

Modulações do propranolol associado à tiroxina em tecido cardíaco de ratos

Propranolol modulations associated to thyroxine in cardiac tissue of rats

Elisa Maria Camara Dornellas¹, Grace Mary Lima Souza² & Maria Tereza Jansen de Almeic Catanho³

RESUMO – O trabalho visa avaliar se há melhoras em relação aos efeitos maléficos das doenças oriundas da tireóide sobre a musculatura cardíaca e mostrar, se através da quantificação dos receptores de T_3 (triiodotironina), estes podem tratar doenças cardíacas. As metodologias aplicadas usaram corações de ratos como parâmetros e estudaram os receptores T_3 ao nível cardíaco com radioligantes, a saber: $I^{125} - T_3$, os quais foram analisados por meio de gráficos plotados pela Análise de Scatchard. Através dos diagramas expostos e pela Análise de Scatchard, achou-se um número reduzido de receptores T_3 ao nível cardíaco. Esse trabalho mostra que T_3 pode aprimorar a performance cardíaca através da deiodinação de T_4 (tiroxina) em grande quantidade devido a diminuição do número de receptores T_3 ao nível do tecido cardíaco, aperfeiçoando-o.

PALAVRAS-CHAVE – Hormônios, tireóide, propranolol, coração.

SUMMARY – The present study evaluated if the bad effects from thyroid diseases on heart can become better, and shows through the number of T_3 receptors if they can treat cardiac diseases. The methodologies used hearts of rats as parameters and studied T_3 receptors on hearts with $I^{125} - T_3$. They were evaluated through Scatchard Analysis. Through the graphics and Scatchard Analysis, we found a decrease of the T_3 receptors on cardiac tissue. Our evidences show that T_3 can improves better the cardiac tissue through the deiodination of T_4 in T_3 due the decrease of the number of T_3 receptors in cardiac tissue.

KEYWORDS – Hormones, thyroide, propranolol, heart.

INTRODUÇÃO

Não só a deficiência, mas também o excesso de hormônio da tireóide têm deletérios efeitos sobre o sistema cardiovascular. Estes resultados estão de acordo com os reportados por Baxter *et al* (2001), Klein & Ojamaa, (2001), Duntas, (2002), Biondi *et al* (2002) e Sawin, (2002).

Para se entender a fisiopatologia da doença cardíaca da tireóide, faz-se mister considerar os efeitos de T_4 e T_3 sobre o miocárdio (Evert *et al* (1996). O atual estudo mostra que os receptores dos hormônios da tireóide regulam diversos aspectos da fisiologia do sistema cardiovascular. Esses receptores podem aumentar a força da contractilidade cardíaca e estão sendo testados (Chopra *et al*, 1984) quanto à habilidade deles em tratar a falência do coração.

Os receptores T_3 nucleares são codificados por dois genes situados no cromossomos 17 e 3 (Wu Xd *et al*, 2004, Morkin *et al*, 2002, John *et al*, 2003 e Oppenheimer *et al*, 1996). O T_3 uma maior capacidade de ligação que o T_4 , com receptor, o que acarreta em uma maior atividade biológica (Chin, 1991). Quatro receptores clonados demonstraram uma alta afinidade ao ligar-se com T_3 (Polikar *et al*, 1993). O principal mecanismo da regulação do gene para T_3 não está ainda elucidado.

Cientistas japoneses, entre os quais Shahrara *et al* (2000), observaram que níveis altos de T_4 , transforman-

do-se em T_3 provocam *down regulation* do número de receptores T_3 ao nível cardíaco.

Contrário à Nissim Balas *et al* (2002) e concordando com Zinmam (2006), nós observamos que a sensibilidade do coração mostrou um dromotropismo positivo e efeitos cronotrópicos positivos quando ratos foram tratados com propranolol.

Baseado no complexo droga-receptor foi possível analisarmos o estudo dos parâmetros físico-químicos através de gráficos plotados, baseando-se na Análise de Scatchard (Scatchard, (1949), Cheng, (2004).

