

Resposta Vascular da Triiodotironina sobre Anéis de Aortas Isoladas: Contribuição de Mecanismos Redox

Vascular Response of Triiodothyronine on Isolated Aortic Rings: Contribution of Redox Mechanisms

Viviane Cristina Pederiva,¹ Alexandre de Castro,¹ Adriane Belló-Klein,¹ Alex Sander da Rosa Araujo,¹  Patrick Turck¹ 
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Departamento de Fisiologia, Laboratório de Fisiologia Cardiovascular,¹ Porto Alegre, RS – Brasil

Resumo

Fundamento: A disfunção vascular constitui a etiologia de diversas doenças, incluindo infarto do miocárdio e hipertensão, diante da ruptura da homeostase oxi-redutiva (“redox”), desempenhando um papel no desequilíbrio do mecanismo de controle vasomotor. Nosso grupo demonstrou anteriormente que os hormônios tireoidianos melhoram a sinalização da angiogênese, exercendo efeitos protetores sobre o tecido aórtico de ratos infartados.

Objetivos: Investigar o papel da triiodotironina (T3) na resposta vascular, explorando seus efeitos em aortas isoladas e a presença de mecanismos redox vasculares.

Métodos: Anéis aórticos isolados (endotélio intacto e desnudado) pré-contraídos com fenilefrina foram incubados com T3 (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} M) e a tensão foi registrada usando um transdutor de deslocamento de força acoplado a um sistema de coleta. Para avaliar o envolvimento do estresse oxidativo, os anéis aórticos foram pré-incubados com T3 e posteriormente submetidos a um sistema de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) *in vitro*. O nível de significância adotado na análise estatística foi de 5%.

Resultados: A T3 (10^{-4} M) promoveu o vasorrelaxamento dos anéis aórticos pré-contraídos com fenilefrina em endotélio intacto e desnudado. Os anéis aórticos pré-incubados na presença de T3 (10^{-4} M) também mostraram diminuição da vasoconstrição provocada pela fenilefrina (1 μ M) em preparações de endotélio intacto. Além disso, o efeito vasorrelaxante da T3 (10^{-4} M) persistiu em anéis aórticos pré-incubados com éster metílico de N^o-nitro-L-arginina (L-NAME, 10 μ M), um inibidor inespecífico da NO sintase (NOS). Por fim, a T3 (10^{-4} M) exibiu, *in vitro*, um papel antioxidante ao reduzir a atividade da NADPH oxidase e aumentar a atividade da SOD nos homogenatos aórticos.

Conclusão: A T3 exerce efeitos dependentes e independentes de endotélio, o que pode estar relacionado ao seu papel na manutenção da homeostase redox.

Palavras-chave: Tri-Iodotironina; Hormônios Tireóideos; Aorta; Homeostase.

Abstract

Background: Vascular dysfunction constitutes the etiology of many diseases, such as myocardial infarction and hypertension, with the disruption of redox homeostasis playing a role in the imbalance of the vasomotor control mechanism. Our group previously has shown that thyroid hormones exert protective effects on the aortic tissue of infarcted rats by improving angiogenesis signaling.

Objective: Investigate the role of triiodothyronine (T3) on vascular response, exploring its effects on isolated aortas and whether there is an involvement of vascular redox mechanisms.

Methods: Isolated aortic rings (intact- and denuded-endothelium) precontracted with phenylephrine were incubated with T3 (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , and 10^{-4} M), and tension was recorded using a force-displacement transducer coupled with an acquisition system. To assess the involvement of oxidative stress, aortic rings were preincubated with T3 and subsequently submitted to an *in vitro* reactive oxygen species (ROS) generation system. The level of significance adopted in the statistical analysis was 5%.

Results: T3 (10^{-4} M) promoted vasorelaxation of phenylephrine precontracted aortic rings in both intact- and denuded-endothelium conditions. Aortic rings preincubated in the presence of T3 (10^{-4} M) also showed decreased vasoconstriction elicited by phenylephrine (1 μ M) in intact-endothelium preparations. Moreover, T3 (10^{-4} M) vasorelaxation effect persisted in aortic rings preincubated with N^o-nitro-L-arginine methylester (L-NAME, 10 μ M), a nonspecific NO synthase (NOS) inhibitor. Finally, T3 (10^{-4} M) exhibited, *in vitro*, an antioxidant role by reducing NADPH oxidase activity and increasing SOD activity in the aorta's homogenates.

Correspondência: Patrick Turck •

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Sarmento Leite, 500. CEP 90050-170, Porto Alegre, RS - Brasil

E-mail: p.turck@gmail.com

Artigo recebido em 13/04/2023, revisado em 28/10/2023, aceito em 18/01/2024

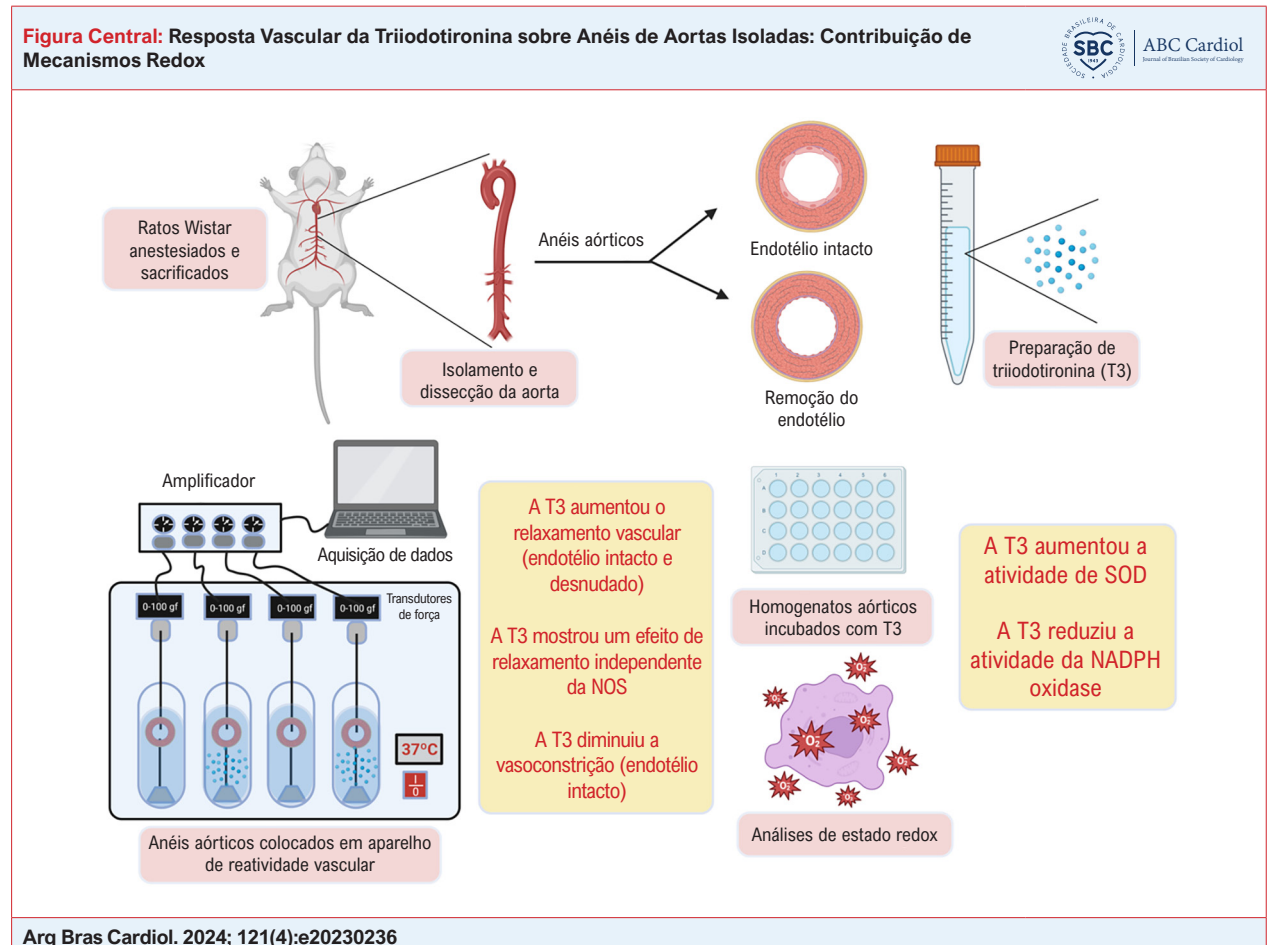
Editor responsável pela revisão: Marina Okoshi

