria) e a molécula marcada radioativamente (traçador), seguido de precipitação do complexo ligado (somente para o TSH) e posterior contagem da radioatividade em contador gama.

Para a dosagem de T₃ foi utilizado o método de fase sólida, através de kit comercial (MP Biomedicals™ – Califórnia, Estados Unidos).

A dosagem de TSH foi feita pelo método de duplo anticorpo, sendo o ensaio baseado em um protocolo padronizado em nosso laboratório (Oliveira *et al.*, 2006). São utilizados reagentes fornecidos pelo *National Hormone Pituitary Program* (NHPP - Bethesda, Estados Unidos): TSH de camundongo purificado para a curva padrão e anticorpo produzido em cobaia contra TSH de camundongo (primeiro anticorpo). O segundo anticorpo, específico para imunoglobulina de cobaia foi obtido comercialmente (Antibodies Incorporated, Estados Unidos).

A marcação do TSH com ¹²⁵I é feita pela técnica de cloramina T (Sigma – Missouri, Estados Unidos) (Chard, 1987). A purificação do TSH marcado é feita em cromatografia de gel de poliacrilamida (Biogel - P60 fino da Bio Rad – Califórnia, Estados Unidos), ressuspensão em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,5.

O ensaio foi realizado em 100µL de tampão PBS - fosfato de sódio 10 mM e cloreto de sódio 140 mM, pH 7,0, contendo albumina 1,0%, EDTA 125 mM e soro normal de cobaia 0,25%. Após 2 horas de incubação de 100µL da amostra ou padrão com o primeiro anticorpo (na diluição final de 1:300.000) foi adicionado o TSH marcado radioativamente. Após 21 horas de incubação à temperatura ambiente,

adicionou-se o segundo anticorpo (na diluição final de 1:80) juntamente com polietilenoglicol 5%. Três horas após esta incubação à temperatura ambiente os tubos foram centrifugados a 1700xg por 30 minutos a 4° C. O sobrenadante foi desprezado e a radioatividade do precipitado medida em um cintilador de fase sólida.

Os valores hormonais de T₃ e TSH estão expressos como média ± erro padrão da média em ng/dL e ng/mL, respectivamente (em anexo - na página 93). O coeficiente de variação intra-ensaio foi menor do que 7,2% em todos os ensaios e todas as amostras comparadas foram avaliadas em um mesmo ensaio.

3- ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTÉICA DA CONEXINA40 UTILIZANDO A TÉCNICA *WESTERN BLOTTING*

Para analisar a expressão protéica é utilizado um protocolo adaptado do descrito por Tolmachov e colaboradores, em 2006. Os átrios são submetidos a um processamento para extração de proteína total, no qual os tecidos são homogeneizados em 100µl de tampão de lise pH 6,4 (Hepes 50mM, MgCl₂ 1mM, EDTA 10nM, Triton X 1%), contendo coquetel de inibidores de proteases *Complete* (Roche Applied Science – Mannheim, Alemanha). A concentração protéica de cada amostra é dosada pelo método de Bradford (1976). São utilizados 30µg do extrato total de átrio e 40µg do extrato de ventrículo para fracionamento em gel de poliacrilamida 12%. Após a eletroforese, as amostras são transferidas para uma membrana PVDF (*Polyvinylidene Difluoride*) (Bio Rad – Califórnia, Estados Unidos), em sistema úmido (Bio Rad), durante 2 horas.

A membrana é primeiramente incubada com solução Tris-salina pH 7,6 contendo Tween 0,05% (TBS-T) e leite desnatado (Molico[®] Nestlé – São Paulo, Brasil) a 5%, durante 1 hora, à temperatura ambiente, para que ocorra o bloqueio dos sítios inespecíficos da membrana. Em seguida, permanece incubando *overnight* na presença

dos anticorpos policlonais para conexina40 (Zymed[®] Laboratories – California, Estados Unidos), diluído a 1:125, e ciclofilina (Affinity Bioreagents[™] – Colorado, Estados Unidos), diluído a 1:1500, na solução Tris-salina pH 7,6 (TBS), contendo leite desnatado (Molico) a 2%. Após lavagens com TBS-T, a membrana é novamente incubada, durante 3 horas, na presença do anticorpo secundário contra IgG de coelho conjugado a peroxidase (ECL Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Antibody – GE Healthcare UK Limited Amersham Place – Buckinghamshire, Inglaterra) diluído 10.000 vezes em TBS, contendo leite desnatado (Molico) a 1%.

Para revelação, utiliza-se o kit *Lumigen[™] PS-3 detection reagent* (GE Healthcare UK Limited Amersham Place), segundo protocolo do fabricante. Os híbridos são visualizados através de auto-radiografia e a análise densitométrica realizada utilizando o software Kodak 1D v3.5.4.

Após a revelação, a membrana é corada com a solução vermelho de Ponceau, a fim de utilizar o carregamento de proteína como outro controle interno.

4- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os testes estatísticos são realizados utilizando o programa GraphPad 3.02 (Prism Software). Os resultados são expressos em média \pm erro padrão. Para comparação de dois grupos experimentais usamos o teste T (não pareado), com exceção da análise do TSH em que foi usado o teste T não paramétrico de Mann-Whitney. Quando comparados três grupos experimentais usamos o teste One-way ANOVA (Student-Newman Keuls) e para comparar a variável do genótipo nas diferentes fases do tratamento, foi utilizado o teste Two-way ANOVA. Descarta-se a hipótese nula quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

1- ANIMAIS TR β KS Δ 337T (MODELO QUE SUPEREXPRESSA ISOFORMA TR β MUTADA EXCLUSIVAMENTE NO CORAÇÃO)

Foi verificado aumento significativo de 56% no peso do átrio corrigido pelo peso corporal dos camundongos machos TR β KS Δ 337T em relação aos selvagens (Wt) ($p < 0,0001$) (figura 17).

A razão da expressão protéica da Cx40 pela expressão da ciclofilina nos animais machos TR β KS Δ 337T mostrou-se significativamente diminuída, em aproximadamente 47%, quando comparada a dos selvagens (Wt) ($p < 0,0001$) (figura 18).

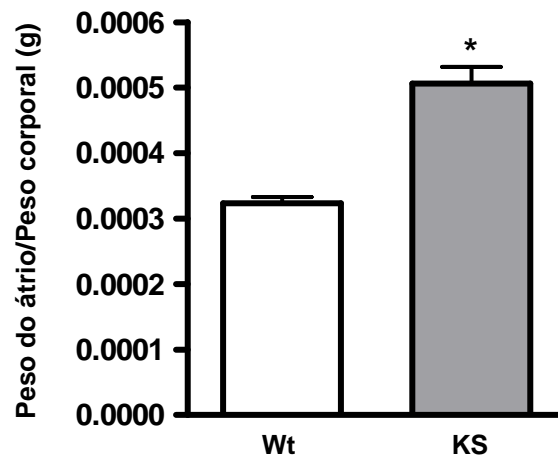


Figura 17. Peso do átrio corrigido pelo peso corporal de camundongos machos selvagens (Wt) e transgênicos TR β KS Δ 337T (que superexpressa TR β mutado exclusivamente no coração) eutireoideos. Os valores representam a média \pm erro-padrão. Wt n=14, KS n=7. *p<0,0001.

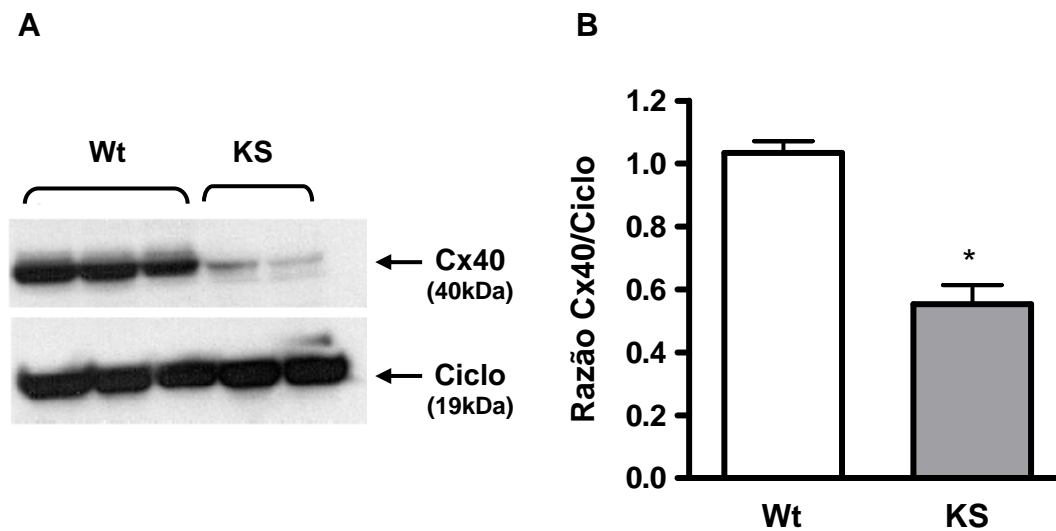


Figura 18. Expressão da proteína conexina40 (Cx40) no átrio de camundongos machos selvagens (Wt) e transgênicos TR β KS Δ 337T (que superexpressa TR β mutado exclusivamente no coração) eutireoideos. (A) Radiografia representativa do *Western blotting* utilizando anticorpos para Cx40 e ciclofilina (ciclo) no átrio. (B) Gráfico da razão dos valores densitométricos Cx40/ciclofilina. Os valores representam a média \pm erro-padrão, sendo os valores normalizados pela média do grupo Wt. Wt n=8; KS n=6; * p<0,0001.

2- ANIMAIS SELVAGENS HIPO- E HIPERTIREOIDEOS

A eficácia da indução ao hipotireoidismo, pela adição de PTU na ração, foi comprovada através da dosagem da concentração sérica de TSH. Os animais apresentaram um aumento superior a 9 vezes da concentração de TSH sérico quando submetidos ao tratamento com PTU em comparação aos animais controle eutireoideos ($p < 0,01$) (figura 19A) (valores do TSH em anexo – página 93).

Já a indução do hipertireoidismo, por injeções diárias de T_3 na dose de $50\mu\text{g}$ corrigida por 100g de peso corporal, foi confirmado pela dosagem da concentração sérica de T_3 . Verificou-se aumento significativo de 2,7 vezes da concentração sérica de T_3 nos animais que receberam injeções diárias de T_3 comparados aos animais controle eutireoideos ($p < 0,05$) (figura 19B) (valores do T_3 em anexo – página 93).

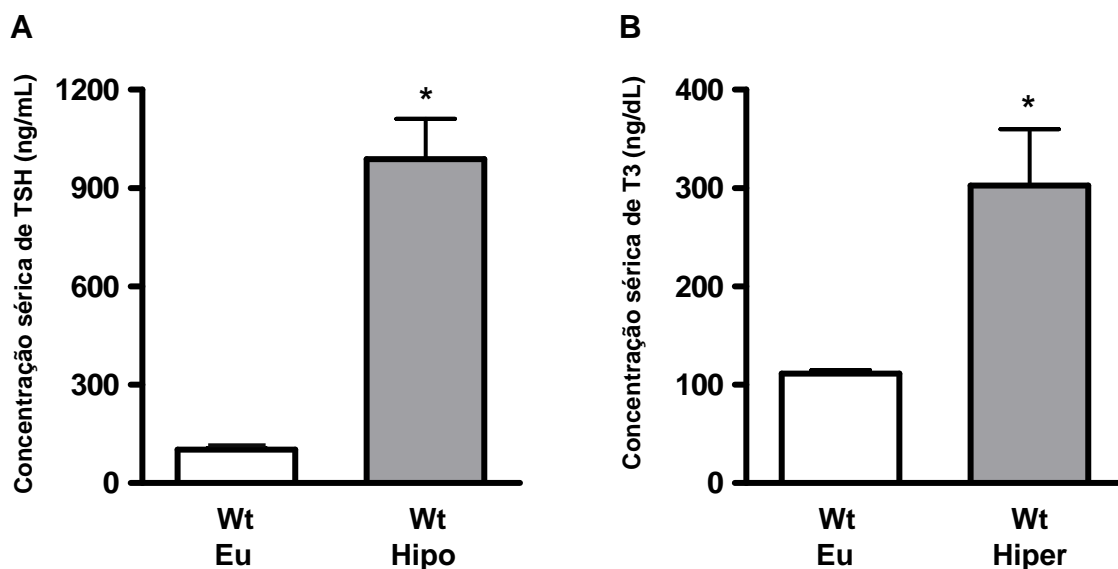


Figura 19. Dosagem hormonal de camundongos machos selvagens (Wt) submetidos aos tratamentos de hipotireoidismo (Hipo) e hipertireoidismo (Hiper) comparados aos seus respectivos controles eutireoideos (Eu). (A) Concentração sérica de TSH, expressa em ng/mL, em animais hipotireoideos (n=8) comparados ao grupo controle (n=6) (* $p < 0,01$). (B) Concentração sérica de T_3 , expressa em ng/dL, em animais hipertireoideos (n=12) comparados ao grupo controle (n=11) (* $p < 0,05$). Os valores representam a média \pm erro-padrão.

As médias do peso do átrio corrigido pelo peso corporal dos grupos Wt hipotireoideo e Wt hipertireoideo apresentaram em média 16% de diminuição e 23% de aumento, respectivamente, em relação aos Wt eutireoideos (figura 20). No entanto, essa variação não foi estatisticamente significativa.

Pela análise da razão da expressão protéica da Cx40 pela expressão da ciclofilina não foi detectada alteração significativa entre os camundongos machos Wt induzidos ao hipo- e hipertireoidismo comparados aos controles Wt eutireoideos (figura 21).

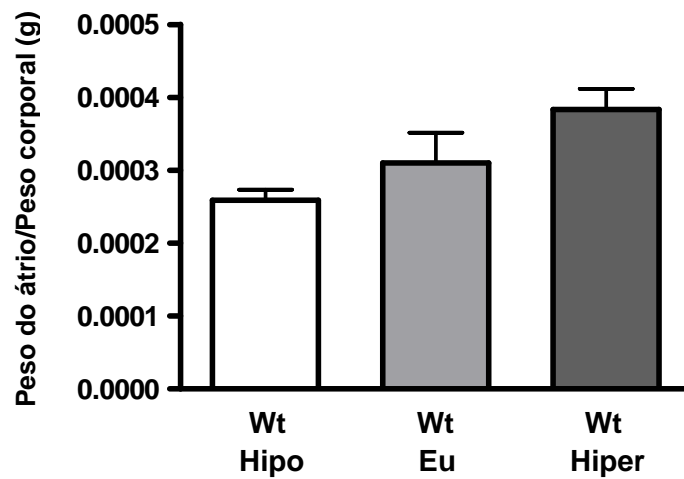


Figura 20. Peso do átrio corrigido pelo peso corporal de camundongos machos selvagens (Wt) induzidos ao hipotireoidismo (Hipo) e hipertireoidismo (Hiper) comparados aos seus respectivos controles eutireoideos (Eu). Os valores representam a média \pm erro-padrão. Hipo n=3, Eu n=3, Hiper n=3; p=0,07.