MATERIAL E METODOLOGIA

Primeiramente o hipertireoidismo foi induzido pela administração de tiroxina. A tiroxina foi dissolvida em etanol a 99% adicionando-se um pequeno volume de NaOH a 25% e diluído 33 vezes adicionando-se NaCl a 0,9%, para obter uma solução de 1mg/ml. A droga foi administrada intraperitonealmente por 4 dias seguidos. Esse período faz juz à farmacocinética e farmacodinâmica da tiroxina. Esse tratamento resulta num moderado hipertireoidismo. Esses animais foram designados como hipertireóides. Além disso, ratos normais foram tratados com injeções intraperitoneais de solução salina por 4 dias consecutivos. Estes foram chamados de animais controle. Um grupo desses animais foram tratados com propranolol em doses padrão de 10, 30 e 60mg/kg respectiva-

Recebido em 14/02/2007

¹Biomédica, m estre em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco

²Farmacêutica, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco

³Professor Adjunto, Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco

mente, e um outro grupo com propranolol e tiroxina, concomitantemente.

Posteriormente, após a última administração, os animais foram decaptados e seu sangue coletado com a finalidade de medir os níveis sanguíneos dos hormônios da tireóide, assim como os corações extirpados para análise, foram pesados e colocados a 4°C e designados como úmidos.

Outro parâmetro observado foi o receptor T_3 , usando uma fração nuclear de homogenado de células cardíacas de ratos que recebeu tiroxina e solução salina para determinação dos parâmetros de ligação, através do I^{125} - T_3 , obtendo a ligação específica máxima (Bmax) e a constante de afinidade (K_a) via Análise de Scatchard.

A determinação da capacidade de ligação droga-receptor foi feita com o hormônio T_3 marcado com iodo 125 (T_3 - I^{125}). Os parâmetros de ligação droga-receptor (D-R) foram determinados através da Análise de Scatchard. Por meio da obtenção de curvas de saturação, acopladas a Análise de Scatchard e via incubação das concentrações de I^{125} - T_3 e concentrações fixas da fração nuclear de células cardíacas no tempo de 60min, 37°C, banho maria, com um volume de 1ml de solução tampão Tris HCl. O complexo hormônio-receptor marcado foi precipitado por centrifugação 1000g por 10 minutos, à 4°C. As ligações específicas obtiveram hormônios frios em concentrações mais altas do que o hormônio marcado. As curvas de Scatchard foram plotadas através de ligações específicas em pM nas abscissas e os valores de ligações específicas/hormônios não-marcados ou livres, nas ordenadas.

Estatisticamente, os resultados introduzidos nesse trabalho foram avaliados por médias, desvio-padrão e as médias de erros padrões. O nível de significância foi determinado através do Teste Student, considerando a significância ($p=0,05$)

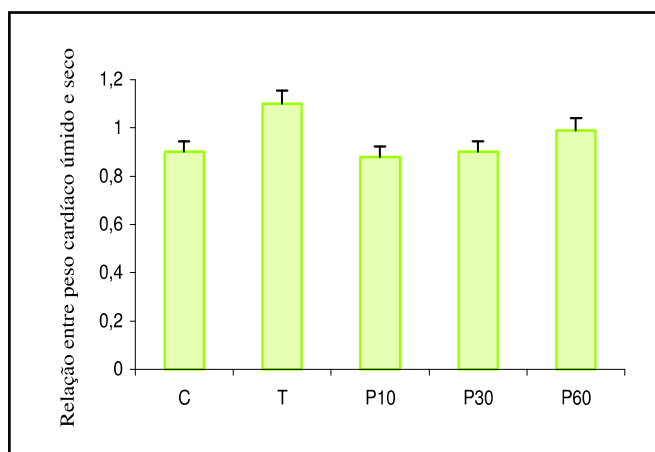
RESULTADOS

Os resultados mostram a determinação cardiográfica ativa de ratos tratados com tiroxina, propranolol e concomitantemente tiroxina e propranolol.