DOI: <https://doi.org/10.36660/abc.20230236>

Conclusion: T3 exerts dependent- and independent-endothelium vasodilation effects, which may be related to its role in maintaining redox homeostasis.

Keywords: Triiodothyronine; Thyroid Hormones; Aorta; Homeostasis.

Full texts in English - <https://abccardiol.org/en/>



A triiodotironina exerce um relaxamento vascular endotelial dependente e independente e diminui a vasoconstrição de anéis aórticos isolados, melhorando a homeostase redox vascular.

Introdução

Em doenças cardíacas e cerebrais, alterações significativas são observadas nos mecanismos de relaxamento vascular, resultando na diminuição do fluxo sanguíneo, a qual é frequentemente associada a eventos isquêmicos.¹ Condições como hipertensão arterial sistêmica, infarto do miocárdio, hipertensão pulmonar e acidente vascular cerebral são alguns dos exemplos de lesões vasculares vinculadas à vasoconstrição e comprometimento do sistema circulatório.² A resposta exacerbada às catecolaminas, mediadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio (ROS) desempenham um papel crucial na disfunção endotelial.³ Nesse contexto, o estresse oxidativo assume uma importância significativa, visto que as ROS induzem vasoconstrição e efeitos adversos no remodelamento vascular.⁴ Adicionalmente, o aumento do tônus vascular gera maior resistência ao fluxo sanguíneo,

resultando em tensão de cisalhamento. Esta condição exerce efeitos críticos sobre a homeostase endotelial, causando produção elevada de ROS. Diversas fontes celulares podem promover a formação de ROS, como mitocôndrias, retículo endoplasmático e peroxissomos. Além disso, enzimas como a xantina oxidase e a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase/Nox) também têm a capacidade de sintetizar essas espécies químicas.⁵

A NADPH oxidase é a principal enzima sintetizadora do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) nos vasos.⁶ A molécula de $O_2^{\cdot-}$ pode ser convertida em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em uma reação catalisada pela superóxido dismutase (SOD). A partir dessa perspectiva, o H_2O_2 desempenha um papel duplo, sendo capaz de não somente produzir vasodilatação nas artérias cerebrais, coronárias e pulmonares,⁷ como também de atuar como vasoconstritor relevante nas artérias

periféricas e na aorta.⁸ Além disso, o $O_2^{\cdot-}$ combina-se ao óxido nítrico (NO), resultando na formação de peroxinitrito ($ONOO^-$).⁹ O $ONOO^-$ é um potente agente oxidante de membranas biológicas, capaz de induzir a morte celular. Assim, encontrar abordagens terapêuticas que combinem ações vasodilatadoras e antioxidantes é importante para o tratamento de doenças vasculares.¹⁰

Os hormônios tireoidianos (TH) demonstraram promover efeitos cardioprotetores e vasoprotetores em modelos experimentais de doenças cardíacas. No modelo de infarto, o TH não apenas melhorou o remodelamento cardíaco adverso pós-infarto, como também apresentou ação antioxidante sobre o tecido cardíaco e vascular^{11,12} além de melhorar a expressão de proteínas de angiogênese, como o fator 1α induzível por hipóxia (HIF- 1α) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).¹² Além disso, a T3 induz o vasorrelaxamento por meio de diferentes mecanismos. Em um modelo experimental de dieta com sobrecarga de sal, os vasos incubados com T3 aumentaram sua vasodilatação e diminuíram a produção de ROS.¹³ Elevação dos níveis de NO e a ativação das vias da proteína quinase G (PKG)/fosfoproteína estimulada por vasodilatador (VASP) e fosfoinosítídeo-3-quinase (PI3K)/proteína quinase B (AKT) parecem ser o principal processo pelo qual o TH promove o vasorrelaxamento.¹⁴ No entanto, a T3 também exerce sua função vasodilatadora de maneira independente do endotélio, sugerindo uma ação direta do TH sobre as células musculares lisas.¹⁵

Apesar de estudos demonstrarem ação protetora do TH no coração e nos vasos,^{11,12} ainda se faz necessário elucidar o papel da T3 sobre o tônus vascular e sobre o estresse oxidativo nos vasos. Assim, é necessário explorar ainda mais o mecanismo vasodilatador da T3 e o impacto das ROS neste processo. Para tanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o impacto da T3 sobre a resposta vascular em vasos isolados quanto à influência do endotélio e o envolvimento dos parâmetros de estresse oxidativo neste contexto.

Métodos

Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos com 45 dias de idade (pesando 202 ± 25 g) ($N = 60$), provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório. Os animais foram alocados em condições padrão de biotério: ambiente com temperatura controlada (21 ± 2 °C), ciclo claro-escuro de 12 horas e umidade relativa de 70%; ofereceu-se água e ração padrão para roedores "ad libitum". Os animais também foram aclimatados durante sete dias antes do início do protocolo experimental. Todos os procedimentos deste estudo estavam de acordo com as diretrizes para Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais do Conselho de Organizações Internacionais de Ciência Médica (CIOMS) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (número do protocolo: 38964).