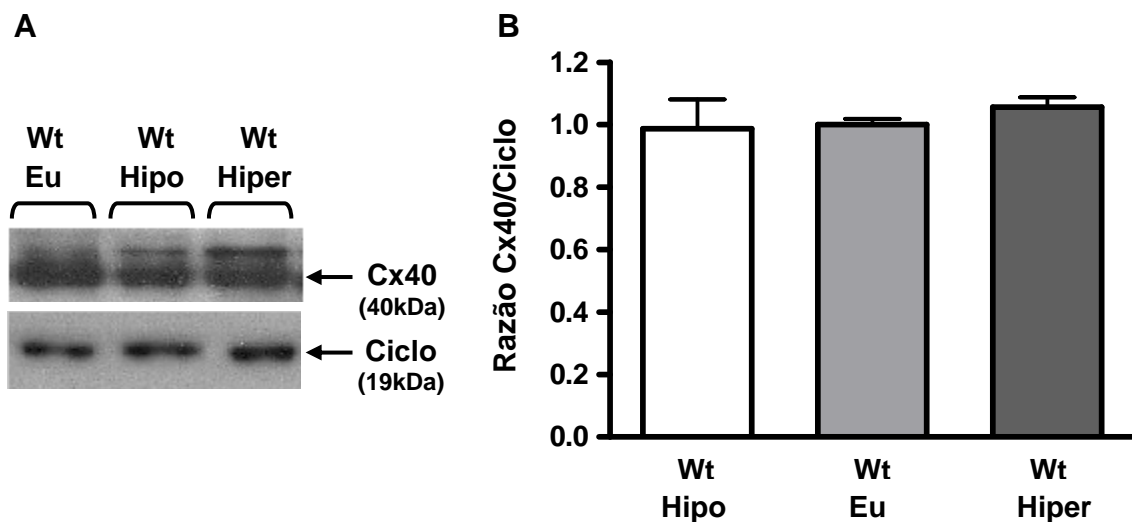


Figura 21. Expressão da proteína conexina40 (Cx40) no átrio de camundongos machos selvagens (Wt) eutireoideos (Eu) e submetidos a tratamentos para indução de hipotireoidismo (Hipo) e hipertireoidismo (Hiper). (A) Radiografia representativa do *Western blotting* utilizando anticorpos para Cx40 e ciclofilina (ciclo) no átrio. (B) Gráfico da razão dos valores densitométricos Cx40/ciclofilina. Os valores representam a média \pm erro-padrão, sendo os valores normalizados pela média do grupo Wt Hipo. Hipo n=3; Eu n=3; Hiper n=3.

3- ANIMAIS TR β KI Δ 337T (MODELO QUE EXPRESSA ISOFORMA TR β MUTADA EM TODOS OS TECIDOS DO ORGANISMO)

Nos camundongos, machos e fêmeas, que possuem a mutação Δ 337T TR β incorporada em suas células por substituição do gene normal, o peso do átrio corrigido pelo peso corporal de camundongos machos e fêmeas estava aumentado cerca de 42% nos heterozigotos e 55% nos homozigotos, em comparação aos animais selvagens (Wt) ($p < 0,05$) (figura 22). Não há diferença entre os sexos.

A análise da expressão proteica da Cx40 revelou 21% de diminuição na razão da expressão da Cx40 pela ciclofilina nos animais machos e fêmeas homozigotos em relação aos animais selvagens (Wt), sendo estes também diferentes dos heterozigotos ($p < 0,005$). Não se encontrou diferença significativa entre os animais heterozigotos e os selvagens (Wt) (figura 23).

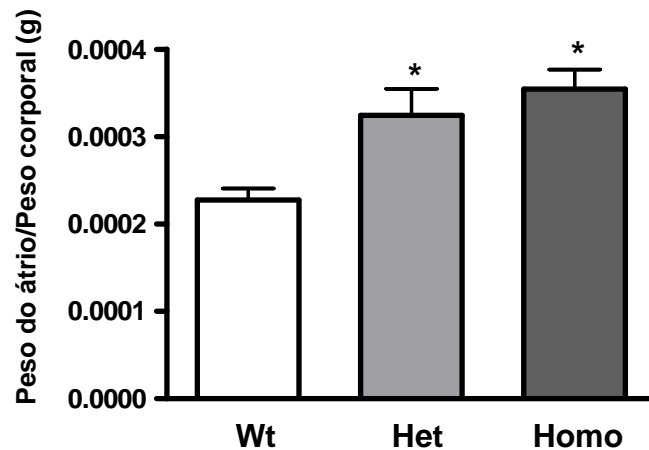


Figura 22. Peso do átrio corrigido pelo peso corporal de camundongos eutireoideos machos e fêmeas selvagens (Wt), heterozigotos (Het) e homozigotos (Homo) para a mutação TR β KI Δ 337T (expressão de TR β mutado em substituição ao normal em todos tecidos). Os valores representam a média \pm erro-padrão. Fêmeas/ Machos - Wt n=4/6, Het n=3/8, Homo n=2/5, *p<0,05 vs Wt.

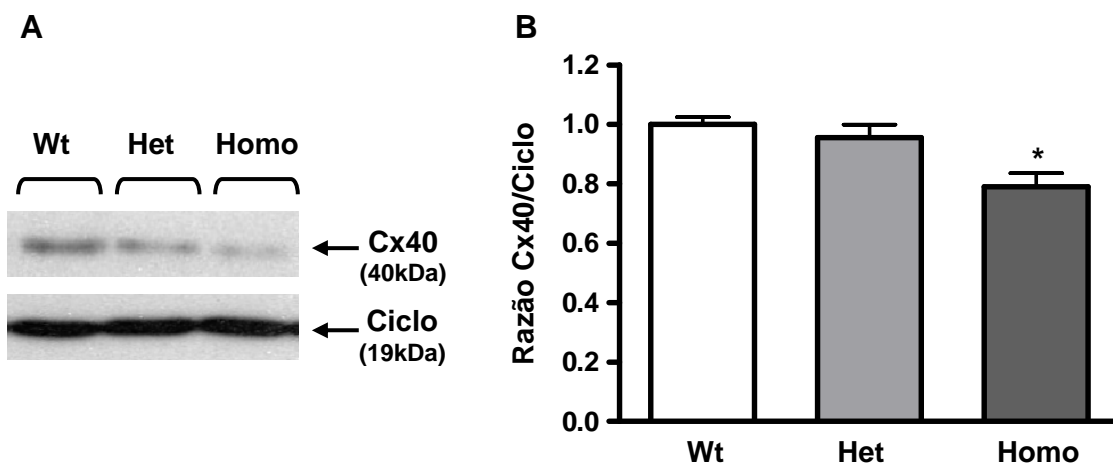


Figura 23. Expressão da proteína conexina40 (Cx40) no átrio de camundongos eutireoideos machos e fêmeas selvagens (Wt), heterozigotos (Het) e homozigotos (Homo) para a mutação TR β KI Δ 337T (expressão de TR β mutado em substituição ao normal em todos tecidos). (A) Radiografia representativa do *Western blotting* utilizando anticorpos para Cx40 e ciclofilina (ciclo) no átrio. (B) Gráfico da razão dos valores densitométricos Cx40/ciclofilina. Os valores representam a média \pm erro-padrão, sendo a média do grupo Wt normalizada para 1. sendo os valores normalizados pela média do grupo Wt. Fêmeas/ Machos - Wt n=3/4; Het n=3/5; Homo n=2/5; * p<0,005 vs Wt.

4- ANIMAIS TR β KI Δ 337T INDUZIDOS AO HIPOTIREOIDISMO E HIPOTIREOIDISMO ACRESCIDO DE TRATAMENTO COM T₃

De maneira similar aos modelos de hipotireoidismo e hipertireoidismo descritos anteriormente, a eficiência dos tratamentos de hipotireoidismo e hipotireoidismo acrescido de doses de T₃ foi validada com testes para dosagem das concentrações séricas de TSH e T₃. Na figura 24, pode-se observar a concentração sérica de TSH nos pontos de transição entre os tratamentos. Após 5 semanas de tratamento com PTU e MMI (dia 35), animais de todos os genótipos apresentaram concentração sérica de TSH muito elevada, fato que caracteriza a condição de hipotireoidismo. A partir da sexta semana, além de continuarem a ingerir os anti-tireoideanos, os animais passam a receber injeções diárias e crescentes de T₃. Nesta etapa (dia 35-42), ao receber injeções diárias de T₃ com a dose mais baixa (0,2 μ g/100g PC), a concentração sérica de TSH dos animais selvagens (Wt) e heterozigotos diminui consideravelmente em relação ao início do tratamento com T₃, cerca de 96%. De forma diferente, o grupo homozigoto apresenta uma redução de 80% ($p < 0,001$ vs animal selvagem sob o mesmo tratamento). No decorrer da segunda semana de tratamento com T₃ (dia 42-49), com a administração de injeções de T₃ na dose intermediária (0,5 μ g/100g PC), a concentração sérica de TSH dos animais selvagens (Wt) e heterozigotos continua a diminuir. Contudo, nos animais homozigotos a concentração sérica de TSH diminuiu pouco neste mesmo período ($p < 0,001$ vs animal selvagem sob o mesmo tratamento), o que indica uma resistência desses animais a ação do HT. Já ao término da última semana de tratamento com T₃ (dia 49-56), na qual foi administrada injeções de T₃ a dose mais elevada (1,0 μ g/100g PC), a concentração sérica de TSH dos animais selvagens (Wt) e heterozigotos diminui ainda mais (99% em relação ao início do tratamento com T₃) e atinge valores próximos aos normais, como na condição de eutireoidismo. O nível de TSH dos homozigotos também

reduziu (90%), porém não atingiu o nível dos animais selvagens (Wt) e heterozigotos, permanecendo cerca de 9 vezes mais elevada ($p < 0,001$) (figura 24) (valores do TSH em anexo – página 93).

De maneira semelhante ao TSH, a concentração sérica de T_3 também foi avaliada pontualmente no início e no fim do tratamento com T_3 . Como esperado, verificou-se que no fim da terceira semana de tratamento com T_3 , os animais apresentaram concentração sérica de T_3 2 vezes superior que no início do tratamento ($p < 0,001$) (figura 25). Este aumento ocorreu de forma semelhante entre os genótipos em todas as fases do tratamento, após tratamento com PTU e MMI e ao término da primeira e terceira semanas de tratamento com T_3 (figura 26). Com o fim do tratamento, a concentração sérica de T_3 dos animais selvagens (Wt) e heterozigotos atingiu valores aproximados aos de animais eutireoideos (estado basal, sem tratamento) (figura 27), podendo ser considerada, para estes, uma dose de reposição. De forma oposta, a concentração sérica de T_3 dos animais homozigotos após a terceira semana de tratamento com T_3 ainda permanece 2,7 vezes menor que a de animais homozigotos em seu estado basal ($p < 0,01$), uma vez que esta é naturalmente muito elevada (valores do T_3 em anexo – página 93).

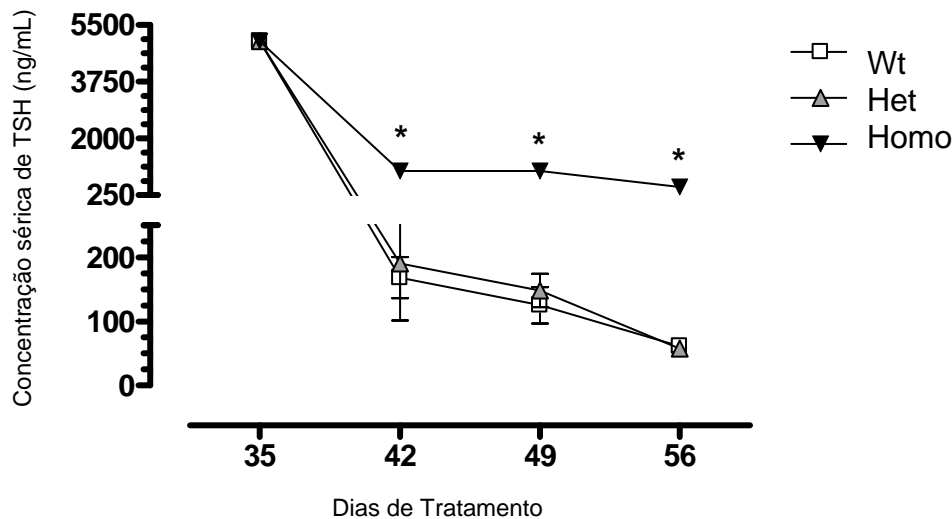


Figura 24. Concentração sérica de TSH de camundongos machos e fêmeas selvagens (Wt), heterozigotos (Het) e homozigotos (Homo) para a mutação TR β KI Δ 337T (expressão de TR β mutado em substituição ao normal em todos tecidos) submetidos ao tratamento de hipotireoidismo acrescido de doses crescentes de T₃. Concentração sérica de TSH, expressa em ng/mL. Dia 35, fim do tratamento somente com propil-tiouracil (PTU) e metimazol (MMI) e início do tratamento com PTU e MMI acrescido de injeções diárias de T₃. Dia 35-42, dose 0,2 μ g/100g de peso corporal. Dia 42-49, dose 0,5 μ g/100g de peso corporal. Dia 49-56, dose 1,0 μ g/100g de peso corporal. (*p<0,001 em relação ao controle Wt). Os valores representam a média \pm erro-padrão (n=3).

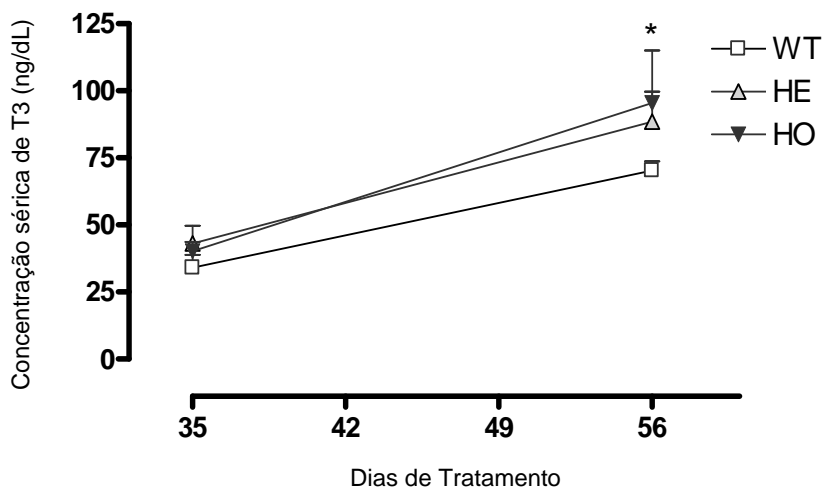


Figura 25. Concentração sérica de T₃ de camundongos machos e fêmeas selvagens (Wt), heterozigotos (Het) e homozigotos (Homo) para a mutação TR β KI Δ 337T (expressão de TR β mutado em substituição ao normal em todos tecidos) submetidos ao tratamento de hipotireoidismo acrescido de doses crescentes de T₃. Concentração sérica de T₃, expressa em ng/dL. Dia 35, fim do tratamento somente com propil-tiouracil (PTU) e metimazol (MMI) e início do tratamento com PTU e MMI acrescido de injeções diárias de T₃. Dia 35-42, dose 0,2 μ g/100g de peso corporal. Dia 42-49, dose 0,5 μ g/100g de peso corporal. Dia 49-56, dose 1,0 μ g/100g de peso corporal. *p<0,001 em relação ao grupo que recebeu somente PTU e MMI. Os valores representam a média \pm erro-padrão (n=5).