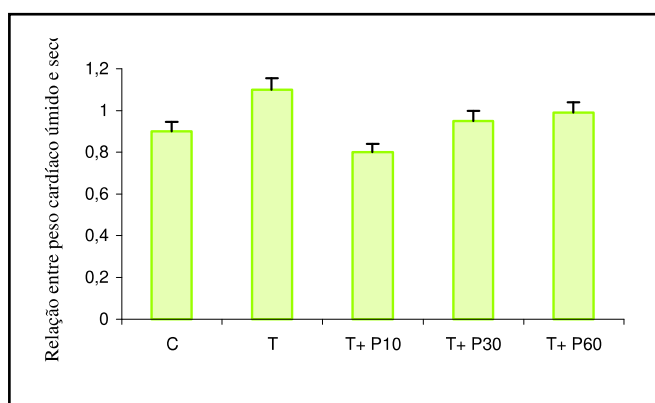
O Gráfico 1 mostra que o tratamento com tiroxina em ratos, nas doses de 25 μ /Kg por 4 dias, aumenta a relação entre peso cardíaco úmido e peso cardíaco seco em 14%, quando comparado ao grupo controle. O hipertireoidismo experimental é um mecanismo comumente usado para produzir crescimento cardíaco e hipertrofia cardíaca em animais experimentais. Basset *et al* (2001) encontraram em exames ecocardiográficos feitos em ratos hipertireóides, o peso do ventrículo esquerdo aumentado.

Por outro lado, na administração de propranolol em doses de 10, 30 e 60mg/Kg, observou-se que a relação entre o peso cardíaco úmido e o peso cardíaco seco não muda significativamente em relação ao grupo controle.

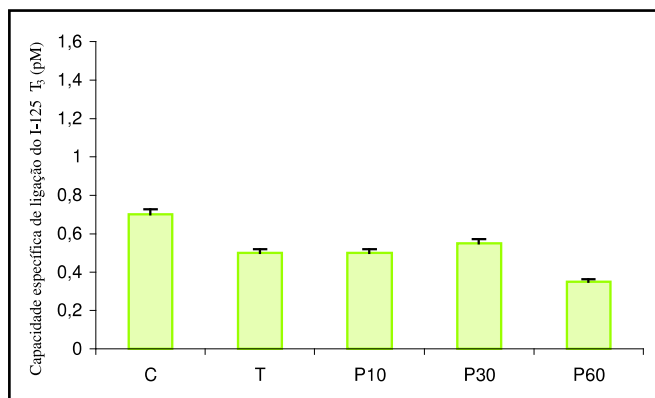
O Gráfico 2 mostra que o tratamento com tiroxina associada ao propranolol, em doses de 10,30 e 60mg/Kg, não produz diferença significativa no que diz respeito à razão entre o peso cardíaco úmido e o peso cardíaco seco, quando comparado ao grupo de animais. Uma outra etapa desse trabalho demonstra a determinação da capacidade de ligação específica do I^{125} - T_3 de ratos tratados com tiroxina, propranolol e ambos tiroxina associada ao propranolol.



GRÁF. 1 - Determinação da razão entre o peso cardíaco úmido e o peso cardíaco seco em ratos, depois do tratamento com tiroxina (T) e propranolol isolado (P), em doses de 10mg/kg (P10), 30mg/kg (P30) e 60mg/kg (P60), por 4 dias. Os resultados são as médias dos testes usando n=5-10 animais por grupo ($p\leq 0,05$)



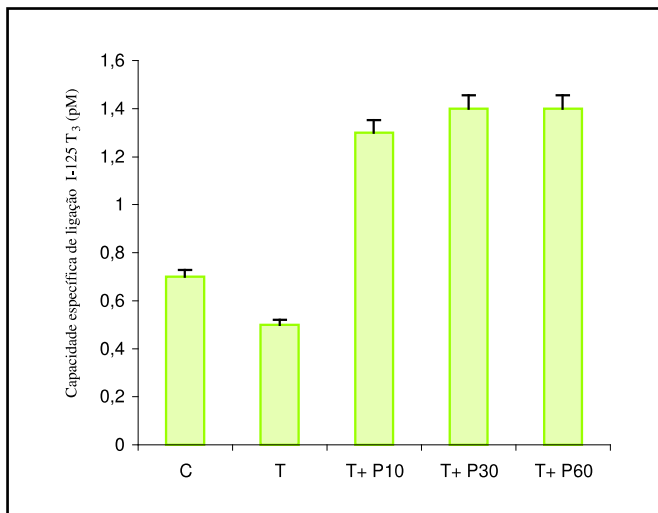
GRÁF. 2 - Determinação da razão entre o peso cardíaco úmido e o peso cardíaco seco em ratos, depois do tratamento com tiroxina (T) e propranolol (P), em doses de 10mg/kg (T=P10), 30mg/kg (T=P30) e 60mg/kg (T=P60), por 4 dias. Os resultados são as médias dos testes usando n=5-10 animais por grupo ($p\leq 0,05$)