Cálculo do tamanho da amostra

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado utilizando o software G*Power 3.1.9.2 (Schleswig-Holstein, Alemanha).

Foram consideradas probabilidade de erro $\alpha = 0,05$, poder de teste estatístico = 0,80 e tamanho do efeito = 0,4.

Preparação dos vasos para a reatividade vascular

Os ratos foram anestesiados com cetamina (90 mg/kg, intraperitoneal) e xilazina (10 mg/kg, intraperitoneal) simultaneamente e sacrificados por decapitação. Após a eutanásia, as aortas foram rapidamente isoladas e mantidas em solução tampão Krebs-Henseleit (NaCl 115 mM, $CaCl_2$ 2,5 mM, KCl 4,6 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 1,2 mM, $NaHCO_3$ 25 mM, dextrose 11,1 mM, Na_2EDTA 3 mM), a 37 °C e pH 7,4, sob 95% O_2 -5% CO_2 . Os tecidos adiposo e conjuntivo foram cuidadosamente removidos e as aortas foram cortadas em segmentos cilíndricos de 4 mm de comprimento. Em alguns experimentos, o endotélio foi removido mecanicamente, esfregando-se suavemente a superfície interna dos segmentos da aorta com um fio de aço inoxidável. Dois ganchos de fio de aço inoxidável dobrados em um formato de L modificado foram utilizados para montar cada anel em câmaras de banho de órgãos (AVS Projetos, São Carlos, SP, Brasil). A porção curta e reta de cada gancho foi passada através do lúmen do anel. O gancho inferior foi preso à base da câmara de órgão preenchida com 10 mL de solução tampão Krebs-Henseleit e o gancho superior a um extensômetro. A tensão isométrica foi registrada por meio de um transdutor de deslocamento de força (TIM-100; AVS Projetos, São Carlos, SP, Brasil) conectado a um sistema de coleta (AQCAD 2.0.5; AVS Projetos, São Carlos, SP, Brasil). Os segmentos foram submetidos a uma tensão basal de 1,0 gf, ajustada a cada 15 minutos durante um período inicial de equilíbrio de 45 minutos.

A integridade do endotélio foi verificada pela incubação com acetilcolina (10 μ M). Um relaxamento igual ou superior a 90% da contração máxima induzida pela fenilefrina (1 μ M) foi considerado demonstrativo da integridade funcional do endotélio. Cada anel foi lavado sequencialmente com solução tampão de Krebs-Henseleit, reequilibrado por 45 minutos, e as tensões basais foram registradas.

Estudos da reatividade vascular

O protocolo de incubação experimental é representado da seguinte forma: a) verificação de uma curva dose-resposta de T3 (10^{-8} a 10^{-4} M) em segmentos aórticos com endotélio intacto e desnudado, pré-contraídos com fenilefrina 1 μ M; b) pré-exposição de vasos com endotélio intacto e desnudado a T3 (10^{-4} M), para mostrar a menor resposta contrátil induzida pela fenilefrina; c) verificação da T3 (10^{-4} M) em segmentos aórticos com endotélio intacto pré-contraídos com fenilefrina 1 μ M e expostos a um inibidor inespecífico da NO sintase (NOS), éster metílico de NG-nitro-L-arginina (L-NAME; 10 μ M) por 20 minutos. A T3 foi diluída em tampão de Krebs-Henseleit e as soluções foram preparadas diariamente, ao abrigo da luz. O grupo controle consistiu na adição dos mesmos volumes de solução tampão de Krebs-Henseleit, sem T3.

Preparação da aorta para ensaios in vitro

As aortas foram homogeneizadas por 40 segundos (OMNI Tissue Homogenizer, OMNI International, Kennesaw, GA,

EUA) na presença de tampão de RIPA a 1:10 (5 ml/g de tecido) com fluoreto fenil-metil-sulfonil (PMSF) (100 mM) a 1 % (v/v). O homogenato foi centrifugado por 10 min a 8.000 xg em centrífuga refrigerada (4 °C) (Sorvall RC 5B – Rotor SM 24, Sorvall, Waltham, MA, EUA) e o sobrenadante foi coletado para análise subsequente.

Sistema de geração de radical hidroxila

Para verificar o papel da T3 no equilíbrio redox, os sobrenadantes homogeneizados da aorta foram incubados com T3 (10^{-4} M) por 15 min a 37 °C. O grupo que não recebeu T3 foi incubado com água destilada no mesmo volume. Em seguida, as amostras foram incubadas por 30 min a 37 °C com FeCl_2 (20 μM), H_2O_2 (50 mM) e ácido ascórbico (1 mM) para induzir estresse oxidativo (sistema de geração de radical hidroxila).¹⁶ Essas amostras foram utilizadas para avaliação bioquímica

Análises bioquímicas

Dosagem de proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry et al.¹⁷ e medidas em espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200 rt, Biochrom, Cambridge, Reino Unido) a 625 nm. Os resultados foram expressos em mg/mL.

Determinação do total de ROS

Os níveis totais de ROS nos homogenatos de vasos foram detectados usando diacetato de 2',7'-dicloro-dihidrofluoresceína (DCFH-DA), conforme descrito anteriormente.¹⁸ O DCFH-DA foi oxidado em 2,7-diclorofluoresceína fluorescente (DCF) na presença de ROS. As amostras foram excitadas a 488 nm e as emissões foram coletadas com um filtro de 525 nm (Espectrômetro de Fluorescência LS 55, Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA). Os resultados foram expressos em nmol DCF/mg de proteína.

Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi avaliada por meio da produção de quimiluminescência iniciada pela adição de hidróxido de terc-butila (TBOOH).¹⁹ A quimiluminescência foi medida em um espectrômetro de cintilação (LKB Wallac Rack Beta Liquid Scintilla Spectrometer 1215, Austrália) operando como luminômetro e com fototubo sensor de emissão na faixa de 380–620 nm. Os resultados foram expressos como contagens por segundo cps/mg de proteína.

Atividade da NADPH Oxidase

A atividade da NADPH oxidase foi baseada no monitoramento do consumo de NADPH a 340 nm (Anthos Zenyth 200 rt, Biochrom, Cambridge, Reino Unido). Os resultados foram expressos como nmol NADPH/min/mg de proteína.²⁰

Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A determinação da atividade da SOD foi baseada na inibição da reação do ânion radical superóxido com o

pirogalol.²¹ Os resultados foram expressos como U SOD/mg de proteína.

Atividade da catalase

A atividade da catalase foi avaliada por meio da medição espectrofotométrica da taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio a 240 nm.²² Os resultados foram expressos em nmol/min/mg de proteína.