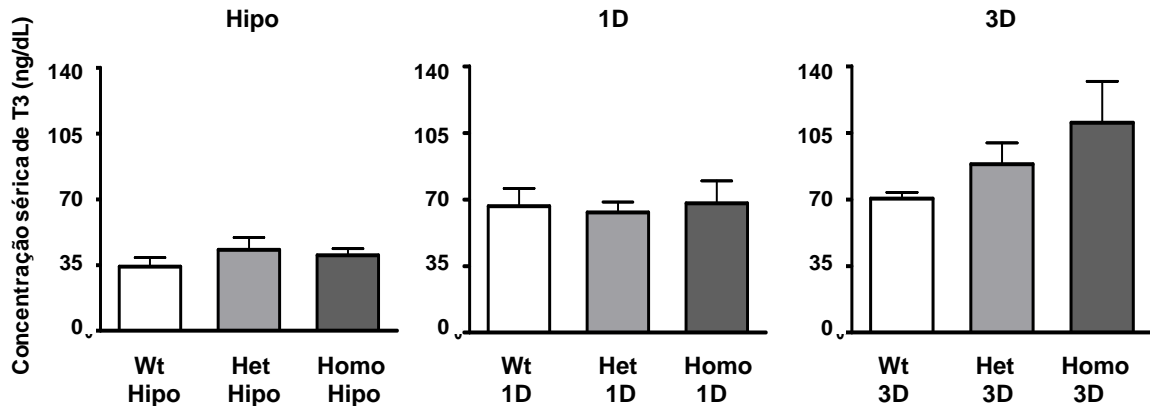


Figura 26. Concentração sérica de T₃ de camundongos machos e fêmeas selvagens (Wt), heterozigotos (Het) e homozigotos (Homo) para a mutação TR β KI Δ 337T (expressão de TR β mutado em substituição ao normal em todos tecidos) submetidos aos tratamentos de hipotireoidismo e hipotireoidismo acrescido de injeções de T₃. Concentração sérica de T₃, expressa em ng/dL. **A. [Hipo]**, fim do tratamento somente com propil-tiouracil (PTU) e metimazol (MMI), condição de hipotireoidismo (Wt n=5, Het n=6, Homo n=5). **B. [1D]** fim da primeira semana de tratamento com PTU e MMI acrescido de injeções diárias de T₃, na dose de 0,2 μ g/100g de peso corporal (Wt n=4, Het n=5, Homo n=4). **C. [3D]** fim da terceira semana de tratamento com PTU e MMI acrescido de injeções diárias de T₃, nas doses de 0,2 μ g, 0,5 μ g e 1,0 μ g/100g de peso corporal durante a primeira, segunda e terceira semana, respectivamente (Wt n=6, Het n=6, Homo n=4). Os valores representam a média \pm erro-padrão.

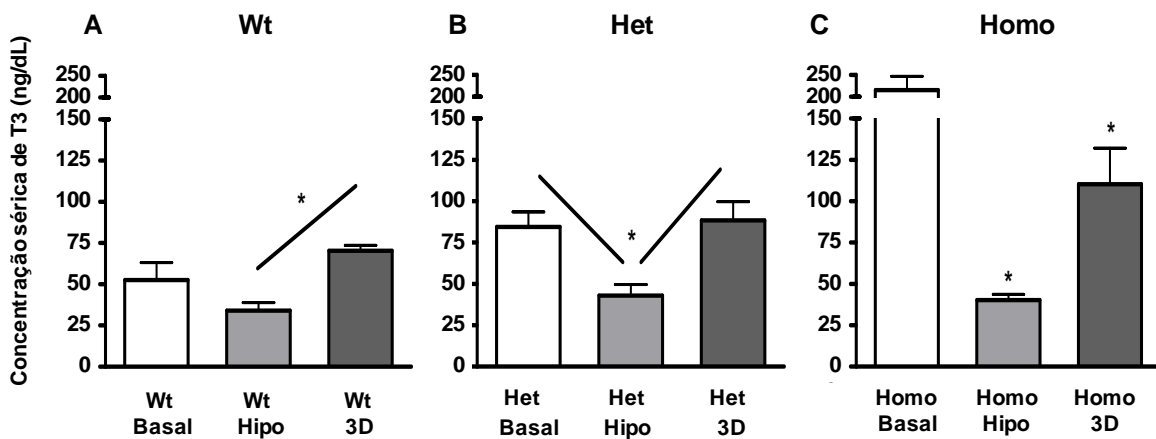


Figura 27. Concentração sérica de T₃ de camundongos machos e fêmeas selvagens (Wt), heterozigotos (Het) e homozigotos (Homo) para a mutação TR β KI Δ 337T (expressão de TR β mutado em substituição ao normal em todos tecidos) submetidos aos tratamentos de hipotireoidismo e hipotireoidismo acrescido de injeções de T₃. Concentração sérica de T₃, expressa em ng/dL. Basal, animais não tratados. Hipo, fim do tratamento somente com propil-tiouracil (PTU) e metimazol (MMI), condição de hipotireoidismo. 3D, fim da terceira semana de tratamento com PTU e MMI acrescido de injeções diárias de T₃, nas doses de 0,2 μ g, 0,5 μ g e 1,0 μ g/100g de peso corporal durante a primeira, segunda e terceira semana, respectivamente. **A. [Wt]** Basal n=3, Hipo n=5, 3D n=6; **B. [Het]** Basal n=5, Hipo n=6, 3D n=6; **C. [Homo]** Basal n=3, Hipo n=5, 3D n=6). Os valores representam a média \pm erro-padrão.

4.1- Animais TR β KI Δ 337T induzidos ao hipotireoidismo (Hipo)

De todos os grupos avaliados, machos e fêmeas apresentaram o mesmo comportamento e, por isso, os resultados foram dispostos em conjunto. No entanto, a condição de hipotireoidismo nos animais TR β KI Δ 337T foi a única em que foi verificada diferença entre os sexos, de forma que estes resultados foram analisados separadamente.

Nesta condição, quando os níveis de TSH e T₃ são semelhantes entre os genótipos (dia 35), não foi observada alteração de peso do átrio corrigido pelo peso corporal entre as fêmeas de diferentes genótipos submetidas ao hipotireoidismo (figura 28), enquanto houve um aumento significativo de 23% nos machos homozigotos hipotireoideos em relação aos machos selvagens (Wt) hipotireoideos ($p < 0,05$), sendo estes também diferentes dos heterozigotos hipotireoideos. Não existe diferença entre os machos heterozigotos hipotireoideos e os selvagens (Wt) hipotireoideos (figura 30).

A expressão da Cx40 atrial corrigida pela da ciclofilina nas fêmeas heterozigotas e homozigotas hipotireoideas apresentou uma diminuição de 23% e 49% em relação as selvagens (Wt) hipotireoideas, respectivamente, sendo somente a variação das homozigotas significativa ($p < 0,05$) (figura 29). De maneira diferente, a expressão da Cx40 não se alterou entre os machos de diferentes genótipos submetidos ao hipotireoidismo (figura 31).

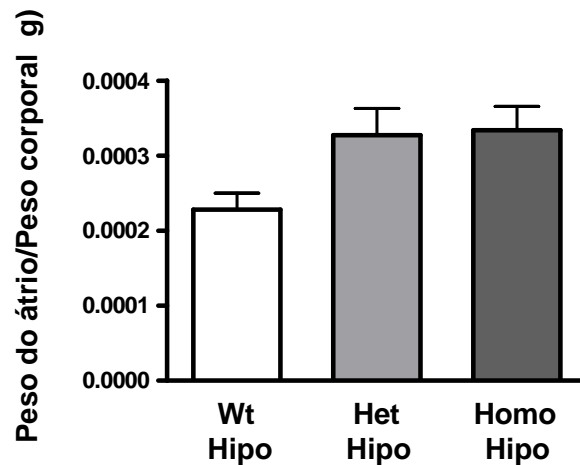


Figura 28. Peso do átrio corrigido pelo peso corporal de camundongos fêmeas hipotireoideas selvagens (Wt), heterozigotas (Het) e homozigotas (Homo) para a mutação TR β KI Δ 337T (expressão de TR β mutado em substituição ao normal em todos tecidos). Hipotireoidismo induzido pelo tratamento com propil-tiouracil (PTU) e metimazol (MMI). Os valores representam a média \pm erro-padrão. Fêmeas/ Machos - Wt n=4, Het n=4, Homo n=4.

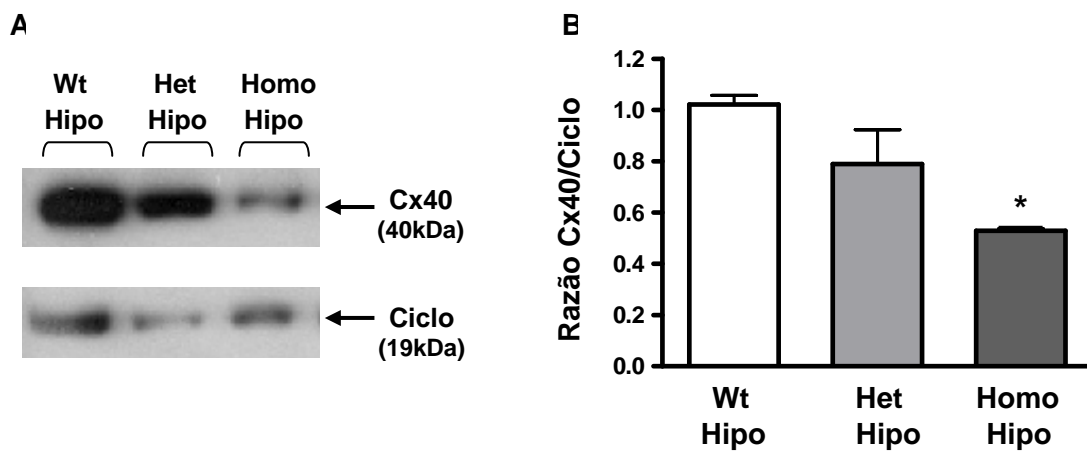


Figura 29. Expressão da proteína conexina40 (Cx40) no átrio de camundongos fêmeas hipotireoideas selvagens (Wt), heterozigotas (Het) e homozigotas (Homo) para a mutação TR β KI Δ 337T (expressão de TR β mutado em substituição ao normal em todos tecidos). Hipotireoidismo induzido pelo tratamento com propil-tiouracil (PTU) e metimazol (MMI). (A) Radiografia representativa do *Western blotting* utilizando anticorpos para Cx40 e ciclofilina (ciclo) no átrio. (B) Gráfico da razão dos valores densitométricos Cx40/ciclofilina. Os valores representam a média \pm erro-padrão, sendo os valores normalizados pela média do grupo Wt Hipo. Wt n=3, Het n=2, Homo n=3, *p<0,05 vs Wt Hipo.

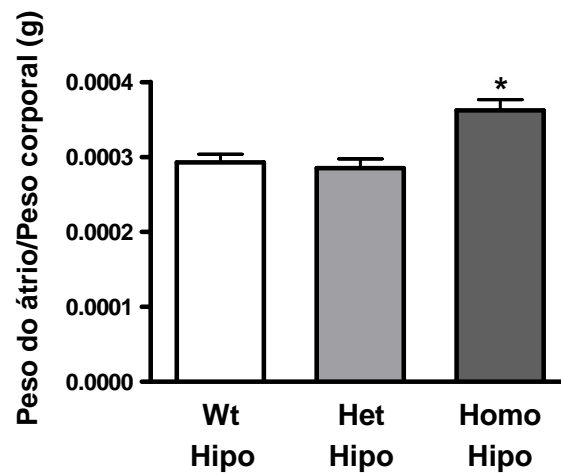


Figura 30. Peso do átrio corrigido pelo peso corporal de camundongos machos hipotireoideos selvagens (Wt), heterozigotos (Het) e homozigotos (Homo) para a mutação TR β KI Δ 337T (expressão de TR β mutado em substituição ao normal em todos tecidos). Hipotireoidismo induzido pelo tratamento com propil-tiouracil (PTU) e metimazol (MMI). Os valores representam a média \pm erro-padrão. Wt n=4, Het n=4, Homo n=2. *p<0,05 vs Wt Hipo e Het Hipo.

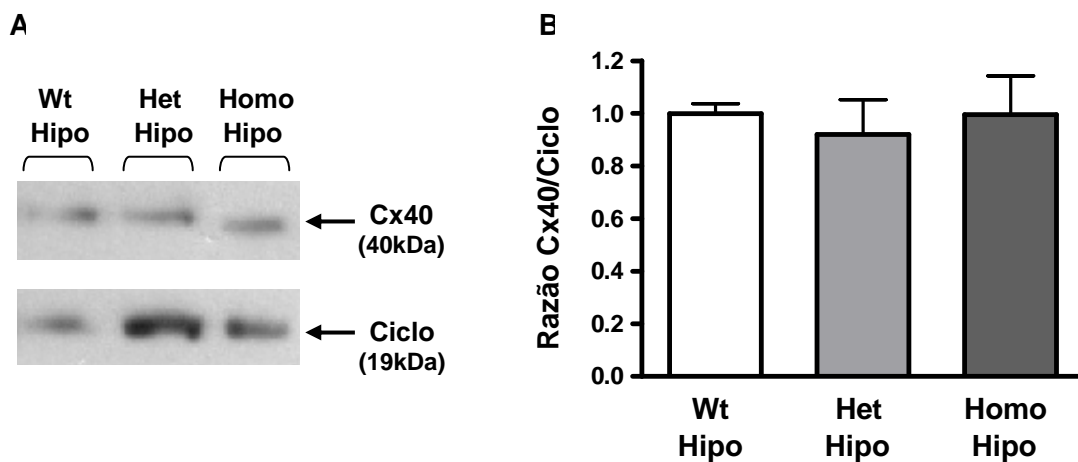


Figura 31. Expressão da proteína conexina40 (Cx40) no átrio de camundongos machos hipotireoideos selvagens (Wt), heterozigotos (Het) e homozigotos (Homo) para a mutação TR β KI Δ 337T (expressão de TR β mutado em substituição ao normal em todos tecidos). Hipotireoidismo induzido pelo tratamento com propil-tiouracil (PTU) e metimazol (MMI). **(A)** Radiografia representativa do *Western blotting* utilizando anticorpos para Cx40 e ciclofilina (ciclo) no átrio. **(B)** Gráfico da razão dos valores densitométricos Cx40/ciclofilina. Os valores representam a média \pm erro-padrão, sendo os valores normalizados pela média do grupo Wt Hipo. Wt n=3, Het n=3, Homo n=3.

4.2- Animais TR β KI Δ 337T induzidos ao hipotireoidismo acrescido de tratamento com T₃ na dose 0,2 μ g/100g de peso corporal (1D)

Os animais TR β KI Δ 337T machos e fêmeas hipotireoideos que receberam injeções diárias de T₃ na dose 0,2 μ g/100g de peso corporal não apresentaram alteração no peso do átrio corrigido pelo peso corporal (figura 32).

Da mesma forma, não foi detectada mudança no padrão de expressão da Cx40 entre os genótipos e entre os sexos no grupo que recebeu injeções de T₃ na dose 0,2 μ g/100g de peso corporal durante uma semana (figura 33).

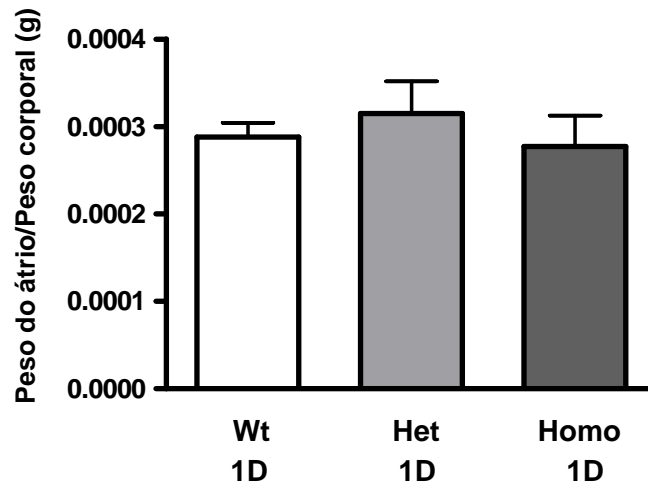


Figura 32. Peso do átrio corrigido pelo peso corporal de camundongos machos e fêmeas 1D selvagens (Wt), heterozigotos (Het) e homozigotos (Homo) para a mutação TR β KI Δ 337T (expressão de TR β mutado em substituição ao normal em todos tecidos). (1D) Animais submetidos ao hipotireoidismo, pelo tratamento com propil-tiouracil (PTU) e metimazol (MMI), acrescido de injeções diárias de T₃ na dose de 0,2 μ g/100g de peso corporal durante uma semana. Os valores representam a média \pm erro-padrão. Fêmeas/ Machos - Wt n=3/3, Het n=3/3, Homo n=2/3.