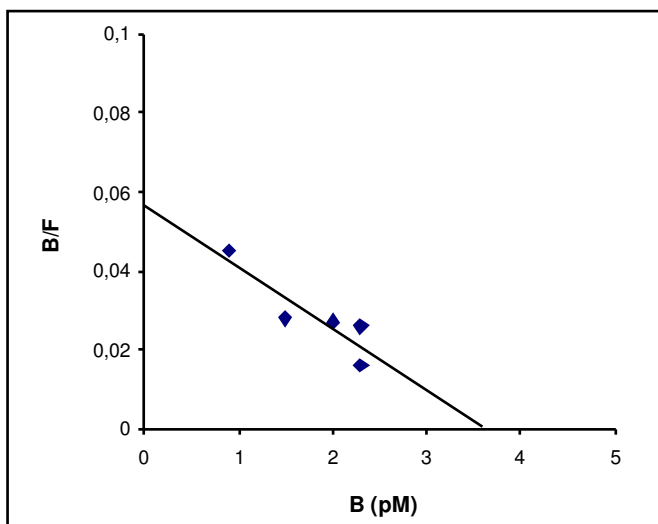
GRÁF. 3 - Determinação da capacidade de ligação (B) do I^{125} - T_3 (pM) em ratos, depois do tratamento com tiroxina (T) e propranolol (P), em doses de 10mg/kg (P10), 30mg/kg (P30) e 60mg/kg (P60), por 4 dias. Os resultados são as médias dos testes usando n=5-10 animais por grupo ($p\leq 0,05$)

O Gráfico 3 mostra que a tiroxina quando foi administrada em ratos eutireóides por 4 dias consecutivos, teve uma redução de 29% na capacidade de ligação específica do I^{125} - T_3 quando comparado ao grupo controle. Entretanto, a administração de propranolol em doses de 10,30 e 60mg/Kg mostra uma redução de 26%, 22% e 28%, respectivamente, no que diz respeito à capacidade de ligação específica de I^{125} - T_3 em relação ao grupo controle.

Nós podemos ver no Gráfico 4 que a capacidade de



GRÁF. 4 - Determinação da capacidade de ligação (B) do I^{125} - T_3 (pM) em ratos, depois do tratamento com tiroxina (T) associada ao propranolol (P), em doses de 10mg/kg (T=P10), 30mg/kg (T=P30) e 60mg/kg (T+P60), por 4 dias. Os resultados são as médias dos testes usando n=5-10 animais por grupo ($p \leq 0,05$)

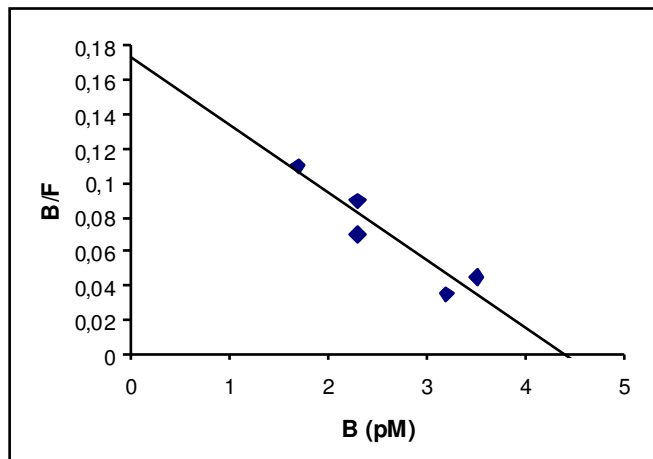


GRÁF. 5 - Diagrama representativo da Análise de Scatchard I^{125} - T_3 receptor em homogenato celular cardíaco de ratos machos adultos tratados com tiroxina por 4 dias consecutivos. O resultado expressa a constante de afinidade K_a de 1,5. 109 MI e uma capacidade de ligação específica máxima de 3,40Pm ($p \leq 0,05$)