Análise estatística

Todos os conjuntos de dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Experimentos de diferentes doses de T3 ao longo do tempo, em comparação com o grupo Controle, foram analisados por ANOVA fatorial, complementada com teste post-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas. Experimentos comparando o efeito de pré-incubação de dose fixa de T3 (10^{-4} M) sobre a vasoconstrição provocada pela fenilefrina e o efeito da T3 (10^{-4} M) em anéis aórticos pré-incubados com L-NAME, em comparação com o grupo Controle, foram analisados por testes T não pareados. Experimentos do equilíbrio redox foram analisados por meio do método ANOVA bidirecional e complementados com o teste post-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas além dos níveis totais de ROS, que, por sua vez, foram analisados por meio do teste de Kruskal-Wallis, complementado com o teste post-hoc de Dunn para comparações múltiplas. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão para todos os conjuntos de dados, exceto os níveis totais de ROS, cujos resultados foram plotados como um gráfico de pontos de dispersão, representando a mediana e o intervalo interquartil para cada conjunto de dados. O software GraphPad Prism 8.0.2 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) foi utilizado para análise de dados. Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Resultados

A T3 promove relaxamento dos segmentos aórticos

Considerando o vaso intacto, a T3 a 10^{-4} M induziu o relaxamento das aortas pré-contraídas pela fenilefrina em comparação com o grupo controle (Figura 1A). A remoção do endotélio não anulou o efeito de vasorelaxamento induzido pela T3 (10^{-4} M) (Figura 1B).

A T3 diminui a resposta de vasoconstrição induzida pela fenilefrina

A pré-exposição dos segmentos aórticos intactos à T3 (10^{-4} M) resultou em uma redução da contração induzida pela fenilefrina em comparação com o grupo controle (Figura 2A). Porém, o mesmo resultado não foi observado nas preparações sem endotélio (Figura 2B).

A T3 exibe um efeito vasorelaxante independente de NOS

Vasos com endotélio intacto foram pré-incubados com L-NAME, um inibidor inespecífico de NOS, antes da

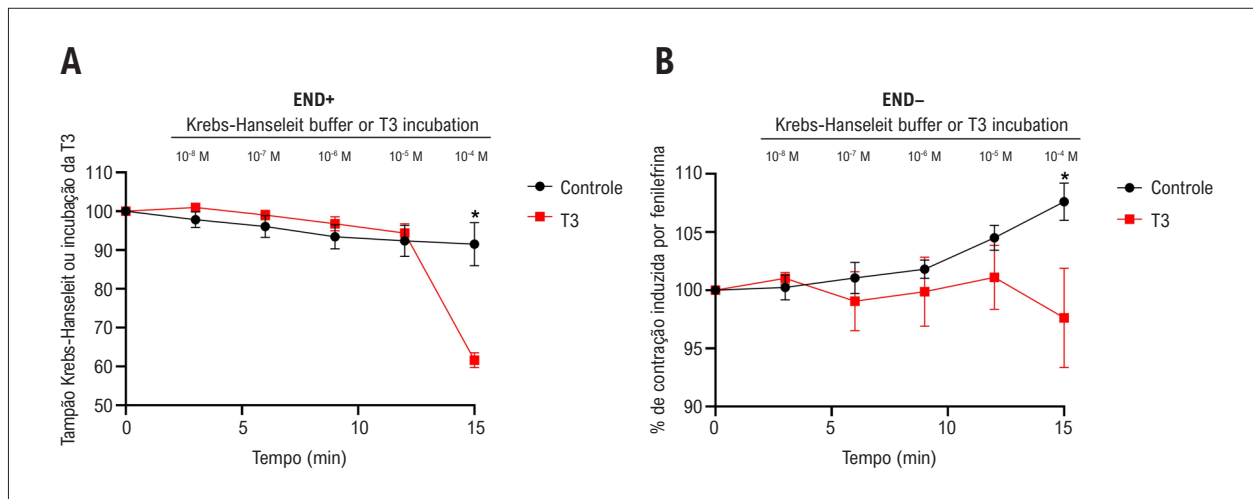


Figura 1 – Efeito da T3 sobre o relaxamento vascular dos segmentos aórticos (A) na presença de endotélio (END+) e (B) na ausência de endotélio (END-) pré-contraído com fenilefrina. Valores representados como média \pm desvio padrão (DP), $n = 6-8$ anéis aórticos por grupo. ANOVA fatorial seguida de pós-teste de Bonferroni. *Diferença significativa entre os grupos Controle e T3 (10^{-4} M); $p < 0,05$.

incubação de T3 (10^{-4} M). Mesmo na presença de L-NAME, a T3 (10^{-4} M) ainda resultou em relaxamento ($\sim 20\%$) dos segmentos aórticos pré-contraídos induzidos por fenilefrina em comparação com o grupo controle (Figura 3).

A T3 reduz a atividade da NADPH oxidase e melhora a atividade da SOD *in vitro*

Embora a concentração total de ROS e a oxidação lipídica não difiram entre os grupos (Figura 4A e 4B), a atividade da NADPH oxidase foi reduzida quando as amostras foram expostas à T3 (10^{-4} M) em comparação com os grupos controle (Figura 4C). Observou-se um aumento da atividade da SOD em vasos incubados com T3 (10^{-4} M) em comparação com os grupos controle (Figura 4D). A atividade da catalase estava aumentada apenas nos grupos que receberam a indução do estresse oxidativo (Figura 4E).

Discussão

Os principais resultados do presente estudo incluem a indução da vasodilatação de anéis aórticos com endotélio intacto e desnudado, pré-contraídos com fenilefrina em modelo experimental *ex vivo*, pela T3, cujo protocolo foi desenhado para avaliação da reatividade vascular. Além disso, a T3 desempenha um papel fundamental na homeostase redox, reduzindo a atividade da NADPH oxidase e aumentando a atividade da SOD dos vasos aórticos *in vitro* (Figura Central).

