

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS**

DISSERTAÇÃO

**EFEITOS DA ALTERAÇÃO DO *STATUS* TIREOIDIANO NO MODELO
DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO DE CORAÇÕES ISOLADOS DE RATOS**

Ana Paula Antunes de Queiroz

2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS**

**EFEITOS DA ALTERAÇÃO DO *STATUS* TIREOIDIANO NO MODELO
DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO DE CORAÇÕES ISOLADOS DE RATOS**

ANA PAULA ANTUNES DE QUEIROZ

Sob a Orientação do Professor
Emerson Lopes Olivares

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Ciências Clínicas

**Seropédica, RJ
Setembro de 2013**

636.089612

Q3e

T

Queiroz, Ana Paula Antunes de, 1978-
Efeitos da alteração do status
tireoidiano no modelo de isquemia-reperfusão
de corações isolados de ratos / Ana Paula
Antunes de Queiroz. - 2013.
xv, 60 f.: il.

Orientador: Emerson Lopes Olivares.
Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária, 2013.
Bibliografia: f. 50-60.

1. Patologia clínica veterinária - Teses.
2. Coração - Doenças - Teses. 3. Hormônios
tireiodianos - Teses. 4. Hipertireoidismo -
Teses. 5. Hipotireoidismo - Teses. 6.
Isquemia - Teses. 7. Rato como animal de
laboratório - Teses. I. Olivares, Emerson
Lopes, 1973-. II. Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária. III. Título.

Folha de aprovação da banca

Dedico esta dissertação a minha mãe **Ladi Antunes de Queiroz** e a meu pai **José Maria Lopes Marinho de Queiroz** por terem sido meus amigos, por todo seu amor e por terem me dado uma vida tão feliz. Que Deus cuide de vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar viva.

À minha tia Eva de Lourdes Antunes por estar presente em minha vida nos momentos difíceis, alegres e mais importantes.

Aos meus primos Alexandre Dias Pires e Elisabeth Duarte Pires pelo curso de inglês, pois sem este estudo, tudo seria mais difícil.

Aos professores Paulo Botteon e Rita Botteon que foram as primeiras pessoas que conheci aqui na universidade e por terem me recebido com tanto carinho e de braços abertos. Professor Paulo por trás da cara de bravo, se mostrou excelente professor e amigo. Agradeço por ter me ajudado. Muito obrigada!!! Gosto muito de vcs Família Botteon. E em especial carinho e agradecimento a minha amiga e professora Ana Paula Lopes Maques.

Ao professor José Hamilton Matheus do Nascimento (chefe do Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca Antonio Paes de Carvalho- IBCCF-UFRJ) por me ajudar a resolver problemas relacionados com o experimento, por me permitir realizar a maior parte do experimento em seu laboratório e por toda atenção e carinho recebidos desde ontem e hoje .

A todos da equipe do prof José Hamilton Matheus do Nascimento e em especial à pós-graduanda Mara Santos por toda sua ajuda e amizade. Aos pós-graduandos Pedro Pereira Jr., Leonardo Maciel e Emanuele Ferraz, e as alunas de iniciação científica (Dahiene Ferreira Oliviera, Angel Caciano, Nayara Rocha e Edila de Andrade Ramos) por terem compartilhado comigo o langendorff e experimentos regados a gargalhadas. Vocês, me deram verdadeiras aulas de cardiologia e de amizade. Foi muito boa e saudável a convivência. Saudades de bandejar com vocês.

Agradeço ao professor Emerson Lopes Olivares por aceitar ser meu orientador. Agradeço pela sua orientação, a ajuda com os resultados e discussões e por ter me dado todas as ferramentas pra que eu realizasse um bom trabalho. Sem você nada teria sido possível.

RESUMO

QUEIROZ, Ana Paula Antunes. **Efeitos da Alteração do Status Tireoidiano no Modelo de Isquemia-Reperfusão de Corações Isolados de Ratos**. 2013. 74p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia e Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