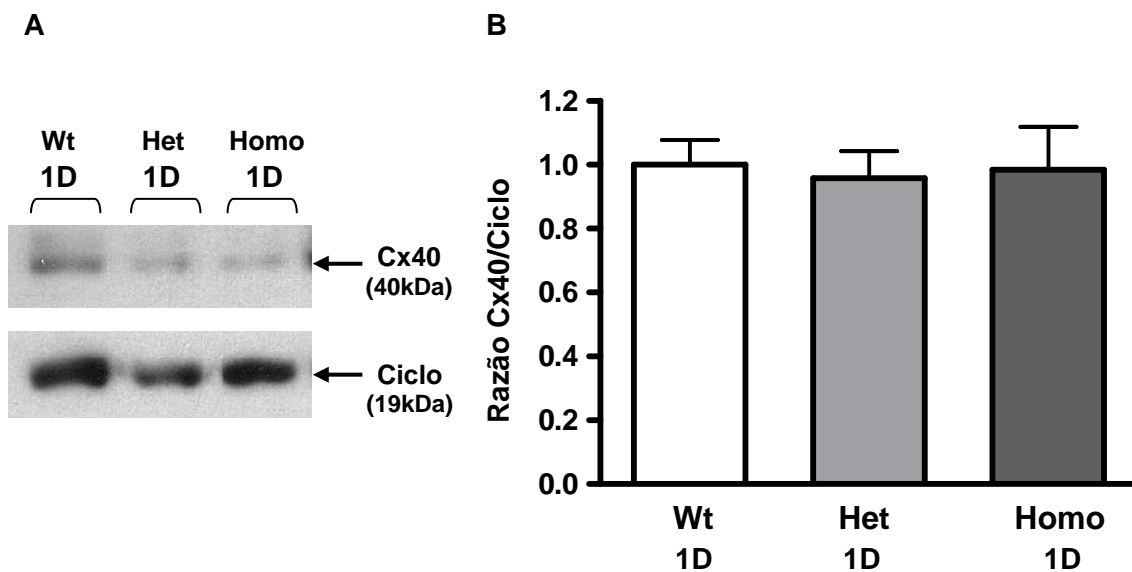


Figura 33. Expressão da proteína conexina40 (Cx40) no átrio de camundongos machos e fêmeas (1D) selvagens (Wt), heterozigotos (Het) e homozigotos (Homo) para a mutação TR β KI Δ 337T (expressão de TR β mutado em substituição ao normal em todos tecidos). (1D) Animais submetidos ao hipotireoidismo, pelo tratamento com propil-tiouracil (PTU) e metimazol (MMI), acrescido de injeções diárias de T₃ na dose de 0,2 μ g/100g de peso corporal durante uma semana. (A) Radiografia representativa do *Western blotting* utilizando anticorpos para Cx40 e ciclofilina (ciclo) no átrio. (B) Gráfico da razão dos valores densitométricos Cx40/ciclofilina. Os valores representam a média \pm erro-padrão, sendo os valores normalizados pela média do grupo Wt 1D. Fêmeas/ Machos - Wt n=3/3; Het n=3/3; Homo n=4/2.

4.3- Animais TR β KI Δ 337T induzidos ao hipotireoidismo acrescido de tratamento com T₃ nas doses 0,2 μ g, 0,5 μ g e 1,0 μ g/100g de peso corporal (3D)

De maneira similar ao grupo que recebeu injeções na dose 0,2 μ g/100g peso corporal, os animais machos e fêmeas que receberam as três doses 0,2 μ g, 0,5 μ g e 1,0 μ g/100g peso corporal não apresentaram alteração no peso do átrio corrigido pelo peso corporal (figura34) e na expressão da Cx40 (figura 35).

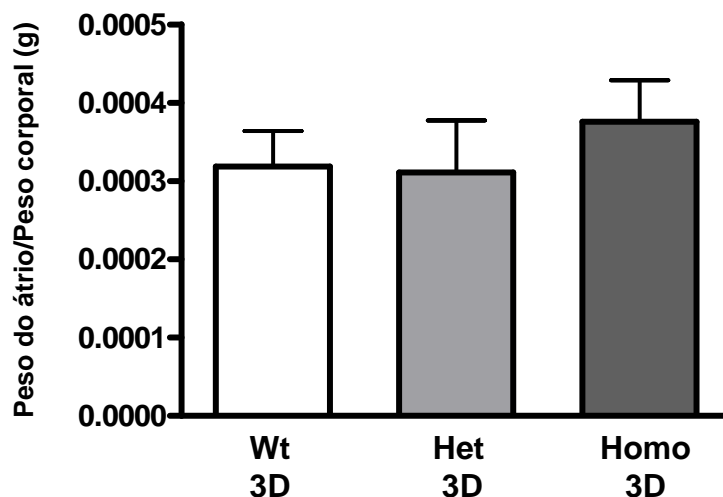


Figura 34. Peso do átrio corrigido pelo peso corporal de camundongos machos e fêmeas 3D selvagens (Wt), heterozigotos (Het) e homozigotos (Homo) para a mutação TR β KI Δ 337T (expressão de TR β mutado em substituição ao normal em todos tecidos). (3D) Animais submetidos ao hipotireoidismo, pelo tratamento com propil-tiouracil (PTU) e metimazol (MMI), acrescido de injeções diárias de T₃ na dose de 0,2 μ g, 0,5 μ g e 1,0 μ g/100g de peso corporal durante uma semana cada dose, consecutivamente. Os valores representam a média \pm erro-padrão. Fêmeas/ Machos - Wt n=4/5, Het n=4/4, Homo n=4/3.

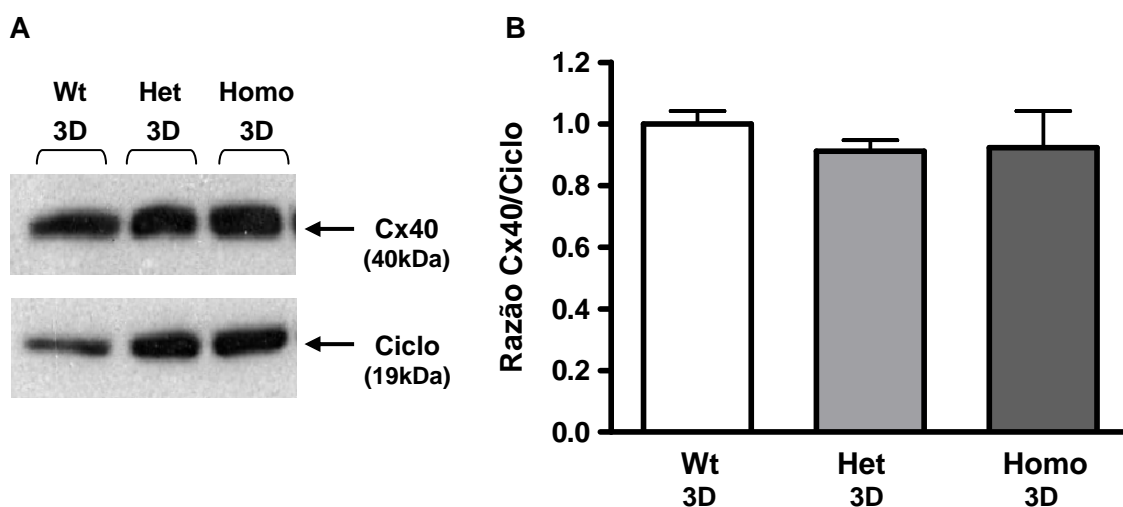


Figura 35. Expressão da proteína conexina40 (Cx40) no átrio de camundongos machos e fêmeas 3D selvagens (Wt), heterozigotos (Het) e homozigotos (Homo) para a mutação TR β KI Δ 337T (expressão de TR β mutado em substituição ao normal em todos tecidos). (3D) Animais submetidos ao hipotireoidismo, pelo tratamento com propil-tiouracil (PTU) e metimazol (MMI), acrescido de injeções diárias de T₃ na dose de 0,2 μ g, 0,5 μ g e 1,0 μ g/100g de peso corporal durante uma semana cada dose, consecutivamente. (A) Radiografia representativa do *Western blotting* utilizando anticorpos para Cx40 e ciclofilina (ciclo) no átrio. (B) Gráfico da razão dos valores densitométricos Cx40/ciclofilina. Os valores representam a média \pm erro-padrão, sendo os valores normalizados pela média do grupo Wt 3D. Fêmeas/ Machos - Wt n=3/4; Het n=3/4; Homo n=3/4.

4.4- Comparação entre animais selvagens (Wt) submetidos ao hipotireoidismo e hipotireoidismo acrescido de tratamento com T₃

Ao comparar animais machos e fêmeas selvagens sob os diferentes tratamentos quanto ao peso do átrio corrigido pelo peso corporal (figura 36) e expressão da Cx40 (figura 37), não se encontrou diferença entre os grupos hipotireoideos (Hipo), os hipotireoideos que receberam injeções diárias de T₃ na dose de 0,2µg/100g de peso corporal durante uma semana (1D), e os hipotireoideos que receberam injeções diárias de T₃ na dose de 0,2µg, 0,5µg e 1,0µg/100g de peso corporal (3D).

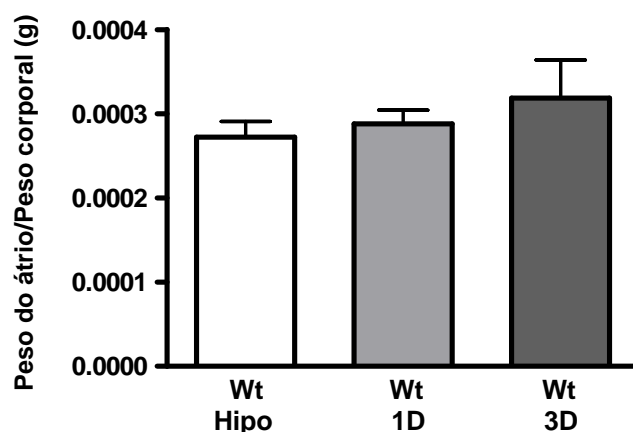


Figura 36. Peso do átrio corrigido pelo peso corporal de camundongos machos e fêmeas selvagens (Wt) hipotireoideos (Hipo), hipotireoideos que receberam injeções diárias de T_3 na dose de $0,2\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso corporal durante uma semana (1D), e hipotireoideos que receberam injeções diárias de T_3 na dose de $0,2\mu\text{g}$, $0,5\mu\text{g}$ e $1,0\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso corporal durante uma semana cada dose, consecutivamente (3D). Os valores representam a média \pm erro-padrão. Fêmeas/ Machos - Hipo $n=4/4$, 1D $n=3/3$, 3D $n=4/3$.

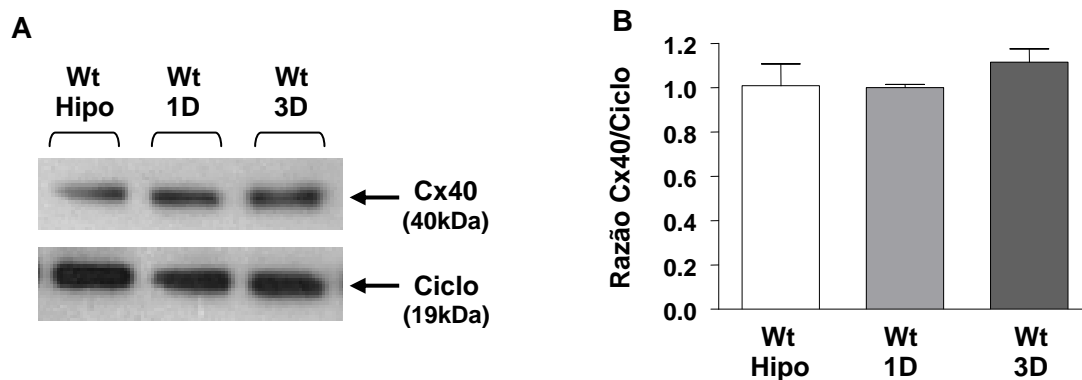


Figura 37. Expressão da proteína conexina40 (Cx40) no átrio de camundongos machos e fêmeas selvagens (Wt) hipotireoideos (Hipo), hipotireoideos que receberam injeções diárias de T_3 na dose de $0,2\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso corporal durante uma semana (1D), e hipotireoideos que receberam injeções diárias de T_3 na dose de $0,2\mu\text{g}$, $0,5\mu\text{g}$ e $1,0\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso corporal durante uma semana cada dose, consecutivamente (3D). (A) Radiografia representativa do *Western blotting* utilizando anticorpos para Cx40 e ciclofilina (ciclo) no átrio. (B) Gráfico da razão dos valores densitométricos Cx40/ciclofilina. Os valores representam a média \pm erro-padrão, sendo os valores normalizados pela média do grupo Wt Hipo. Fêmeas/ Machos - Hipo $n=3/3$; 1D $n=3/3$; 3D $n=3/4$.

4.5- Comparação entre animais homozigotos para a mutação TR β KI Δ 337T submetidos ao hipotireoidismo e hipotireoidismo acrescido de tratamento com T₃

Animais machos e fêmeas homozigotos para a mutação TR β KI Δ 337T submetidos aos diferentes tratamentos também foram comparados entre eles. Quanto ao peso do átrio corrigido pelo peso corporal (figura 38) e expressão da Cx40 (figura 39), não foi observada diferença entre os grupos hipotireoideos (Hipo), os hipotireoideos que receberam injeções diárias de T₃ na dose de 0,2 μ g/100g de peso corporal durante uma semana (1D), e os hipotireoideos que receberam injeções diárias de T₃ na dose de 0,2 μ g, 0,5 μ g e 1,0 μ g/100g de peso corporal (3D).

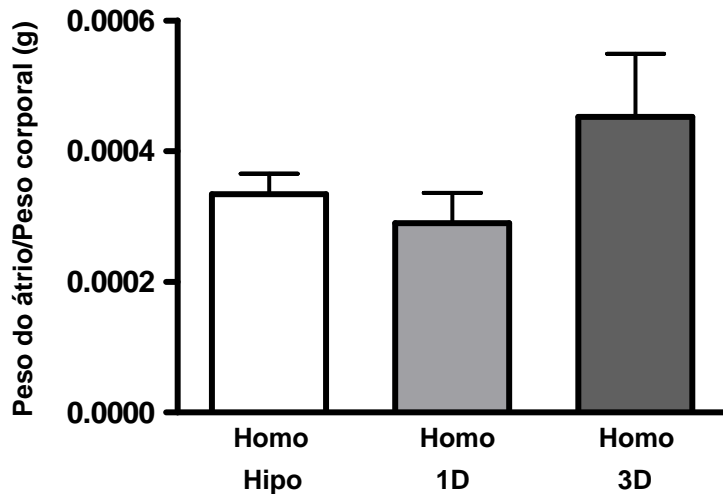


Figura 38. Peso do átrio corrigido pelo peso corporal de camundongos machos e fêmeas homocigotos para a mutação TR β KI Δ 337T (expressão de TR β mutado em substituição ao normal em todos tecidos) hipotireoideos (Hipo), hipotireoideos que receberam injeções diárias de T₃ na dose de 0,2 μ g/100g de peso corporal durante uma semana (1D), e hipotireoideos que receberam injeções diárias de T₃ na dose de 0,2 μ g, 0,5 μ g e 1,0 μ g/100g de peso corporal durante uma semana cada dose, consecutivamente (3D). Fêmeas/ Machos - Hipo n=4/2, 1D n=2/2, 3D n=4/3. Os valores representam a média \pm erro-padrão.