Estresse oxidativo, hipóxia, aterosclerose e inflamação são exemplos de desencadeadores de eventos vasoconstritores, os quais promovem desequilíbrio entre vasodilatação e vasoconstrição, remodelamento muscular vascular adverso e dano endotelial.²³ Juntos, esses fatores promovem o aparecimento de diversas doenças como acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio e hipertensão.²⁴ Portanto, é importante explorar os mecanismos subjacentes à reatividade dos vasos de modo a propor alternativas terapêuticas que

possam contribuir para o manejo das doenças vasculares. Nosso modelo experimental focou na avaliação da resposta vascular de aortas isoladas na presença de T3. A incubação com fenilefrina induziu a contração dos anéis aórticos, que foram posteriormente submetidos a diferentes doses de T3. Nossos resultados mostraram que a T3, na concentração de 10^{-4} M, reduziu a vasoconstrição induzida pela fenilefrina. Corroborando com nossos dados, Carrillo-Sepulveda et al.,¹³ utilizando aortas de ratos Dahl (fêmeas) sensíveis ao sal, submetidos a uma dieta rica em sal, mostraram que a pré-incubação com T3 reduziu o estado hipercontrátil dos vasos e melhorou a resposta vasodilatadora. No modelo experimental de infarto do miocárdio, Ortiz et al.¹² verificaram que o tratamento com T3 e T4 (2 e 8 $\mu\text{g}/100$ g/dia, respectivamente, por via oral por 12 dias) aumentou o imunoconteúdo de VEGF e HIF-1 α (proteínas envolvidas na angiogênese em cenário hipóxico) na aorta de ratos infartados. Além disso, o VEGF também induz vasodilatação.²⁵

Avaliando o envolvimento do endotélio sobre o efeito vasodilatador do TH, nossos resultados mostraram que a administração de T3 resultou em uma redução na constrição vascular induzida pela fenilefrina em aortas com e sem endotélio. Contudo, em aortas pré-incubadas com 10^{-4} M de T3, a ausência de endotélio afetou significativamente a capacidade de prevenir um aumento da tensão vascular evocada pela fenilefrina. Diante disso, é possível que, em vasos intactos, a T3 possa promover vasodilatação por meio de uma combinação de mecanismos dependentes e independentes do endotélio. Nos vasos sem endotélio, a vasodilatação é mantida por mecanismos independentes, mas a capacidade da T3 de reduzir a tensão vascular diminui. Estes resultados destacam a relevância do endotélio sobre o efeito total da T3 nos vasos. Devido a esse resultado, fez-se necessário investigar o papel do NO no processo de vasodilatação induzido pela T3, uma vez que o endotélio é uma importante fonte dessa molécula vasodilatadora.

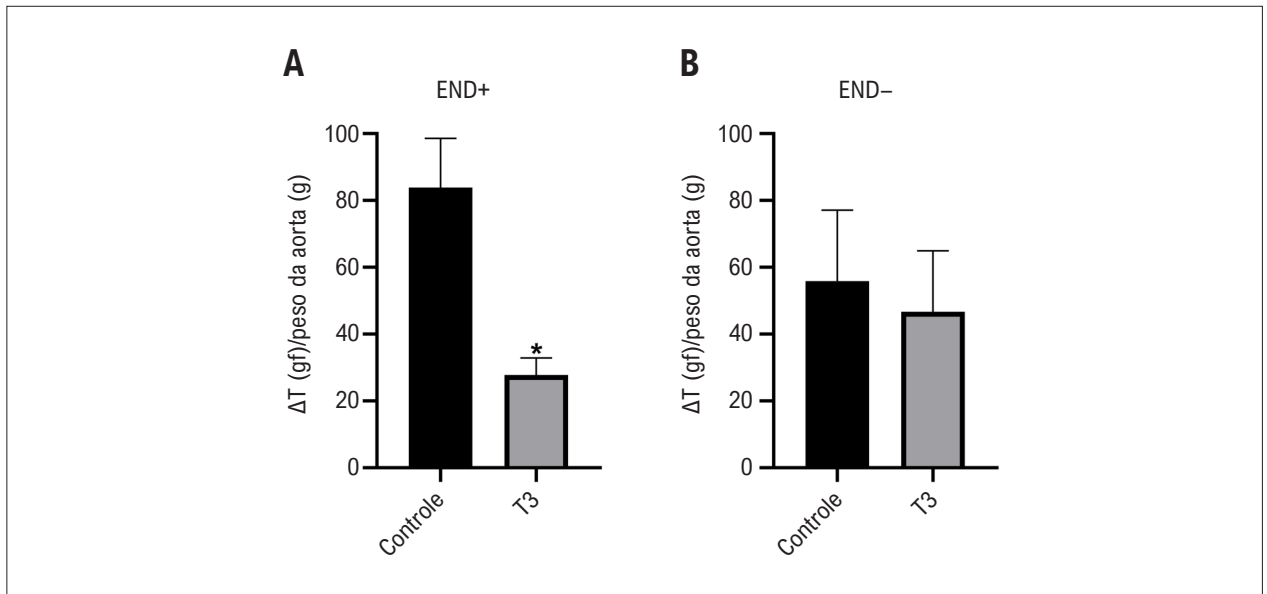


Figura 2 – Efeito da pré-incubação de T3 (10⁻⁴ M) sobre a vasoconstricção dos segmentos aórticos, provocada pela fenilefrina (A) na presença de endotélio (END+) e (B) na ausência de endotélio (END-). Valores representados como média ± desvio padrão (DP), n = 6-10 por grupo. Teste t não pareado. *Diferença significativa entre os grupos Controle e T3; p < 0,05. ΔT/peso da aorta = razão da variação da tensão pelo peso do vaso.

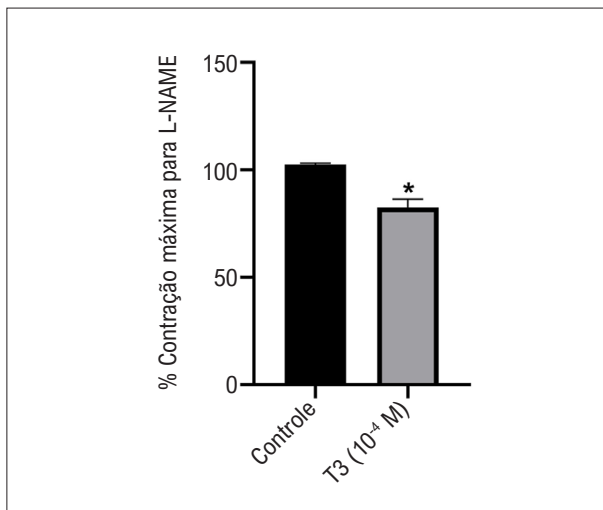


Figura 3 – Efeito da T3 (10⁻⁴ M) sobre o relaxamento vascular de anéis aórticos com endotélio intacto pré-incubados com L-NAME. Valores representados como média ± desvio padrão (DP), n = 6 por grupo. Teste t não pareado. *Diferença significativa entre os grupos Controle e T3; p < 0,05.