ligação específica do I^{125} aumenta de 42%, 46% e 46,6% quando associado à tiroxina, 25 μ g/Kg, com o propranolol em doses de 10,30 e 60mg/Kg respectivas e analogamente ao grupo controle.

Esse trabalho lançou mão também da investigação do efeito da tiroxina sobre receptores T_3 totais em tecido cardíaco. A afinidade do I^{125} - T_3 e o número de receptores T_3 foram determinados 4 dias depois da administração de tiroxina. Para Análise de Scatchard os resultados devem ser obtidos em condições de equilíbrio. As determinações foram efetuadas dentro de 25 a 28 $^{\circ}$ C na presença do I^{125} - T_3 com uma incubação de 60 minutos. Depois da tiroxina exposta em ratos adultos por 4 dias consecutivos, K_a e B_{max} do receptor T_3 em tecido cardíaco foram determinados através da saturação da curva.

Nós podemos observar nos Gráficos 5 e 6, testes com animais tratados e controle, respectivamente, onde 4 dias depois da administração de tiroxina, o tecido cardíaco mostra uma capacidade numérica de ligação específica de $3,40 \pm 0,17$ pMol em função da capacidade



GRÁF. 6 - Representação do diagrama da Análise de Scatchard I^{125} - T_3 receptor em homogenato celular cardíaco de ratos adultos machos por 4 dias. O resultado expressa a constante de afinidade K_a de 3,2. 109 MI e a capacidade de ligação específica máxima de 4,42 Pm ($p \leq 0,05$)

de ligação específica do grupo controle de aproximadamente, $4,42 \pm 0,13$ pMol.

DISCUSSÃO

Em nosso estudo a administração significativa de T_4 aumentou o peso total do coração, conduzindo-nos ao conceito da carga do trabalho cardíaco induzido pelo hormônio tireóideo. Cooper (2004) observou que houve indução do hormônio da tireóide, conduzindo a uma hipertrofia ventricular esquerda, assim como um aumento na contratilidade ventricular esquerda e que tais sintomas foram prevenidos pelo uso concomitante de propranolol, captopril, ou hidralazina. Similarmente, nosso experimento mostra a habilidade do propranolol com tiroxina juntos, em bloquear a hipertrofia cardíaca conduzida por T_4 , parcialmente contrária a Anna (2003).

Nós temos demonstrado a atividade enzimática aumentada, responsável pela conversão de T_4 em T_3 , sugerindo um outro caminho para ação dos hormônios da tireóide sobre as células cardíacas, aperfeiçoando a performance cardíaca. Nossos estudos mostram que a exposição dos hormônios da tireóide pode causar *downregulation* do número de receptores T_3 sobre o tecido cardíaco, pela internalização ou diminuição do número de receptores T_3 . Por conseguinte, nossos relatos têm apontado uma nova revisão da literatura sobre como T_3 poderia aperfeiçoar a desempenho cardíaco, que já vem sendo estudado desde o ano 2000, quando cientistas japoneses obtiveram o mesmo resultado (Shahrara, 2000), não por deiodinação de T_4 em T_3 , mas pelos níveis aumentados do mRNA de T_4 .

CONCLUSÃO

O propranolol bloqueia a hipertrofia cardíaca induzida por T_4 por meio da deiodinação de T_4 em T_3 ; a indução do hipertireoidismo pode, por *downregulation*, aperfeiçoar a performance cardíaca, quando administrada junto com o propranolol, bem como, ter a capacidade de ligação específica do I^{125} - T_3 alterada pela presença de T_4 ao nível do tecido cardíaco, apresentando uma cte de afinidade da ordem de 10^9 M^{-1} .