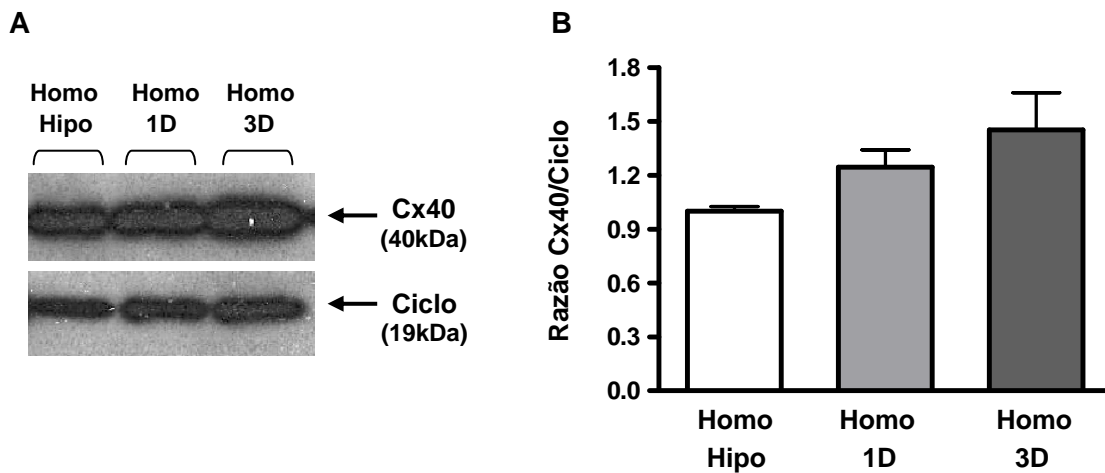


Figura 39. Expressão da proteína conexina40 (Cx40) no átrio de camundongos machos e fêmeas homocigotos para a mutação TR β KI Δ 337T (expressão de TR β mutado em substituição ao normal em todos tecidos) hipotireoideos (Hipo), hipotireoideos que receberam injeções diárias de T₃ na dose de 0,2 μ g/100g de peso corporal durante uma semana (1D), e hipotireoideos que receberam injeções diárias de T₃ na dose de 0,2 μ g, 0,5 μ g e 1,0 μ g/100g de peso corporal durante uma semana cada dose, consecutivamente (3D). (A) Radiografia representativa do *Western blotting* utilizando anticorpos para Cx40 e ciclofilina (ciclo) no átrio. (B) Gráfico da razão dos valores densitométricos Cx40/ciclofilina. Os valores representam a média \pm erro-padrão, sendo os valores normalizados pela média do grupo Homo Hipo. Fêmeas/ Machos - Hipo n=3/4; 1D n=4/3; 3D n=3/4.

RESUMO DOS RESULTADOS

Tabela 2. Resumo dos resultados sobre regulação do peso atrial e da expressão protéica da conexina40 (Cx40).

	KS	Hipo	Hiper	KI	KI Hipo fêmea	KI Hipo macho	KI 1D	KI 3D
Peso Atrial	↑	~	~	↑	~	↑	~	~
Cx40	↓	~	~	↓	↓	~	~	~

- KS – ↑ peso atrial, ↓ expressão protéica da Cx40;
- Hipo – peso atrial e expressão protéica da Cx40 inalterados;
- Hiper – peso atrial e expressão protéica da Cx40 inalterados;
- KI – ↑ peso atrial, ↓ expressão protéica da Cx40;
- KI Hipo fêmea – peso atrial inalterado, ↓ expressão protéica da Cx40;
- KI Hipo macho – ↑ peso atrial, expressão protéica da Cx40 inalterada;
- 1D – peso atrial e expressão protéica da Cx40 inalterados;
- 3D – peso atrial e e expressão protéica da Cx40 inalterados.

DISCUSSÃO

O HT atua em vários processos fisiológicos, tendo como alvo as células de grande parte dos órgãos e tecidos do organismo. Entre eles estão o coração e a vasculatura, em cujas células o HT atua através de efeitos rápidos ou, como a grande parte descrita, via ações genômicas das quais participam os TRs (Fazio *et al.*, 2004).

As manifestações cardíacas mais comuns no hipotireoidismo e hipertireoidismo são a diminuição e o aumento da frequência cardíaca, respectivamente (Klein & Ojamaa, 2001). Mais especificamente, nessas condições ocorrem alterações no padrão de condução do impulso elétrico entre as células miocárdicas, fato que levou muitos pesquisadores a estudar os mecanismos moleculares destes efeitos. Alguns trabalhos descrevem o papel do HT na modulação da expressão de canais iônicos e transportadores, por exemplo, o canal de potássio KV 1.5 e o canal de cálcio tipo L (Le Bouter *et al.*, 2003). Tais fatos explicam a lentificação durante as fases de repolarização do potencial de ação. Alguns genes envolvidos na despolarização dos nodos sinoatrial e atrioventricular, como canais HCN e cálcio tipo L, são alvos do HT (Le Bouter *et al.*, 2003), o que contribui para a modulação da frequência dos pulsos elétricos. No entanto, a explicação para uma maior duração da fase de despolarização cardíaca permanecia desconhecida, já que a expressão de canais de sódio, principais responsáveis pelos eventos de despolarização, não parece ser modulada por HT (Le Bouter *et al.*, 2003).

A propagação do impulso elétrico também depende da passagem intercelular de corrente entre os cardiomiócitos, permitida por canais juncionais compostos por proteínas da família das conexinas. Assim, o objetivo inicial do nosso grupo de pesquisa foi demonstrar a modulação das conexinas cardíacas pelo HT. No entanto, a caracterização dos efeitos diretos do hiper- ou hipotireoidismo sobre a função cardíaca e também sobre a expressão de genes alvo do HT é dificultada devido às alterações que

ocorrem paralelamente no sistema vascular e se refletem na hemodinâmica cardíaca por alterações na pré- e pós-carga. Por isso, os estudos iniciaram com o camundongo transgênico TR β KS Δ 337T, modelo que superexpressa a isoforma TR β mutada exclusivamente no coração. Esta mutação torna o receptor incapaz de interagir com o T₃, apesar de ainda ser capaz de interagir com outros receptores e co-fatores. Portanto, o modelo KS permite a descrição dos efeitos do HT via TR diretamente na musculatura cardíaca. Foi verificado que a expressão do RNAm da Cx43, a proteína juncional mais abundante no miocárdio, não está alterada no átrio e no ventrículo dos animais KS. Já a expressão do RNAm da Cx40, proteína normalmente restrita ao átrio e sistema de condução, está extremamente diminuída no tecido atrial dos animais KS, correspondendo a apenas 20% da expressão de animais selvagens (Almeida *et al.*, 2009).

Neste trabalho, ao analisar a expressão protéica da Cx40 no átrio de animais machos KS verificamos a repetição do padrão de diminuição, cuja magnitude foi de 47% em relação ao animal selvagem (Wt) (figura 18). A diminuição da expressão da Cx40 em um modelo que apresenta a sinalização do HT comprometida somente no coração sugere que o HT atua diretamente no tecido atrial, através de seus receptores nucleares, modulando a expressão da Cx40.

Ao analisar os parâmetros eletrocardiográficos de animais KS não anestesiados, verificou-se que esses apresentam bradicardia (Almeida *et al.*, 2009). Isto indica alteração na atividade marcapasso do nodo sinoatrial, que pode ser parcialmente explicada pelo efeito do HT em modular a expressão de genes como HCN e canais de Ca²⁺ tipo L (Le Bouter *et al.*, 2003). É possível que a redução da Cx40 contribua para esse fenômeno, já que o animal *knockout* para Cx40 possui automaticidade do nodo sinoatrial diminuída (Kirchhoff *et al.*, 1998). Manifestações clínicas de distúrbios da condução atrial em pacientes hipotireoideos não são muito comuns, enquanto arritmias

atriais são muito incidentes em pacientes hipertireoideos (Klein & Ojamaa, 2000). Existem estudos que associam a elevada expressão da Cx40 à alta incidência de fibrilação atrial (Dupont *et al.*, 2001a; Polontchouk *et al.*, 2002). Assim, pode ser que alterações da expressão da Cx40 estejam relacionadas à ocorrência de fibrilação atrial em paciente hipertireoideos.

Já foi demonstrado duas vezes que o modelo KS apresenta fenótipo cardíaco hipotireoideo independente da concentração sérica de HT. Primeiramente, em 2000, Pazos-Moura e colaboradores demonstraram que o animal KS em seu estado basal apresenta expressão de β -MHC elevada, que permanece inalterada independente da diminuição ou aumento da concentração sérica de HT, induzida pelos tratamentos com PTU ou T₃, respectivamente. Isto também foi evidenciado para o RNAm da Cx40, cuja expressão é semelhante nos grupos de animais KS não tratado e submetidos a indução de hipo- ou hipertireoidismo (Almeida *et al.*, 2009). Esta não responsividade ao HT indica uma grande resistência cardíaca ao hormônio e reforça profundamente a participação das isoformas de TR no bom funcionamento cardíaco.

O animal KS reproduz um modelo de hipotireoidismo cardíaco seletivo, de modo que enquanto todo o organismo responde normalmente ao HT, somente o coração possui um fenótipo hipotireoideo. Desta forma, avaliamos também a expressão protéica da Cx40 em animais machos selvagens (Wt) submetidos às condições de hipotireoidismo e hipertireoidismo sistêmico. A análise prévia da expressão do RNAm demonstrou uma diminuição de 25% no hipotireoidismo e aumento de 40% no hipertireoidismo (Almeida *et al.*, 2009). No entanto, de forma surpreendente, não detectamos alteração significativa na expressão protéica da Cx40 frente a variações da concentração sérica de T₃ (figura 21). Este fato sugere que o HT, além de modular a taxa de transcrição do gene da Cx40, ainda influencie outros processos pós transcricionais que, por fim, mantêm inalterada a expressão protéica da Cx40. Assim,

durante a escassez ou excesso de HT, os níveis da proteína Cx40 ainda se mantêm, o que indica a existência de uma regulação extremamente precisa e que, possivelmente, depende de outros fatores, intrínsecos ou extrínsecos ao coração.

A expressão das isoformas de TR no coração é heterogênea, consiste na predominância da isoforma α em detrimento da β . (Stoykov *et al.*, 2006). No animal KS este padrão normal está comprometido, pois a expressão do transgene é direcionada pelo promotor cardíaco-específico da proteína α -MHC, uma proteína muito abundante nos cardiomiócitos. Isto faz com que, no animal KS, a expressão da isoforma TR β esteja superexpressa comparada a expressão da isoforma normal. Desta forma, não podemos inferir que as alterações observadas no animal KS sejam causadas exclusivamente pela presença da isoforma mutada, pois esta é incapaz de interagir com o hormônio, mas capaz de se dimerizar com todas as outras isoformas normais, podendo evitar a ação destas. Assim, as alterações observadas no modelo utilizado podem ser resultantes da diminuição do efeito da isoforma β normal, assim como da isoforma α .

Com o objetivo de melhor entender a regulação da Cx40 pelo HT, utilizamos como modelo de estudo um outro animal transgênico, o camundongo TR β KI Δ 337T, o qual expressa isoforma TR β mutante em substituição à normal em todo o organismo. Os animais homozigotos para a mutação apresentam concentrações séricas elevadas de TSH, T₄ e T₃ livres e totais, devido à regulação anormal do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide, caracterizando a resistência aos hormônios tireoideanos. Em tecidos nos quais predominam a expressão da isoforma TR α podem ocorrer sinais de hipertireoidismo, enquanto em tecidos com predomínio de TR β , pode haver uma hiporresponsividade tecidual ao HT. Sendo assim, o fenótipo desses animais é bastante complexo, podendo haver um quadro de hiper- ou hipotireoidismo.

De maneira similar ao animal KS modelo de hipotireoidismo cardíaco seletivo, camundongos machos e fêmeas homozigotos para a mutação TR β KI apresentaram

diminuição de 21% da expressão protéica da Cx40 (figura 23). Este fenótipo no animal TR β KI, modelo que apresenta altos níveis séricos de T₃ em seu estado basal, indica que, na presença de altas concentrações de HT, a isoforma TR β é importante na regulação da Cx40. No miocárdio de animais adultos normais, a isoforma TR β é encontrada nos nodos sinoatrial e atrioventricular, nos cardiomiócitos atriais e no sistema de condução atrioventricular (Stoykov *et al.*, 2006). Este padrão de expressão do TR β , com exceção dos nodos, coincide com a expressão de Cx40, fato que reforça a idéia de que esta isoforma tenha algum papel na regulação da Cx40. De certa forma, podemos excluir a possibilidade da diminuição protéica de Cx40 ser causada pelo excesso de HT atuando nas isoformas normais de TR α , já que a redução de Cx40 também ocorre nos animais KS (perturbação de TR α e TR β) na presença de concentração sérica normal de HT.

O modelo TR β KI Δ 337T tem sido utilizado para avaliar o papel do TR β em mediar efeitos do HT em todo o organismo, porém os animais são fenotipicamente distintos dos TR β *knock out*. Isto ocorre pois, nos animais KS e KI, o TR mutado ainda promove efeitos independente de ligante (Hashimoto *et al.*, 2001). A sinalização correta do HT também depende da interação do TR com outros receptores e co-reguladores, e a função deles pode estar alterada na presença da mutação Δ 337T. Foi demonstrado que o animal KS possui alteração cardíaca da expressão protéica basal de alguns receptores, como aumento de PPAR β e diminuição de TR α 1 e RXR α (Buroker *et al.*, 2006). No fígado do animal TR β KI Δ 337T, foi observado uma alteração da sinalização dos receptores nucleares TR β e o receptor X do fígado (LXR). Normalmente, na presença do T₃, homodímeros formados de isoformas normais de TR se dissociam para dimerizar com RXR e interagir com seqüências do DNA. No entanto, os homodímeros de isoformas mutadas tendem a dissociar menos e, assim, competir menos pela interação

com RXR. Por fim, os receptores RXR ficam mais disponíveis para interagir com LXR, fato que aumenta a sinalização do LXR (Hashimoto *et al.*, 2006).

Além disso, outra particularidade a ser considerada é que os animais transgênicos têm alterações congênitas e assim, a presença da mutação durante o desenvolvimento embrionário e neonatal do animal pode acarretar algum comprometimento capaz de influenciar o fenótipo adulto. Desta forma, pode haver diferenças qualitativas e quantitativas em relação ao fenótipo de um animal adulto induzido ao hipo- ou hipertireoidismo. No entanto, a diminuição da Cx40 observada nos animais TR β KI Δ 337T não parece ser devido a algum evento durante o desenvolvimento, mas sim pela combinação da presença do TR β mutante e de altas concentrações de HT. Já que, após normalizar a concentração sérica de HT dos homozigotos TR β KI Δ 337T a de animais selvagens (Wt) eutireoideos, esses animais não apresentaram diferença na expressão protéica da Cx40 (figura35).