O papel da T3 no endotélio e nos mecanismos vasodilatadores envolvidos nessa relação tem sido explorado nos últimos anos, destacando a relevância das vias de sinalização dependentes de NO.²⁶ Além disso, o TH é capaz de aumentar a atividade da óxido nítrico sintase nos eritrócitos, favorecendo a produção de NO no sangue e melhorando a sua biodisponibilidade na circulação.²⁷ No presente estudo, quando os anéis aórticos foram pré-incubados com L-NAME, um conhecido inibidor da NOS, a ação vasodilatadora da T3 persistiu. Esses dados corroboram

a hipótese de que a T3 pode estar induzindo vasodilatação também por meio de um mecanismo independente do NO e do endotélio. Estes resultados não diminuiriam a importância do endotélio sobre o efeito deste hormônio, eles demonstraram a capacidade da T3 em promover dilatação no contexto onde o endotélio é removido/danificado. Samuel et al.²⁸ sugeriram que esse efeito independente do NO está associado à modulação da via da proteína quinase G/fosfoproteína, estimulada por vasodilatador (PKG/VASP) diretamente nas células musculares lisas vasculares. Além disso, o efeito antioxidante de baixas doses de hormônios tireoidianos também é capaz de melhorar a disfunção vascular e contribuir para um tônus vascular relaxado.^{12,13}

Embora as ROS sejam importantes no controle do tônus vascular, quando suas concentrações excedem a capacidade antioxidante do tecido, o estresse oxidativo é estabelecido. A interrupção da homeostase redox resulta em danos vasculares, oxida lipoproteínas de baixa densidade e causa aterosclerose. O processo inflamatório associado a esses eventos leva ao remodelamento vascular adverso, à diminuição dos agentes vasodilatadores e ao aumento do nível de vasoconstricção.²⁹ Nossos resultados mostram que a incubação com T3 reduziu a atividade do NADPH na aorta sob condições experimentais de estresse oxidativo estabelecidas *in vitro*. Além disso, a NADPH oxidase desempenha um papel importante na formação de ROS nos vasos sanguíneos. Essas espécies são capazes de promover um ambiente celular oxidado, levando ao desacoplamento da NOS e ao aumento da produção do radical ânion superóxido em vez do NO. Além disso, os radicais livres, como o ânion superóxido, muitas vezes atuam como sequestradores de NO, reduzindo sua biodisponibilidade e prejudicando a vasodilatação.³⁰ Nesse sentido, Ortiz et al.¹²

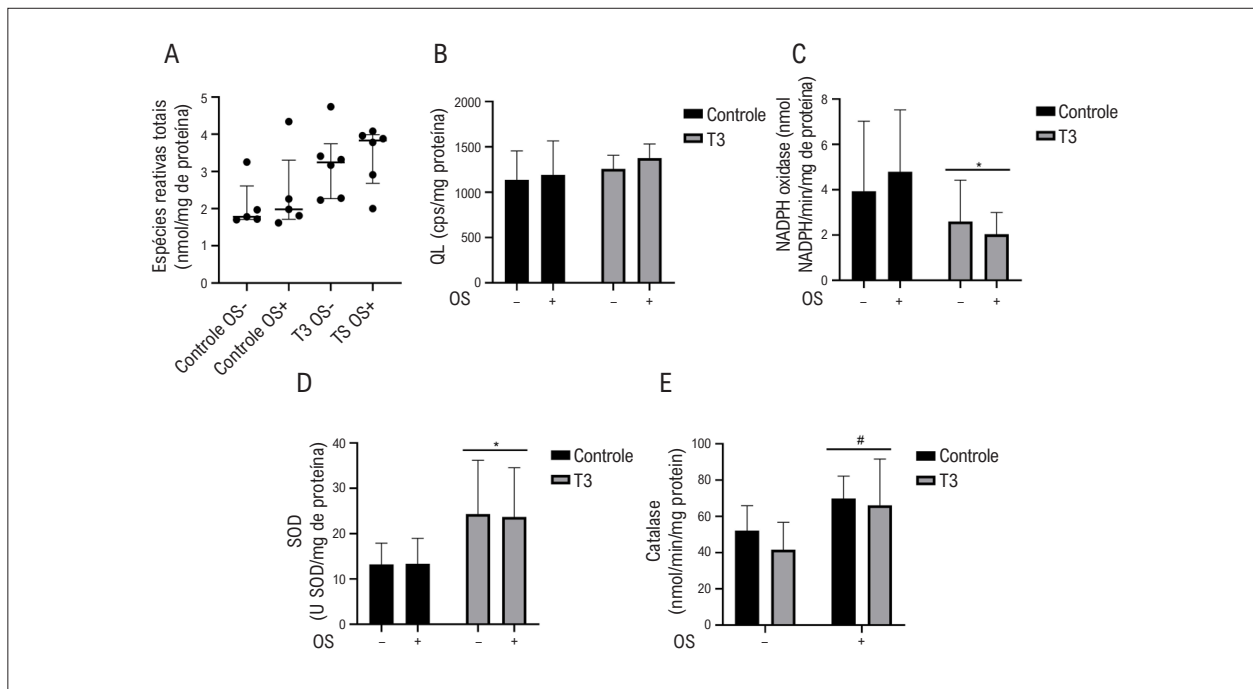


Figura 4 – Efeito da incubação de T3 (10^{-4} M) sobre (A) o nível de espécies reativas totais de oxigênio (ROS), (B) a oxidação lipídica, (C) a atividade da NADPH oxidase, (D) a atividade da superóxido dismutase (SOD) e (E) a atividade da catalase em homogenatos aórticos. Valores representados como mediana com intervalo interquartil para (A) e média \pm desvio padrão (DP) para (B) a (E), $n = 4-6$ por grupo. Teste de Kruskal-Wallis complementado com teste post-hoc de Dunn para (A) e ANOVA de dois fatores foi complementado com teste post-hoc de Bonferroni para (B) a (E). *Diferença significativa entre os grupos Controle e T3 na ANOVA de dois fatores; $p < 0,05$. #Diferença significativa entre os grupos (OS-) e (OS+); $p < 0,05$. OS- = grupos sem indução de estresse oxidativo (sistema de geração de radicais hidroxila); OS+ = grupos com indução de estresse oxidativo (sistema de geração de radicais hidroxila).