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos Departamentos de Farmácia, Biofísica e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco, assim como aos órgãos de fomento que custearam esse trabalho, CAPES e CNPQ. O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da Universidade Federal de Pernambuco e os estudos foram realizados em animais de acordo com normas éticas.

REFERÊNCIAS

1. Baxter, J.D; Dillmann, W.H; West, B.L. *et al.* Selective modulation of thyroid hormone receptor action. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2001 (76):31-42.
2. Klein, I; Ojamaa, K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N Engl J Med.* 2001 (344): 501-9
3. Duntas, L.H. Thyroid disease and lipids. *Thyroid.* 2002 (12): 287-93.
4. Biond, B; Palmieri, E.A; Lombardi, G. *et al.* Effects sub-clinical thyroid dysfunction on the heart. *Ann Intern Med.* 2002 (137): 904-14
5. Sawin, C.T. Sub-clinical hyperthyroidism and atrial fibrillation. *thyroid.* 2002 (12): 501-03
6. Chopra, I.J; Huang, T.S; Hurd, R.E *et al.* A study of cardiac effects of thyroid hormones: evidence for amelioration of the effects of thyroxine by sodium iodate. *Endocrinology.* 1984 (6):2039-45.
7. Wu, X.D; Dai, D.Z; Zhang, Q.P; Gao, F. Propranolol and verapamil inhibit mRNA expression of RyR, and SERCA in I-thyroxin-induced rat ventricular hypertrophy. *2004 25 (3): 347-51.*
8. Morkin, E; Pennock, G.D; Spooner, PH *et al.* Clinical and experimental studies on the use of 3,5-diiodothyropropionic acid, a thyroid hormone analogue in heart failure. *Thyroid.* 2002 (12): 527-33.
9. John, D.B; William, F.Y. Jr; Paul, W. Cardiovascular endocrinology: introduction. *End Reviews.* 2003 24(3): 253-60.
10. Oppenheimer, J.H, Schwartz, H.L; Strait, K.A *et al.* The molecular basis of thyroid hormone actions. *In: Braverman L, Utiger R (eds) The Thyroid*, ed7. Lippincott-Raven, Philadelphia. 1996;pp. 162-84
11. Chin, W.W. Nuclear thyroid hormone receptors. *In: Parker MG (ed) Nuclear Hormone Receptors.* Academic Press, New York. 1991; pp. 79-102.
12. Shahrara, S; Sylven, C; Druota, V. Subtype specific downregulation of thyroid hormone receptor mRNA by β -adrenoceptor blockade in the myocardium. *Bio Pharm Bull.* 2000 23(11): 1303-6.
13. Nissim, B; Michael, A; Babeth, R; Asher, Shainberg. Modulation of cardiac α_1 - adenosine receptors in rats following treatment with agents affecting heart rate. *Mol Cell Biochem.* 2002 231: 107-16.
14. Zinman, T; Shneyvays, V; Tribulova N; Manoach, M; Shainberg, A. Acute non-genomic effect of thyroid hormones in preventing calcium overload in newborn rat cardiocytes. *J Cell Physiol.* 2006 207(1): 220-31.
15. Scatchard, G. The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann New York Acad Sci.* 1949 51: 660-72.
16. Cheng, C.H. The Influence of cooperatively on the determination of dissociation constants: examination of the Cheng-Prusoff equation, the Scatchard analysis, the child analysis and related power equations. *Pharmacol Res.* 2004 50: 21-40.
17. Cooper, G; Kent, R.L; Uboh, C.E *et al.* Species differences in myocardial β -adrenergic receptor regulation in response to hyperthyroidism. *J. Clin. Invest.* 2004 (89): 1406.
18. Anna, T; Falk T; Gundler, S; Svensson, H; Ablad, C; Sylvén, C. Effect of thyroid hormone supplementation on survival euthyroid dogs with congestive heart failure due to systolic myocardial dysfunction: a double-blind, placebo-controlled trial. *Research in Veterinary Science.* 2003 (75) 195-201.

Endereço para correspondência
Elisa Maria Dornellas Camara
Av. Afonso Olindense, 1303 - Várzea
Recife - PE - Brasil - 50810-000
e-mail: elisadornellas@hotmail.com