A diminuição protéica da Cx40 observada nos homozigotos para a mutação TR β KI Δ 337T ocorre na presença de elevadas concentrações séricas de TSH, T₃ e T₄. Com o objetivo de descobrir se a presença da mutação em TR β interfere na expressão da Cx40 exclusivamente na presença de altos níveis de T₃, submetemos os animais KI a indução de hipotireoidismo e hipotireoidismo acrescido de T₃, visando avaliar o efeito da presença da mutação na presença de níveis baixos e normais de T₃.

Todos os animais hipotireoideos apresentaram TSH elevado e baixa concentração sérica de T₃, caracterizando a eficiência do tratamento com PTU e MMI (figura 24; valores do TSH em anexo – página 93) . O grupo de animais submetidos ao hipotireoidismo foi o único em que se observou diferença entre sexos. A expressão protéica da Cx40 nas fêmeas heterozigotas e homozigotas hipotireoideas apresentou redução de 23% e 49%, respectivamente, em relação a fêmeas selvagens (Wt) hipotireoideas (figura 29). Porém não houve alteração nos mesmos grupos do sexo

masculino. Este resultado indica que existe algum tipo de relação entre o sexo do animal e a regulação da Cx40 por hormônio tireoideano. É possível que algum hormônio sexual feminino, na ausência de HT, seja capaz de reduzir a expressão da Cx40, o que justificaria somente as fêmeas apresentarem este fenótipo. Já foi demonstrado, em experimentos *in vitro*, que o estrogênio é capaz de reduzir a expressão do RNAm da Cx40 em cultura de cardiomiócitos atriais (Almeida *et al.*, 2003). Desta forma, pode ser que na condição de escassez de HT (hipotireoidismo), o estrogênio seja um dos responsáveis pela diminuição da Cx40, observada somente nas fêmeas.

De forma diferente dos animais sem tratamento (estado basal), não foi verificada diminuição da expressão da Cx40 nos machos heterozigotos e homozigotos hipotireoideos quando comparados aos animais selvagens (Wt) hipotireoideos (figura 31). Tal fato sugere que, em machos, a isoforma TR β normal não exerça um papel importante na regulação da expressão protéica da Cx40 na presença de baixas concentrações de HT.

Nos grupos de machos e fêmeas submetidos ao tratamento de hipotireoidismo acrescido de T₃ durante uma semana (1D) ou três semanas (3D), não foi detectada variação da expressão da Cx40 entre os diferentes genótipos (figuras 33, 35). Como mencionado anteriormente, após o início das injeções de T₃, a concentração sérica deste hormônio aumentou progressivamente, de maneira semelhante entre os genótipos em cada etapa do tratamento (figura 25; valores do T₃ em anexo – página 93). Isto significa que após os 35 dias de tratamento com PTU e MMI, assim como no término da primeira e terceira semanas de tratamento com T₃, os animais selvagens (Wt), heterozigotos e homozigotos apresentavam concentração sérica de T₃ em faixas similares para cada etapa (figura 26). No fim da terceira semana, os valores de T₃ sérico dos animais selvagens (Wt) e heterozigotos tratados alcançaram o de animais em seu estado basal, sem tratamento. Desta forma, no mesmo período, a concentração sérica de T₃ dos

homozigotos mostrou-se semelhante à de animais selvagens (Wt) e heterozigotos sem tratamento (figura 27). O fato de não existir alteração da expressão de Cx40 nos homozigotos em relação aos outros genótipos nesta condição significa que a isoforma TR β normal não é necessária para a regulação da expressão protéica da Cx40 na presença de concentrações normais de HT.

Além disso, animais selvagens e homozigotos foram comparados separadamente nos diferentes tratamentos. Foi verificado que não existe alteração na expressão protéica da Cx40 entre os animais selvagens hipotireoideos e hipotireoideos que sofreram tratamento com T₃ durante uma (1D) ou três semanas (3D) (figura 37). Isto demonstra que a expressão protéica da Cx40 não se modifica com a variação da concentração sérica de HT, o que confirma o resultado visto anteriormente no experimento com os animais selvagens (Wt) induzidos ao hipotireoidismo e hipertireoidismo. De maneira semelhante, não foi verificada alteração na expressão protéica da Cx40 entre os homozigotos hipotireoideos e hipotireoideos que sofreram tratamento com T₃ durante uma (1D) ou três semanas (3D) (figura 39). Assim, tal resultado reforça a hipótese de que, na presença de concentração sérica de T₃ baixa ou normal, o TR β não participa da regulação da expressão protéica da Cx40.

Como verificado no animal TR β KI Δ 337T, modelo que apresenta altos níveis séricos de HT, somente a associação entre a presença do TR β mutado e altas concentrações séricas de HT foi capaz de reduzir a expressão protéica da Cx40 atrial. Isto sugere que somente na condição de hipertireoidismo exista dependência de vias ativadas pelo TR β na modulação da expressão protéica da Cx40 atrial. Como o TR β KI Δ 337T é um modelo onde existe esta isoforma mutada em diversos tecidos, não podemos afirmar se este efeito é direto no tecido cardíaco ou indireto pela ação do HT em outros alvos extra-cardíacos.

Sabe-se que o hipertireoidismo está associado à hipertrofia cardíaca, porém os dados presentes na literatura estão relacionados a medidas do coração total ou somente do ventrículo. Por isso, resolvemos avaliar o peso do átrio para verificar uma possível ação do HT na regulação da estrutura deste tecido. Nos animais KS, identificamos um aumento do peso do átrio (hipertrofia) (figura 17), o que indica que a sinalização adequada do HT é necessária para manutenção da estrutura do tecido, sendo a participação dos TRs importante no processo. Alteração na quantidade e distribuição das junções tem sido freqüentemente correlacionada a doenças cardíacas, entre elas as que apresentam hipertrofia cardíaca (Teunissen & Bieruizen, 2004). O aumento da massa cardíaca não necessariamente se reflete no aumento da massa atrial, uma vez que, neste trabalho, durante o hipertireoidismo dos animais experimentais foi visualizado aumento do peso do ventrículo (**DADOS**), na ausência de alterações na massa atrial. O remodelamento atrial está geralmente associado a condições de sobrecarga de pressão e volume, por exemplo, durante uma doença de válvula mitral ou presença de fibrose atrial (Abhayaratna *et al.*, 2006). Não há evidências na literatura que comprovem a existência de sobrecarga de pressão e volume nos animais KS. Estudos clínicos têm demonstrado que os valores de diâmetro e volume atrial aumentados podem ser utilizados como preditores da primeira ocorrência e re-incidência de episódios de fibrilação atrial e infarto e ainda se associam com alta incidência de falência cardíaca e mortalidade (Abhayaratna *et al.*, 2006).

De modo interessante, os animais submetidos ao hipo- e hipertireoidismo, nos quais não houve alteração da expressão protéica da Cx40, também não foi observada alteração na massa atrial (figura 20). Isto demonstra uma regulação também precisa de forma a evitar modificações na estrutura tecidual do átrio. Como esperado, na condição de hipertireoidismo, apesar da massa atrial estar inalterada, foi verificado o efeito clássico do HT de provocar hipertrofia ventricular.

De maneira semelhante ao animal KS, nos animais KI, além da diminuição da Cx40, também verificou-se aumento da massa atrial (figura 22). Os heterozigotos e os homozigotos apresentaram aumento de 42% e 55% em comparação aos selvagens (Wt), reforçando a hipótese de que a isoforma TR β , na presença de concentrações mais elevadas de HT, participa da manutenção da estrutura atrial.

O grupo de animais KI submetidos ao hipotireoidismo pelo tratamento com PTU e MMI foi o único em que foi verificada divergência dos resultados entre os sexos, tanto para a regulação da expressão protéica da Cx40, quanto para a manutenção da estrutura do tecido atrial. Para as fêmeas homozigotas para a mutação TR β KI Δ 337T hipotireoideas, não foi observada alteração do peso do átrio entre os genótipos (figura 28), ao passo que nos machos houve 23% de aumento nos homozigotos hipotireoideos em relação aos selvagens (Wt) hipotireoideos (figura 30). Pode ser que o aumento da massa atrial esteja relacionado às condições de escassez de HT ou de sinalização comprometida deste hormônio, como acontece nos animais machos submetidos ao hipotireoidismo e nos transgênicos KS e KI. Porém, as fêmeas podem ser preservadas do desenvolvimento deste fenótipo pela presença do estrogênio ou algum outro fator exclusivo das fêmeas.

Nos grupos de animais selvagens (Wt) submetidos ao hipotireoidismo acompanhado de tratamento com T₃ durante uma semana (1D) ou três semanas (3D), não foram verificadas alterações da expressão protéica da Cx40 e da estrutura do tecido atrial (figuras 32, 34). Desta forma, parece que a isoforma TR β não se faz necessária para manutenção da estrutura tecidual do átrio na presença de concentrações de T₃ baixa e normal.

Ao compararmos animais selvagens sob os diferentes tratamentos de hipotireoidismo (Hipo) e hipotireoidismo acrescido de doses de T₃ (1D e 3D), não verificamos alteração da expressão protéica e da massa atrial (figura 36). E o mesmo foi

observado ao compararmos os homozigotos sob os diferentes tratamentos. Da mesma forma, não houve mudança na massa atrial entre esses grupos (figura 38). Tais resultados reforçam a hipótese de que, assim como a regulação da expressão protéica da Cx40, a manutenção da estrutura do tecido atrial é estritamente regulada e, aparentemente, a isoforma TR β não contribui para esta regulação na presença de concentração sérica normal de HT.

Os resultados demonstram que a regulação da estrutura do tecido atrial é dependente da sinalização do HT, atuando por seus receptores nucleares. Aparentemente, na presença de níveis normais de T₃, esta regulação depende somente da isoforma TR α , enquanto frente a escassez ou excesso de HT, a atuação da isoforma TR β se faz necessária. Em todas as condições em que não houve alteração da expressão protéica de Cx40, também não existiu mudança na massa atrial. Em 2002, Weiss e colaboradores demonstraram que os animais *knockout* para a isoforma α submetidos a tratamento com T₄ apresentam sinais de hipertrofia, enquanto que o mesmo não ocorre com animais *knockout* para a isoforma β . Este resultado sugere a importância de TR β na presença de altos níveis de HT.

Nos modelos transgênicos KS e KI, em que existe comprometimento da sinalização do T₃, foi verificado aumento do peso do átrio e diminuição da expressão da Cx40. Nos animais TR β KI Δ 337T, a combinação da presença do TR β mutante e de elevada concentração sérica de HT parece ser importante tanto para a regulação da expressão protéica da Cx40, quanto para a manutenção da estrutura atrial. Pode ser que, nessa condição o desenvolvimento desses dois eventos esteja relacionado. No entanto, o mesmo não ocorre com animais selvagens induzidos ao hipotireoidismo, em que se verifica nos machos hipertrofia atrial na ausência de alteração da expressão protéica da Cx40. Parece que, frente a escassez de HT, a manutenção da estrutura atrial depende da isoforma TR β , porém independe da diminuição da proteína Cx40.

Os animais *knockout* para Cx40 apresentam diminuição da condução entre os cardiomiócitos atriais e no sistema de condução atrioventricular, o que remete a um papel essencial desta proteína na propagação do impulso elétrico em determinadas regiões cardíacas. Por sua importância, a proteína Cx40 parece ser minuciosamente regulada por múltiplos reguladores, cardíacos e extra-cardíacos, de forma que sua expressão se mantenha praticamente inalterada, mesmo frente a variações na concentração sérica de HT. Isto foi verificado por duas vezes: (1) no experimento em que animais selvagens foram submetidos ao hipotireoidismo (Hipo) e hipotireoidismo acrescido de doses baixas de T₃ durante uma semana (1D) ou três semanas (3D), e de forma mais importante (2) no experimento em que animais selvagens foram induzidos ao hipotireoidismo (Hipo) e hipertireoidismo (Hiper). Mesmo neste último caso, em que houve administração de dose supra-fisiológica de T₃ (50µg/100g de PC), provocando um aumento relevante na concentração sérica de HT, não houve alteração da expressão protéica da Cx40.

A análise da função cardíaca dos animais KS *ex vivo* mostrou redução da função sistólica e diastólica, justificadas provavelmente pelo fenótipo hipotireoideo do tecido cardíaco. No entanto, de maneira muito interessante, os animais KS quando submetidos a teste *in vivo* apresentavam a função cardíaca preservada. Este resultado sugere que mecanismos extra-cardíacos, como mudanças no tônus autonômico, na resistência vascular e no volume sanguíneo circulante, poderiam, pelo menos em parte, compensar os defeitos cardíacos (Pazos-Moura *et al.*, 2000). Apesar de ainda não demonstrado, pode ser que tais mecanismos extra-cardíacos desempenhem algum papel na regulação da Cx40.

Sabe-se que pacientes hipertireoideos apresentam aumento da sensibilidade ao sistema adrenérgico (Klein & Ojamaa, 2001), da concentração sérica de endotelina (Chu *et al.*, 2006), e da ativação do sistema RAS (Sernia *et al.*, 1993). No entanto, estudos

com linhagens celulares mostraram que concentrações variadas de agonistas α - e β -adrenérgicos, endotelina-1 e angiotensina II não foram capazes de alterar a expressão da Cx40 (Salameh *et al.*, 2006, Polontchouk *et al.*, 2002). Pode ser que outros fatores do sistema renina-angiotensina (RAS) participem desta regulação, já que animais que superexpressam, no coração, a enzima conversora de angiotensina do tipo 2 (ECA2) apresentam diminuição da expressão protéica da Cx40 (Donoghue *et al.*, 2003).

Um fator que pode estar relacionado com a regulação da Cx40 é o TNF- α . Camundongos que superexpressam TNF- α somente no coração apresentam diminuição da expressão da Cx40 (Sawaya *et al.*, 2007). Este fator está associado a doenças cardíacas nas quais ocorrem anormalidades nas conduções atrial e ventricular e arritmias atriais e até mesmo falência cardíaca (Salameh *et al.*, 2004). E de forma muito interessante, pacientes hipertireoideos apresentam aumento da concentração sérica de TNF- α , que normaliza após diminuição dos níveis de HT até a faixa de normalidade (Díez *et al.*, 2002).

Muitos genes responsivos ao HT possuem TRE na sua região promotora e são regulados pelos TRs na presença e/ou na ausência de T₃. Estudos *in vitro* ainda devem ser realizados para descobrir se a regulação da Cx40 ocorre por interação direta do TR com a região promotora do gene, ou se acontece pela regulação de algum fator transcricional pelo complexo HT-TR que, por sua vez, é capaz de modular a expressão gênica da Cx40. Ainda não foi demonstrado a possível responsividade dos fatores transcripcionais cardíacos GATA-4, Nkx2.5 e Tbx5 ao HT.

Ao analisar parâmetros característicos da função cardíaca do animal KI não foi verificada alteração em relação aos animais selvagens (WT) e por isso, foi sugerido que o TR β não seria a principal isoforma de TR na mediação dos efeitos cardíacos do HT (Ortiga-Carvalho *et al.*, 2004). No entanto, apesar de não existir alteração de frequência cardíaca nos animais *knockout* para TR β em relação aos selvagens, quando submetidos

ao tratamento com T₃, o aumento da frequência cardíaca induzida por HT foi inferior nos animais *knockout* TR β (Johansson *et al.*, 1999). Tal fato sugere que a isoforma TR β não seja importante para o controle da frequência cardíaca na presença de concentrações séricas normais de T₃, mas que possua um papel na regulação frente a um aumento dos níveis de HT.