O HT (hormônio tireoidiano) possui importante papel na homeostase do organismo. Os HTs sofrem influência direta do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide e a também das desidases. Com relação ao coração, este sofre influência direta e indireta dos HTs. Diversos genes cardíacos podem ser modulados pelos HTs no sentido do aumento da contratilidade miocárdica. O excesso dos HTs está associado com: aumento do débito cardíaco, aumento da frequência e contratilidade cardíacas em humanos e animais. Os HTs em excesso podem levar a falência cardíaca em pacientes hipertireóides. A redução crônica do HT leva a disfunção e dilatação da câmara ventricular, bradicardia, injúria na contratilidade cardíaca e com isso redução do débito cardíaco. Assim, há informações a serem esclarecidas com relação ao coração associados com hipertireoidismo e hipotireoidismo. Em um estudo, o hipotireoidismo foi induzido pelo modelo de infarto do miocárdio em ratos (Olivares *et al.*, 2007), sendo que esta mesma condição ocorreu em cardiopatias clínicas. Neste estudo, o hipotireoidismo foi associado com a indução da desidase tipo 3, principal via catabólica do HT no coração infartado. Assim é preciso ser esclarecido se o hipotireoidismo pós-infarto seria uma adaptação do coração doente ou se faria parte do desenvolvimento da doença miocárdica. Para responder essa questão, estudamos a influência no coração da hipertireotoxicose induzida por T4 e do hipotireoidismo induzido por metimazol. Os grupos experimentais foram compostos por ratos Wistar machos, sendo divididos em grupos controle, grupo T4 e grupo MMZ. Após o tratamento, os animais foram eutanasiados, tiveram o sangue coletado para dosagens de T4 e T3 séricos pela técnica de radioimunoensaio e seus corações retirados rapidamente e colocados num sistema de coração isolado pela técnica de Langendorff modificada. As avaliações funcionais foram: eletrocardiograma; pressões diastólica e sistólica finais e pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo que foram gravadas durante o experimento com coração isolado. Posteriormente, os corações foram submetidos ao modelo de isquemia-reperfusão global, já bem descrito na literatura. Após o experimento no coração isolado, este foi submetido à avaliação histopatológica, principalmente para o estudo da área de isquemia. Os dados foram analisados pelo programa ANOVA seguido do teste de Bonferroni com o auxílio do programa GhraphPad (versão 5.0). E os resultados foram representados como média \pm erro padrão da média e as diferenças foram consideradas significativas se $P < 0.05$. Os resultados sugeriram que o HT elevado causou hipertrofia cardíaca, melhora na PDVE na perfusão e não alterou a área de infarto. Porém o HT elevado tornou os corações mais susceptíveis a fibrilação. No entanto o nível demasiadamente reduzido de HT foi deletério ao coração que sofreu injúria de perfusão, porém reduziu o índice de fibrilação cardíaca. Pode-se concluir que nível aumentado do HT pode ser cardioprotetor contra à injúria de isquemia e perfusão, no entanto, torna o coração mais sensível a arritmias fatais. Por outro lado, embora os padrões funcionais reduzidos, o hipotireoidismo diminuiu as chances de fibrilação após isquemia e perfusão miocárdica. Porém mais estudos devem ser realizados para se determinar com maior precisão o papel da alteração do status tireoidiano no coração submetido a isquemia.

Palavras-chave: hormônio tireoidiano, coração, isquemia

ABSTRACT

QUEIROZ, Ana Paula Antunes. **Effects of Alterations in Thyroid Status on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injurie in Isolated Rat Hearts**. 2013. 74p. Dissertation (Master Science in Veterinary Medicine, Pathology and Clinical Sciences). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013

The TH (thyroid hormone) plays an important role in homeostasis. The THs suffer direct influence of the hypothalamic-pituitary-thyroid and also the deiodinases. With respect to the heart, it suffers direct and indirect influence of THs. Several cardiac genes can be modulated by THs towards increased myocardial contractility. Excess of the TH is associated with: increased cardiac output, increased heart rate and cardiac contractility in humans and animals. The THs excess can lead to heart failure in hyperthyroid patients. The reduction of the TH leads to chronic dysfunction and ventricular chamber dilation, bradycardia, cardiac contractility injury and thus reduced cardiac output. Thus, there are informations to be clarified with respect to the heart associated with hyperthyroidism and hypothyroidism. In one study, hypothyroidism was induced model of myocardial infarction in rats (Olivares *et al.*, 2007), and this same condition occurred in cardiac clinics. In this study, hypothyroidism was associated with induction of type 3 deiodinase, the main catabolic pathway of TH in infarcted heart. So we must be clear whether hypothyroidism post-infarction was an adaptation of the diseased heart or would be part of the development of myocardial disease. To answer this question, we studied the influence in the heart about tireotoxicose induced T4 and hypothyroidism induced by methimazole. The experimental groups were composed of male Wistar rats were divided into control group, T4 group and MMZ group. After the treatment, the animals were euthanized, had blood collected for determination of serum T4 and T3 by radioimmunoassay and their hearts rapidly removed and placed in a isolated heart system by the modified Langendorff technique. Functional evaluations were eletrocardiogram; end diastolic and systolic pressure, developed pressure by the left ventricle. Subsequently, the hearts were subjected to ischemia-reperfusion model of global, already well described in the literature. After the experiment in the isolated heart, this was subjected to histopathological evaluation, mainly to study the area of ischemia. The data were analyzed by ANOVA followed by Bonferoni test with the help of the program GhraphPad (version 5.0). And the results were represented as mean \pm standard error of the mean, and differences were considered significant if $P < 0,05$. The results suggested that the high HT caused cardiac hypertrophy, improved PDVE reperfusion and did not alter infarcted area. But the high HT become the hearts more susceptible to fibrillation. However the critically low level of HT was deleterious to the heart that has suffered injury reperfusion, but decreased the rate of cardiac fibrillation. It can be concluded that increased level of HT may be cardioprotective against the ischemia-reperfusion injury, however, renders the heart more susceptible to fatal arrhythmias. Moreover, although the reduced functional mechanical parameters, hypothyroidism decreased the chances of fibrillation after myocardial ischemia and reperfusion. But more studies should be conducted to determine more precisely the role of the change of thyroid status in the heart subjected to ischemia and reperfusion.