também observaram uma redução na atividade da NADPH oxidase na aorta de ratos infartados tratados com hormônios tireoidianos, enquanto De Castro et al.¹¹ mostraram que a administração de TH é capaz de reduzir ROS no coração de ratos infartados. Porém, em termos de níveis totais de ROS, o presente estudo não observou diferenças entre os grupos. Um resultado semelhante foi encontrado para avaliação da oxidação lipídica. Esses resultados podem ter surgido devido ao uso de aortas provenientes de animais saudáveis. Dentro deste contexto, essas amostras de vasos foram induzidas ao estresse oxidativo por meio da geração de modelo de hidroxila, no qual as amostras foram incubadas com FeCl_2 , H_2O_2 e ácido ascórbico por 30 min a 37°C . Entretanto, em estudo anterior avaliando a aorta de ratos infartados, a administração de TH promoveu diminuição dos níveis de ROS.¹² Apesar disso, a capacidade da T3 de diminuir a atividade da NADPH oxidase já demonstra o efeito vasoprotetor desse hormônio. Além disso, quando avaliamos enzimas antioxidantes, a administração de T3 induziu aumento na atividade da SOD no tecido vascular. A SOD converte o ânion radical superóxido em peróxido de hidrogênio, reduzindo os níveis desse radical livre e sustentando um estado de aumento da biodisponibilidade de NO, melhorando assim a capacidade de vasorrelaxamento. Neste sentido, nossos resultados mostram que a T3 promove um cenário favorável à melhora da biodisponibilidade de NO, contribuindo para o mecanismo de vasodilatação dependente do endotélio. Esses dados corroboram

outros estudos que mostram o papel vasoprotetor dos hormônios tireoidianos.¹² Quando avaliamos a atividade da catalase, apenas as aortas submetidas ao estresse oxidativo apresentaram aumento na atividade dessa enzima. Estes resultados indicam um mecanismo compensatório do sistema antioxidante enzimático em resposta ao desequilíbrio redox; no entanto, a administração de T3 não modificou a atividade da catalase. Com relação a esse achado, um estudo investigando os efeitos dos TH em eritrócitos de ratos infartados revelou um aumento na atividade da catalase nas células sanguíneas dos animais tratados.²⁷ Com base nisso, é plausível sugerir que, sob a influência da T3, os eritrócitos possam desempenhar um papel mais significativo na atividade dessa enzima antioxidante do que a própria parede vascular.

Limitação do estudo

A impossibilidade de explorar a expressão proteica diretamente nos anéis aórticos utilizados na reatividade vascular foi uma limitação do estudo. A avaliação da expressão de proteínas, como a sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS) e a via de sinalização PIK3/AKT, bem como de proteínas antioxidantes, como o fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide 2 (NRF2), na mesma amostra incubada com T3 e submetida aos protocolos de vasoconstrição e vasodilatação, teria contribuído para a compreensão da mecânica dos resultados observados. No entanto, o tamanho reduzido dos anéis aórticos e dos fios utilizados no protocolo

de reatividade vascular reduzem o grau de confiabilidade para experimentos subsequentes de biologia molecular utilizando a mesma amostra. Outro aspecto limitante deste artigo é a falta de avaliação de outros vasos de resistência, como pequenas artérias e arteríolas, para verificar se o efeito da T3 na aorta poderia ser extrapolado. Na realidade, o estado contrátil das pequenas artérias e arteríolas é responsável pela definição da resistência vascular, sendo um determinante chave da pressão arterial. Estruturalmente, as artérias de resistência possuem uma ou duas camadas de células musculares lisas vasculares (CMLV), enquanto as artérias condutoras, como a aorta, possuem cerca de 15 camadas de CMLV. Nesse contexto, as células endoteliais das artérias de resistência projetam a membrana plasmática para a camada CMLV por meio da lâmina elástica interna (projeções mioendoteliais). As projeções mioendoteliais conectam-se às CMLV por meio de junções comunicantes que facilitam a comunicação elétrica entre as duas camadas celulares.³¹ Nesse contexto, a hiperpolarização das células endoteliais é transmitida às CMLV, relaxando os vasos; portanto, este é o principal mecanismo para a vasodilatação dependente do endotélio das artérias de resistência. Por outro lado, tal mecanismo difere para a aorta, por exemplo, uma vez que as projeções mioendoteliais muitas vezes estão ausentes nos vasos condutores. Assim, a vasodilatação mediada por NO é o mecanismo primário neste cenário.

Conclusão

Com base nos dados obtidos, é possível concluir que a T3 exerce um importante papel vasodilatador, que se mantém mesmo na ausência do endotélio. Além disso, é capaz de diminuir a atividade da enzima pró-oxidante NADPH e aumentar a atividade da enzima antioxidante SOD. Estes resultados apontam para um efeito benéfico deste hormônio sobre o equilíbrio redox vascular e a resistência periférica. Esse cenário favorece maior biodisponibilidade de NO,

contribuindo também para o mecanismo de vasodilatação dependente do endotélio. Dentro deste contexto, esses dados endossam outros estudos que demonstram efeitos benéficos dos hormônios tireoídianos sobre o sistema circulatório.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa, Análise e interpretação dos dados e Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Pederiva VC, Castro A, Klein AB, Araujo ASR, Turck P; Obtenção de dados e Análise estatística: Pederiva VC, Araujo ASR, Turck P; Obtenção de financiamento: Castro A, Klein AB, Araujo ASR; Redação do manuscrito: Pederiva VC, Castro A, Klein AB, Araujo ASR, Turck P.

Potencial conflito de interesse

Não há conflito com o presente artigo

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pela CNPq/FAPERGS.

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de mestrado de Viviane Pederiva pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Aprovação ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) sob o número de protocolo 38964. Todos os procedimentos envolvidos nesse estudo estão de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, atualizada em 2013.

Referências

1. Jomova K, Raptova R, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, et al. Reactive Oxygen Species, Toxicity, Oxidative Stress, and Antioxidants: Chronic Diseases and Aging. *Arch Toxicol.* 2023;97(10):2499-574. doi: 10.1007/s00204-023-03562-9.
2. Kim JH, Almuwaqqat Z, Hammadah M, Liu C, Ko YA, Lima B, et al. Peripheral Vasoconstriction During Mental Stress and Adverse Cardiovascular Outcomes in Patients with Coronary Artery Disease. *Circ Res.* 2019;125(10):874-83. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.315005.
3. Hammadah M, Alkhoder A, AlMheid J, Wilmot K, Isakadze N, Abdulhadi N, et al. Hemodynamic, Catecholamine, Vasomotor and Vascular Responses: Determinants of Myocardial Ischemia During Mental Stress. *Int J Cardiol.* 2017;243:47-53. doi: 10.1016/j.ijcard.2017.05.093.
4. Wang Z, Wang F, Kong X, Gao X, Gu Y, Zhang J. Oscillatory Shear Stress Induces Oxidative Stress via TLR4 Activation in Endothelial Cells. *Mediators Inflamm.* 2019;2019:7162976. doi: 10.1155/2019/7162976.
5. Xi H, Li X, Zhou Y, Sun Y. The Regulatory Effect of the Paraventricular Nucleus on Hypertension. *Neuroendocrinology.* 2024;114(1):1-13. doi: 10.1159/000533691.
6. Montezano AC, Dulak-Lis M, Tsiropoulou S, Harvey A, Briones AM, Touyz RM. Oxidative Stress and Human Hypertension: Vascular Mechanisms, Biomarkers, and Novel Therapies. *Can J Cardiol.* 2015;31(5):631-41. doi: 10.1016/j.cjca.2015.02.008.
7. Kadlec AO, Chabowski DS, Ait-Aissa K, Hockenberry JC, Otterson MF, Durand MJ, et al. PGC-1 α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator 1- α) Overexpression in Coronary Artery Disease Recruits NO and Hydrogen Peroxide During Flow-Mediated Dilatation and Protects Against Increased Intraluminal Pressure. *Hypertension.* 2017;70(1):166-73. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09289.
8. Tanaka LY, Laurindo FRM. Vascular Remodeling: A Redox-Modulated Mechanism of Vessel Caliber Regulation. *Free Radic Biol Med.* 2017;109:11-21. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.025.
9. Touyz RM, Alves-Lopes R, Rios FJ, Camargo LL, Anagnostopoulou A, Arner A, et al. Vascular Smooth Muscle Contraction in Hypertension. *Cardiovasc Res.* 2018;114(4):529-39. doi: 10.1093/cvr/cvy023.
10. Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: Biochemistry, Pathophysiology and Development of Therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(8):662-80. doi: 10.1038/nrd2222.