Nos animais heterozigotos TR β KI Δ 337T sem tratamento (em seu estado basal), apesar de não haver alteração da massa cardíaca, a resposta de hipertrofia ventricular induzida no hipertireoidismo esta diminuída (Ortiga-Carvalho *et al.*, 2004), o que corrobora a importância da isoforma TR β na presença de concentração de T₃ elevada.

O mesmo ocorre para a regulação da expressão protéica da Cx40. Apesar de não existir alteração da expressão protéica da Cx40 frente a variações da concentração sérica de T₃, foi demonstrado que o HT influencia a regulação através das isoformas de TR α e TR β , cujas participações dependem da disponibilidade de HT. Na presença de níveis de T₃ baixo e normal, a regulação da expressão protéica da Cx40 depende basicamente de TR α , ao passo que frente a níveis elevados de HT, a regulação passa a depender também de TR β . Então, aparentemente, existe uma dupla regulação pelas isoformas TR α e TR β da expressão da Cx40 atrial, que envolvem múltiplos mecanismos, possivelmente, cardíacos e extra-cardíacos.

CONCLUSÃO

O hormônio tireoideano participa da regulação da massa e da expressão protéica da Cx40 dos átrios, com a possível participação das isoformas TR α e TR β , dependendo da concentração sérica de T₃. Na presença de níveis séricos de T₃ baixo e normal, a isoforma TR α parece ser a mais importante para a regulação desses dois processos, enquanto, em condições de excesso de HT, a regulação passa a depender (também) da isoforma TR β .

ANEXO (VALORES TSH E T₃)

Tabela 3. Valores do TSH e T₃, expressos em ng/mL e ng/dL \pm erro padrão da média, respectivamente. Os números, entre parênteses ao lado de cada grupo, correspondem ao item nos resultados em que eles se encontram.

Grupos	TSH (ng/mL)	T ₃ (ng/dL)
Hipo (2)	988 \pm 123,3	-
Eu (2)	101,7 \pm 5,35	111,4 \pm 3,549
Hiper (2)	-	302,6 \pm 57,15
Wt (4)	-	52,5 \pm 10,7
Het (4)	-	84,5 \pm 9,1
Homo (4)	-	215,5 \pm 30,8
Wt Hipo (4.1)	5000	34,1 \pm 4,8
Het Hipo (4.1)	5000	43,1 \pm 6,6
Homo Hipo (4.1)	5000	40,2 \pm 3,5
Wt 1D (4.2)	168,1 \pm 32,2	66,5 \pm 9,3
Het 1D (4.2)	190,3 \pm 89	63,2 \pm 5,4
Homo 1D (4.2)	1000	68,0 \pm 11,8
Wt 3D (4.3)	61,2 \pm 7,59	70,4 \pm 3,3
Het 3D (4.3)	57,7 \pm 4,7	88,5 \pm 11,3
Homo 3D (4.3)	500	110,3 \pm 21,8

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel ED, Ahima R, Boel ME, Elmquist JK & Wondisford FE.** Critical role for thyroid hormone receptor beta2 in the regulation of paraventricular thyrotropin-releasing hormone neurons. *The Journal of Clinical Investigation* 107: 1017-1023, 2001.
- Abhayaratna WP, Seward JB, Appleton CP, Douglas PS, Oh JK, Tajik J & Tsang TSM.** Left atrial size physiologic determinants and clinical applications. *Journal of the American College of Cardiology* 47: 2357-2363, 2006.
- Almeida NAS, Matos LC, Campos-de-Carvalho AC, Pazos-Moura CC & Costa MW.** Modulação cardíaca da expressão da conexina40 por beta-estradiol em cultura primária de células atriais de rato. *XXXVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Fisiologia - SBFis & XXI Congresso da Associação Latina-Americana de Ciências Fisiológicas p. 145*, 2003.
- Almeida NAS, Cordeiro A, Machado DS, Souza LL, Ortiga-Carvalho TM, Campos-de-Carvalho AC, Wondisford FE & Pazos-Moura CC.** Connexin40 messenger ribonucleic acid is positively regulated by thyroid hormone (TH) acting in cardiac atria via the TH receptor. *Endocrinology* 150: 546-554, 2009.
- Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ & Larsen PR.** Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrine Reviews* 23: 38-89, 2002.
- Bierhuizen MFA, van Amersfoort SCM, Groenewegen A, Vliex S & Jongsma HJ.** Characterization of the rat connexin40 promoter: two Sp1/Sp3 binding sites contribute to transcriptional activation. *Cardiovascular Research* 46: 511-522, 2000.
- Bradford, M. M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976.
- Braverman LE, Ingbar SH & Sterling K.** Conversion of thyroxine (T₄) to triiodotironine (T₃) in athyreotic human subjects. *The Journal of Clinical Investigation* 49: 885-864, 1970.
- Brent GA.** Tissue-specific actions of thyroid hormone: insights from animal models. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 1: 27-33, 2000.
- Brucker-Davis F, Skarulis MC, Grace MB, Benichou J, Hauser P, Wiggs E & Weintraub BD.** Genetic and clinical features of 42 kindreds with resistance to thyroid hormone: The National Institutes of Health Prospective Study. *Annals of Internal Medicine* 123: 572-583, 1995.

- Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, Charron F, Robitaille L, Caron S, Conner DA, Gessler M, Nemer M, Seidman CE & Seidman JG.** A murine model of holt-oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell* 106: 709-721, 2001.
- Bukauskas FF & Verselis VK.** Gap junction channel gating. *Biochimica et Biophysica Acta* 1662: 42-60, 2004.
- Buroker NE, Young ME, Wei C, Serikawa K, Ge1 M, Ning XH & Portman MA.** The dominant negative thyroid hormone receptor β mutant Δ 337T alters peroxisome proliferator-activated receptor α signaling in heart. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 292(2):E453-60, 2007.
- Chard T.** An introduction to radioimmunoassay and related techniques. In *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*,. Eds RH Burdon & PH van Kinioenberg, Editora Elsevier Science, Amsterdam, p 1-74, 1987.
- Chen HH, Baty CJ, Maeda T, Brooks S, Baker LC, Ueyama T, Gursoy E, Saba S, Salama G, London B & Stewart AFR.** Transcription enhancer factor-1 related factor-transgenic mice develop cardiac conduction defects associated with altered connexin phosphorylation. *Circulation* 110: 2980-2987, 2004.
- Cheng SY.** Thyroid hormone receptor mutations and disease: beyond thyroid hormone resistance. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 16: 177-182, 2005.
- Chizzonite MA & Zak R.** Regulation of myosin isoenzyme composition in fetal and neonatal rat ventricle by endogenous thyroid hormones. *The Journal of Biological Chemistry* 259: 12628-12632, 1984.
- Chu C-H, Lee J-K, Keng H-M, Chuang M-J, Lu C-C, Wang M-C, Sun C-C, Wei M-C & Lam H-C.** Hyperthyroidism is associated with higher plasma endothelin-1 concentrations. *Experimental Biological Medicine* 231: 1040-1043, 2006.
- Cook CB, Kakucska I, Lechan RM, & Koenig RJ.** Expression of thyroid hormone receptor β 2 in rat hypothalamus. *Endocrinology* 130: 1077-1079, 1992.
- Cottrell GT & Burt JM.** Functional consequences of heterogeneous gap junction channel formation and its influence in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1711:126-141, 2005.
- D'arezzo S, Incerpi S, Davis FB, Acconcia F, Marino M, Farias RN & Davis PJ.** Rapid non-genomic effects of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on the intracellular pH of L-6 myoblasts are mediated by intracellular calcium mobilization and kinase pathways. *Endocrinology* 145: 5694-5703, 2004.
- Davis PJ & Davis FB.** Nongenomic actions of thyroid hormone on the heart. *Thyroid* 12: 459-466, 2002.

- De Felice M & Di Lauro R.** Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. *Endocrine Reviews* 25: 722-746, 2004.
- Delange F.** The disorders induced by iodine deficiency. *Thyroid* 4: 107-128, 1994.
- De La Vieja A, Dohan O, Levy O & Carrasco N.** Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology. *Physiological Reviews* 80: 1083-1105, 2000.
- Donoghue M, Wakimoto H, Maguire CT, Acton S, Hales P, Stagliano N, Fairchild-Huntress V, Xu J, Lorenz JN, Kadambi V, Berul CI & Breitbart RE.** Heart block, ventricular tachycardia, and sudden death in ACE2 transgenic mice with downregulated connexins. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 35: 1043-53, 2003.
- Dumitresco AM, Liao XH, Best TB, Brockmann & Refetoff S.** A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene. *American Journal of Human Genetics* 74: 168-175, 2004.
- Dupont E, Ko Y-S, Rothery S, Coppens S, Baghai M, Haw M & Severs NJ.** The gap-junctional protein connexin40 is elevated in patients susceptible to postoperative atrial fibrillation. *Circulation Research* 103: 842-849, 2001a.
- Dupont E, Matsushita T, Kaba R, Vozzi C, Coppens SR, Khan N, Kaprielian R, Yacoub MH, Severs NJ.** Altered connexin expression in human congestive heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 33:359-371, 2001b.
- Evans RM.** The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-895, 1988.
- Fazio S, Palmieri EA, Lombardi G & Biondi B.** Effects of thyroid hormone on the cardiovascular system. *Recent Progress in Hormone Research* 59: 31-50, 2004.
- Flamant F & Samarut J.** Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 14: 85-90, 2003.
- Fraichard A, Chassande O, Plateroti M, Roux JP, Trouillas J, Dehay C, Legrand C, Gauthier K, Kedinger M, Malaval L, Rousset B & Samarut J.** The T3R α gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production. *The EMBO Journal* 14: 4412-4420, 1997.
- Franklyn JA, Gammage MD, Ramsden DB & Sheppard MC.** Thyroid status in patients after acute myocardial infarction. *Clinical Science (London)* 67: 585-590, 1984.

- Friesema ECH, Ganguly S, Abdalla A, Fox JEM, Halestrap AP & Visser TJ.** Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 40128-40135, 2003.
- Goglia F, Moreno M & Lanni A.** Action of thyroid hormones at the cellular level: the mitochondrial target. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 452: 115-120, 1999.
- Göthe S, Wang Z, Ng Lily, Kindblom JM, Barros AC, Ohlsson C, Vennström B & Forrest D.** Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary-thyroid axis, growth, and bone maturation. *Genes & Development* 13(10): 1329-1341, 1999.
- Gourdie RG, Green CR & Severs NJ.** Gap junction distribution in the adult mammalian myocardium revealed by an anti-peptide antibody and laser scanning confocal microscopy. *Journal of Cell Science* 99, 41-55, 1991.
- Gouveia CH, Jorgetti V & Bianco AC.** Effects of thyroid hormone administration and estrogen deficiency on bone mass of female rats. *Journal of Bone and Mineral Research* 12: 2098-2107, 1997.
- Gross J & Pitt-Rivers R.** Triiodotironine in relation to thyroid physiology. *Recent Progress in Hormone Research* 10: 109-128, 1954.
- Gustein DE, Morley GE, Tamaddo H, Vaidya D, Schneider MD, Chen J, Chien KR, Stuhlmann H & Fishman GI.** Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin43. *Circulation Research* 88: 333-339, 2001.
- Hadow JE, Palomaki GE, Allan WC, Williams JR, Knight GJ, Gagnon J, D'Heir CE, Mitchell ML, Hermos RJ, Waisbren SE, Faix JD & Klein RZ.** Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. *New England Journal of Medicine* 341: 549-555, 1999.
- Hashimoto K, Cohen RN, Yamada M, Markan KR, Monden T, Satoh T, Mori M, & Wondisford FE.** Cross-talk between thyroid hormone receptor and liver X receptor regulatory pathways is revealed in a thyroid hormone resistance mouse model. *The Journal of Biological Chemistry* 281(1): 295-302, 2006.
- Hashimoto K, Curty FH, Borges PP, Lee CE, Abel ED, Elmquist JK, Cohen RN & Wondisford FE.** An unliganded thyroid hormone receptor causes severe neurological dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 3998-4003, 2001.
- Hernandez A.** Structure and function of the type 3 deiodinase gene. *Thyroid* 15: 865-874, 2005
- Hervé J-C.** The connexins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1662: 1-2, 2004.

- Hervé JC, Bourmeyster N & Sarrouilhe D.** Diversity in protein-protein interactions of connexins: emerging roles. *Biochimica et Biophysica Acta 1662*: 22-41, 2004.
- Hodin RA, Lazar MA, Wintman BI, Darling DS, Koenig RJ, Larsen PR, Moore DD & Chin WW.** Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science 244*: 76-79, 1989.
- Hollenberg AN, Monden T, Rynn TR, Boers M-E, Cohen O & Wondisford FE.** The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. *Molecular Endocrinology 9*: 540-550, 1995.
- Hu X & Lazar MA.** Transcriptional repression by nuclear hormone receptors. *Trends in Endocrinology and Metabolism 11*: 6-10, 2000.
- Johansson C, Göthe S, Forrest D, Vennström B, & Thorén P.** Cardiovascular phenotype and temperature control in mice lacking thyroid hormone receptor- β or both $\alpha 1$ and β . *American Journal of Physiology 276 (Heart Circ. Physiol. 45)*: H2006-H2012, 1999.
- Kaneshige M, Kaneshige K, Zhu X-g, Dace A, Garrett L, Carter TA, Kazlauskaitė R, Pankratz DG, Wynshaw-Boris A, Refetoff S, Weintraub B, Willingham MC, Barlow C & Cheng S-y.** Mice with a targeted mutation in the thyroid hormone β receptor gene exhibit impaired growth and resistance to thyroid hormone. *PNAS 97*: 13209-13214, 2000.
- Kaneshige M, Suzuki H, Kaneshige K, Cheng J, Wimbrow H, Barlow C, Willingham MC & Cheng S-y.** A targeted dominant negative mutation of the thyroid hormone $\alpha 1$ receptor causes increase mortality, infertility, and dwarfism in mice. *PNAS 98*: 15095-15100, 2001.
- Kasahara H, Wakimoto H, Liu M, Maguire CT, Converso KL, Shioi T, Huang W-Y, Manning WJ, Paul D, Lawitts J, Berul CI & Izumo S.** Progressive atrioventricular conduction defects and heart failure in mice expressing a mutant Csx/Nkx2.5 homeoprotein. *The Journal of Clinical Investigation 108*: 189-201, 2001.
- Kendall EC.** The isolation in crystalline form of the compound containing iodine which occurs in the thyroid: its chemical nature and physiological activity. *The Journal of American Medical Association 30*: 420-449, 1915.
- Klein I & Ojamaa K.** Thyroid hormone and the cardiovascular system. *New England Journal of Medicine 334*: 501-509, 2001.
- Kirchhoff S, Nelles E, Hagendorff A, Krüger O, Traub O & Willecke K.** Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice. *Current Biology 8*: 299-302, 1998.

- Krüger O, Plum A, Kim J-S, Winterhager E, Maxeiner S, Hallas G, Kirchhoff S, Traub O, Lamers WH & Willecke K.** Defective vascular development in connexin45-deficient mice. *Development* 127: 4179-4193, 2000.
- Laird DW.** Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to internalization and degradation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1711: 172-182, 2005.
- Lazar MA.** Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocrine Reviews* 14: 184-193, 1993.
- Lazar MA.** Thyroid hormone action: a binding contract. *The Journal of Clinical Investigation* 112: 497-499, 2003.
- Le Bouter S, Demolombe S, Chambellan A, Bellocq C, Aimond F, Toumaniantz G, Lande G, Siavoshian S, Baró I, Pond AL, Nerbonne JM, Léger JJ, Escande D e Charpentier F.** Microarray analysis reveals complex remodeling of cardiac ion channel expression with altered thyroid status: relation to cellular and integrated electrophysiology. *Circulation Research* 92: 234-242, 2003.
- Linhares VLF, Almeida NAS, Menezes DC, Elliott DA, Lai D, Beyer EC, Campos de Crvalho AC & Costa MW.** Transcriptional regulation of the murine *Connexin40* promoter by cardiac factor *Nkx2.5*, *GATA4* and *Tbx5*. *Cardiovascular Research* 64: 402-411, 2004.
- Lombardi A, Lanni A, Moreno M, Brand MD & Goglia F.** Effect of 3,5-di-L-iodothyronine on the mitochondrial energy-transduction apparatus. *The Biochemical Journal* 330: 521-526, 1998.
- Lompré AM, Nadal-Ginard B & Mahdavi V.** Expression of the cardiac ventricular α - and β -myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *The Journal of Biological Chemistry* 259: 6437-6442, 1984.
- Maia AL, Kim BW, Huang SA, Harney JW & Larsen R.** Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T_3 in euthyroid humans. *The Journal of Clinical Investigation* 115: 2524-2533, 2005.
- Mansouri A, Chowdhury K & Gruss P.** Follicular cells of the thyroid gland require *Pax8* gene function. *Nature Genetics* 19: 87-90, 1998.
- Mangelsdorf DJ & Evans RM.** The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83: 841-850, 1995.
- Mauchamp J, Mirrione A, Alquier C & Andre F.** Follicle-like structure and polarized monolayer: role of the extracellular matrix on thyroid cell organization in primary culture. *Biology of the Cell* 90: 369-380, 1998.
- McKenna NJ, Lanz RB & O'Malley BW.** Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine Reviews* 20: 321-344, 1999.

- Moller N, Nielsen S, Nyholm B, Porksen N, Alberti KG & Weeke J.** Glucose turnover, fuel oxidation and forearm substrate exchange in patients with thyrotoxicosis before and after medical treatment. *Clinical Endocrinology* 44: 453-459, 1996.
- Moreno AP.** Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to channel gating. *Biochimica et Biophysica Acta* 1711: 164-171, 2005.
- Nguyễn-Trân VTB, Kubalak SW, Minamisawa S, Fiset C, Wollert KC, Brown AB, Ruiz-Lozano P, Barrere-Lemaire S, Kondo R, Norman LW, Gourdie RG, Rahmen MM, Feld GK, Clark RB, Giles WR & Chien KR.** A novel genetic pathway for sudden cardiac death via defects in the transition between ventricular and conduction system cell lineages. *Cell* 102: 671-682, 2000.
- Ojamaa K, Klemperer JD & Klein I.** Acute effects of thyroid hormone on vascular smooth muscle. *Thyroid* 6: 505-512, 1996.
- Olivares EL, Marassi MP, Fortunato RS, da Silva ACM, Costa-e-Souza RH, Araújo IG, Mattos EC, Masuda MO, Mulcahey MA, Huang SA, Bianco AC & Carvalho DP.** Thyroid function disturbance and type 3 iodothyronine deiodinase induction after myocardial infarction in rats – a time course study. *Endocrinology* 148: 4786-4792, 2007.
- Oliveira KJ, Ortiga-Carvalho TM, Cabanelas A, Veiga MALC, Aoki K, Ohki-Hamazaki H, Wada K, Wada E & Pazos-Moura CC.** Disruption of neuromedin B receptor gene results in dysregulation of the pituitary-thyroid axis. *Journal of Molecular Endocrinology* 36:73-80, 2006.
- Oppenheimer JH & Schwartz HL.** Molecular basis of thyroid hormone-dependent brain development. *Endocrine Reviews* 18: 462-475, 1997.
- Ortiga-Carvalho TM, Hashimoto K, Pazos-Moura CC, Geenen D, Cohen R, Lang RM & Wondisford FE.** Thyroid hormone resistance in the heart: role of the thyroid hormone receptor β isoform. *Endocrinology* 145: 1625-1633, 2004.
- O'Shea PJ & Williams GR.** Insight into the physiological actions of thyroid hormone receptors from genetically modified mice. *Journal of Endocrinology* 175: 553-570, 2002.
- Pazos-Moura C, Abel ED, Boers ME, Moura E, Hampton TG, Wang J, Morgan JP & Wondisford FE.** Cardiac dysfunction caused by miocardium-specific expression of a mutant thyroid hormone receptor. *Circulation Research* 86: 700-706, 2000.
- Peracchia C.** Chemical gating of gap junction channels - Roles of calcium, pH and calmodulin. *Biochimica et Biophysica* 1662: 61-80, 2004.
- Pessôa CN, Santiago LA, Santiago DA, Machado DS, Rocha FA, Ventura DF, Hokoc JN, Pazos-Moura CC, Wondisford FE, Gardino PF & Ortiga-Carvalho**

TM. Thyroid hormone action is required for normal cone opsin expression during mouse retinal development. *Investigative and Ophthalmology Visual Science* 49: 2039-2045, 2008.

Pfahl M. Nuclear receptor/ AP1 Interaction. *Endocrine Reviews* 14: 651-658, 1993.

Pino-García JM, García-Río F, Díez JJ, Gómez-Mendieta MA, Racionero MA, Díaz-Lobato S & Villamor. Regulation of breathing in hyperthyroidism: relationship to hormonal and metabolic changes. *The European Respiration Journal* 12: 400-407, 1998.

Polak JM, Pearse AG, Le Lièvre C, Fontaine J & Le Douarin NM. Immunocytochemical confirmation of the neural crest origin of avian calcitonin-producing cells. *Histochemistry* 40: 209-214, 1974

Polontchouk L, Haefliger JA, Ebelt B, Schaefer T, Stuhlmann D, Mehlhorn U, Kuhn-Regnier F, De Vivie ER & Dhein S. Effects of chronic atrial fibrillation on gap junction distribution in human and rat atria. *Journal of the American College Cardiology* 38: 883-891, 2001.

Polontchouk L, Ebelt B, Jackels M & Dhein S. Chronic effects of endothelin-1 and angiotensin-II on gap junctions and intercellular communication in cardiac cells. *The FASEB Journal* 16: 87-89, 2002.

Popovic WJ, Brown JE & Adamson JW. The influence of thyroid hormones on in vitro erythropoiesis. *The Journal of Clinical Investigation* 60: 907-913, 1977.

Reed TD, Babu GJ, Ji Y, Zilberman A, Ver Heyen M, Wuytack F & Periasamy M. The expression of SR calcium transport ATPase and the Na(+)/Ca(2+) exchanger are antithetically regulated during mouse cardiac development and in hypo/hyperthyroidism. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 32: 453-464, 2000.

Sáez JC, Berthoud VM, Brañes MC, Martínez AD & Beyer EC. Membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiological Reviews* 83: 1359-1400, 2003.

Safer JD, Cohen RN, Hollenberg NA & Wondisford FE. Defective release of corepressor by hinge mutants of the thyroid hormone receptor found in patients with resistance to thyroid hormone. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 30175-30182, 1998.

Salameh A, Frenzel C, Boldt A, Rassler B, Glawe I, Schulte J, Mühlberg K, Zimmer H-G, Pfeiffer D & Dhein S. Subchronic alpha- and beta-adrenergic regulation of cardiac gap junction protein expression. *The FASEB Journal* 20: 365-367, 2006.

Sambrook, J; Fritsch, EF & Maniatis, T. Molecular Cloning – A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory (editors) 2th ed. Vol. 1, p E.5*, 1989

Santiago, Letícia Aragão. Estudo da homeostase glicêmica em modelo de camundongo com mutação delta 337T no gene do receptor para hormônio tireoideano beta. *Tese de Mestrado* defendida na Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

Sawaya SE, Rajawat YS, Rami TG, Szalai G, Price RL, Sivasubramanian N, Mann DL & Houry DS. Downregulation of connexin40 and increased prevalence of atrial arrhythmias in transgenic mice with cardiac-restricted overexpression of tumour necrosis factor. *American Journal of Physiology* 292: 1561-1567, 2007.

Schussler GC. The tyroxine-binding proteins. *Thyroid* 10: 141-149, 2000.

Segretain D & Falk MM. Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochimica et Biophysica Acta* 1662: 3-21, 2004

Sernia C, Marchant C, Brown L & Hoey A. Cardiac angiotensin receptors in experimental hyperthyroidism in dogs. *Cardiovascular Research* 27: 423-428, 1993.

Seul KH, Tadros PN & Beyer EC. Mouse connexin40: gene structure and promoter analysis. *Genomics* 46: 120-126, 1997.

Severs NJ, Dupont E, Coppin SR, Halliday D, Inett E, Baylis D & Rothery S. Remodelling of gap junctions and connexin expression in heart disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1662: 138-148, 2004.

Shibusawa N, Hollenberg AN & Wondisford FE. Thyroid hormone receptor DNA binding is required for both positive and negative gene regulation. *Journal of Biological Chemistry* 278: 732-738, 2003.

Simon AM, Goodenough DA, Li E & Paul DL. Mice lacking connexin40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block. *Current Biology* 8: 295-298, 1998.

Smith CL & O'Malley BW. Coregulator function: a key to understand tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocrine Reviews* 25: 45-71, 2004.

Solan JL & Lampe PD. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly. *Biochimica et Biophysica Acta* 1711: 154-163, 2005.

Sosinsky GE & Nicholson BJ. Structural organization of gap junction channels. *Biochimica et Biophysica Acta* 1711: 99-125, 2005.

Storey NM, Gentile S, Ullah H, Russo A, Muessel M, Erxleben C & Armstrong DL. Rapid signaling at the plasma membrane by a nuclear receptor for thyroid hormone. *PNAS* 103: 5197-5201, 2006.

- Stoykov I, Zandieh-Doulabi B, Moorman AFM, Christoffels V, Wiersinga WM & Bakker O.** Expression pattern and ontogenesis of thyroid hormone receptor isoforms in the mouse heart. *Journal of Endocrinology* 189: 231-245, 2006.
- Sullivan R, Huang GY, Meyer RA, Wessels A, Linask KK & Lo CW.** Heart malformations in transgenic mice exhibiting dominant negative inhibition of gap junctional communication in neural crest cells. *Developmental Biology* 204: 224-234, 1998.
- Swanson EA, Gloss B, Belke DD, Kaneshige M, Cheng S-Y & Dillmann WH.** Cardiac expression and function of thyroid hormone receptor β and its PV mutant. *Endocrinology* 144: 4820-4825, 2003.
- Tagami T, Madison LD, Nagaya T & Jameson JL.** Nuclear receptors corepressors activate rather than suppress basal transcription of genes that are negatively regulated by thyroid hormone. *Molecular and Cellular Biology* 17: 2642-2648, 1997.
- Teunissen BEJ, van Amersfoorth SCM, Opthof T, Jongsma HJ & Bierhuizen MFA.** Sp1 and Sp3 activate the rat connexin40 proximal promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 292: 71-78, 2002.
- Teunissen BEJ & Bierhuizen MFA.** Transcriptional control of myocardial connexins. *Cardiovascular Research* 62: 246-255, 2004.
- Thomas SA, Schuessler , Berul CI, Beardslee MA, Beyer EC, Mendelsohn ME & Saffitz JE.** Disparate effects of deficient expression of connexin43 on atrial and ventricular conduction. *Circulation* 97: 686-691, 1998.
- Thompson CC, Weinberger C, Lebo R & Evans RM.** Identification of a novel thyroid hormone receptor expressed in the mammalian central nervous system. *Science* 237: 1610-1614, 1987.
- Thorpe-Beeston JG, Nicolaides KH, Felton CV, Butler J & McGregor AM.** Maturation of the secretion of thyroid hormone and thyroid-stimulating hormone in the fetus. *The New England Journal of Medicine* 324: 532-536, 1991.
- Tolmachov O, Ma Y-L, Themis M, Patel P, Spohr H, MacLeod KT, Ullrich ND, Kienast Y, Coutelle C & Peters NS.** Overexpression of connexin43 using a retroviral vector improves electrical coupling of skeletal myoblasts with cardiac myocytes in vitro. *Biomedical Central Cardiovascular Disorders* 6: 25, 2006.
- Usala SJ, Menke JB, Watson TL, Wondisford FE, Weintraub BD, Berard J, Bradley WE, Ono S, Mueller OT, Bercu BB.** A homozygous deletion in the c-erbA beta thyroid hormone receptor gene in patient with generalized thyroid hormone resistance: isolation and characterization of the mutant receptor. *Molecular Endocrinology* 5: 327-335, 1991.

- Van Rijen HVM, van Veen TAB, Hermans MMP & Jongsma HJ.** Human connexin40 gap junction channels are modulated by cAMP. *Cardiovascular Research* 45: 941-951, 2000.
- Verheule S, van Batenburg CA, Coenjaerts FE, Kirchhoff S, Willecke K & Jongsma HJ.** Cardiac conduction abnormalities in mice lacking the gap junction protein connexin40. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 10 (10): 1380-1389, 1999.
- Wagner MS, Morimoto R, Dora JM, Benneman A, Pavan R & Maia AL.** Hypothyroidism induces type 2 iodothyronine deiodinase expression in mouse heart and testis. *Journal of Molecular Endocrinology* 31: 541-550, 2003.
- Warn-Cramer BJ & Lau AF.** Regulation of gap junctions by tyrosine protein kinases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1662:81-95, 2004.
- Weinberger C, Thompson CC, Ong ES, Lebo R, Gruol DJ, & Evans RM.** The *erb-A* gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* 324: 641-646, 1986.
- Weiss RE, Forrest D, Pohlenz J, Cua K, Curran T & Refetoff S.** Thyrotropin regulation by thyroid hormone in thyroid hormone beta-deficient mice. *Endocrinology* 138: 3624-3629, 1997.
- Weiss RE, Korcarz C, Chassande O, Cua K, Sadow PM, Koo E, Samarut J & Lang R** Thyroid hormone and cardiac function in mice deficient in thyroid hormone receptor α or β : an echocardiograph study. *American Journal Physiology. Endocrinology and Metabolism* 283: E428-E435, 2002.
- Wikström L, Johansson C, Saltó C, Barlow C, Barros Ac, Baas F, Forrest D, Thorén P, & Vennström B.** Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor $\alpha 1$. *The EMBO Journal* 17: 455-461, 1998.
- Williams GR, Bland R & Sheppard MC.** Characterization of thyroid hormone (T_3) receptors in three osteosarcoma cell lines of distinct osteoblast phenotype: interactions among T_3 , vitamin D_3 , and retinoid signaling. *Endocrinology* 135: 2375-2385, 1994.
- Williams GR.** Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor β isoforms. *Molecular and Cellular Biology* 20: 8329-8342, 2000.
- Wondisford FE, Farr EA, Radovick S, Steinfelder HJ, Moates JM, McClaskey JH & Weintraub BD.** Thyroid hormone inhibition of human thyrotropin β -subunit gene expression is mediated by a cis-acting element located in the first exon. *Journal of Biological Chemistry* 264: 14601-14601, 1989.
- Yen PM & Chin WW.** Molecular mechanisms of dominant negative activity by nuclear hormone receptors. *Molecular Endocrinology* 11: 1450-1454, 1994.

Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological Reviews* 81: 1097-1142, 2001.

Yen PM. Molecular basis of resistance to thyroid hormone. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 14: 327-333, 2003.

Yonemoto T, Nishikawa M, Matsubara H, Mori Y, Toyoda N, Gondou A, Imai Y, Iwasaka T & Inada M. Type 1 iodothyronine deiodinase in heart – effects of triiodothyronine and angiotensin II on its activity and mRNA in cultured rat myocytes. *Endocrine Journal* 46: 621-628, 1999.

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](#)