11. Castro AL, Tavares AV, Fernandes RO, Campos C, Conzatti A, Siqueira R, et al. T3 and T4 Decrease ROS Levels and Increase Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression in the Myocardium of Infarcted Rats. *Mol Cell Biochem*. 2015;408(1-2):235-43. doi: 10.1007/s11010-015-2501-4.
12. Ortiz VD, Castro AL, Campos C, Fernandes RO, Bonetto JHP, Siqueira R, et al. Effects of Thyroid Hormones on Aortic Tissue After Myocardial Infarction in Rats. *Eur J Pharmacol*. 2016;791:788-93. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.10.022.
13. Carrillo-Sepulveda MA, Panackal A, Maracheril R, Maddie N, Patel MN, Ojamaa K, et al. Triiodothyronine Reduces Vascular Dysfunction Associated with Hypertension by Attenuating Protein Kinase G/ Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein Signaling. *J Pharmacol Exp Ther*. 2019;371(1):88-94. doi: 10.1124/jpet.119.260471.
14. Llévenes P, Balfagón G, Blanco-Rivero J. Thyroid Hormones Affect Nitroergic Innervation Function in Rat Mesenteric Artery: Role of the PI3K/AKT Pathway. *Vascu Pharmacol*. 2018;108:36-45. doi: 10.1016/j.vph.2018.05.001.
15. Park KW, Dai HB, Ojamaa K, Lowenstein E, Klein I, Sellke FW. The Direct Vasomotor Effect of Thyroid Hormones on Rat Skeletal Muscle Resistance Arteries. *Anesth Analg*. 1997;85(4):734-8. doi: 10.1097/00000539-199710000-00005.
16. Halliwell B, MC Gutteridge J. Reprint of: Oxygen Free Radicals and Iron in Relation to Biology and Medicine: Some Problems and Concepts. *Arch Biochem Biophys*. 2022;726:109246. doi: 10.1016/j.abb.2022.109246.
17. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
18. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. *Chem Res Toxicol*. 1992;5(2):227-31. doi: 10.1021/tx00026a012.
19. Llesuy SF, Milei J, Flecha BSG, Boveris A. Myocardial Damage Induced by Doxorubicins: Hydroperoxide-Initiated Chemiluminescence and Morphology. *Free Radic Biol Med*. 1990;8(3):259-64. doi: 10.1016/0891-5849(90)90071-p.
20. Wei Y, Sowers JR, Nistala R, Gong H, Uptergrove GM, Clark SE, et al. Angiotensin II-Induced NADPH Oxidase Activation Impairs Insulin Signaling in Skeletal Muscle Cells. *J Biol Chem*. 2006;281(46):35137-46. doi: 10.1074/jbc.M601320200.
21. Marklund SL. Product of Extracellular-Superoxide Dismutase Catalysis. *FEBS Lett*. 1985;184(2):237-9. doi: 10.1016/0014-5793(85)80613-x.
22. Aebi H. Catalase in Vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105:121-6. doi: 10.1016/s0076-6879(84)05016-3.
23. Drożdż D, Drożdż M, Wójcik M. Endothelial Dysfunction as a Factor Leading to Arterial Hypertension. *Pediatr Nephrol*. 2023;38(9):2973-85. doi: 10.1007/s00467-022-05802-z.
24. Husain K, Hernandez W, Ansari RA, Ferder L. Inflammation, Oxidative Stress and Renin Angiotensin System in Atherosclerosis. *World J Biol Chem*. 2015;6(3):209-17. doi: 10.4331/wjbc.v6.i3.209.
25. Laham RJ, Li J, Tofukuji M, Post M, Simons M, Sellke FW. Spatial Heterogeneity in VEGF-Induced Vasodilation: VEGF Dilates Microvessels but not Epicardial and Systemic Arteries and Veins. *Ann Vasc Surg*. 2003;17(3):245-52. doi: 10.1007/s10016-001-0299-x.
26. Gaynullina DK, Sofronova SI, Selivanova EK, Shvetsova AA, Borzykh AA, Tarasova OS. Region-Specific Effects of Antenatal/early Postnatal Hypothyroidism on Endothelial NO-Pathway Activity in Systemic Circulation. *Curr Res Physiol*. 2021;5:8-15. doi: 10.1016/j.crphys.2021.12.002.
27. Castro AL, Fernandes RO, Ortiz VD, Campos C, Bonetto JHP, Fernandes TRG, et al. Cardioprotective Doses of Thyroid Hormones Improve NO Bioavailability in Erythrocytes and Increase HIF-1 α Expression in the Heart of Infarcted Rats. *Arch Physiol Biochem*. 2022;128(6):1516-23. doi: 10.1080/13813455.2020.1779752.
28. Samuel S, Zhang K, Tang YD, Gerdes AM, Carrillo-Sepulveda MA. Triiodothyronine Potentiates Vasorelaxation via PKG/VASP Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells. *Cell Physiol Biochem*. 2017;41(5):1894-904. doi: 10.1159/000471938.
29. Man AWC, Li H, Xia N. Impact of Lifestyles (Diet and Exercise) on Vascular Health: Oxidative Stress and Endothelial Function. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:1496462. doi: 10.1155/2020/1496462.
30. Pautz A, Li H, Kleinert H. Regulation of NOS Expression in Vascular Diseases. *Front Biosci*. 2021;26(5):85-101. doi: 10.52586/4926.
31. Garland CJ, Dora KA. EDH: Endothelium-Dependent Hyperpolarization and Microvascular Signalling. *Acta Physiol*. 2017;219(1):152-61. doi: 10.1111/apha.12649.