Keywords: thyroid hormone, heart, ischemia

LISTA DE ABREVIÇÕES

AKT- proteína cinase B
AMPc- adenosina monofosfato cíclico
ANOVA – análise de variância
ATP – adenosina trifosfato
ATPase – enzima que hidroliza ATP
BG – bigeminismo
BVP – batimento ventricular prematuro
 $\text{Ca}^{+2}_{\text{ATPase}}$ – bomba de cálcio
 Ca_L - canais de cálcio tipo lento
D1 - desidase tipo 1
D2 – desidase tipo 2
D3- desidase tipo 3
DIT- diiodotirosina
DNA - ácido desoxirribonucleico
Eros - espécies reativas de oxigênio
FV- fibrilação ventricular
HT- hormônio tireoidiano
 I_{CaL} - canal de cálcio tipo lento
Kv4.2- canal para potássio sensível a voltagem
Kv 4.3- canal para potássio sensível a voltagem
MAPK - mitogen-activated protein kinase (proteína quinase ativada por mitógenos)
MHC α - cadeia pesada de miosina α
MHC β - cadeia pesada de miosina β
MIT- monoiodotirosina
MMZ- metimazol
NADPH oxidase- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase –oxidase
 $\text{Na}^+/\text{K}^+_{\text{ATPase}}$ – bomba de sódio- potássio ATPase
NCX – trocador de sódio-cálcio
NHE ou Na^+/H^+ - trocador de sódio hidrogênio
NIS- co-transportador de Na^+ - I
p110 α PI3K – isoforma α de PI3K
p110 γ PI3K- isoforma γ de PI3K
p70S6K- S6 cinase
PDFVE - pressão diastólica final do ventrículo esquerdo
PDVE - pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo
pH - potencial hidrogeniônico
PI3K -fosfatidilinositol 3 cinase
PSVE - pressão sistólica do ventrículo esquerdo
PTM – poro de transição de permeabilidade mitocondrial
RA β - receptor adrenérgico tipo β
S.E.M- Standart error mean (erro padrão da média)
SERCA 2- Ca^{+2} ATPase tipo 2 do retículo sarcoplasmático
SNC – sistema nervoso central
T3- tri-iodotironina
T3r – T3 reversa
T4- tiroxina
Tn- TM – troponina- tropomiosina

TPO- tireoperoxidase
Tr - receptor para hormônio tireoideano
Tr α 1- receptor α 1 para hormônio tireoideano
Tr β 1- receptor β 1 para hormônio tireoideano
TRH – hormônio liberador de tireotropina
TSH - hormônio estimulante da tireoide
TSH r – receptor para TSH
TTC – trifeniltetrazólio
TV - taquicardia ventricular
UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro
UI – unidade internacional
VE- ventrículo esquerdo
ZAKI-4 α ou MCIP2 - modulador de proteína que interage com calcineurina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: esquema modificado demonstrando o eixo hipotálamo - hipófise- tireóide	03
Figura 2: esquema modificado das reações de síntese do HT- transporte de iodeto (pela NIS e pela pendrina), oxidação do iodeto (pela TPO), iodação de resíduos tirosil da tireoglobulina (organificação do Iodo) e acoplamento de 2 iodotirosinas	04
Figura 3: reações básicas de desiodação	05
Figura 4: imagem demonstrando parte do cardiomiócito e possíveis locais de ação do HT.	06
Figura 5: esquema modificado representativo de ação não genômica de T3 em cardiomiócitos	8
Figura 6: esquema modificado representativo de ação não genômica e genômica do T3 em diversas células (cardiomiócito-CM, Fibroblasto-FB, células endoteliais - EC)	9
Fig 7: esquema modificado demonstrando: A- acoplamento excitação-contração no miocárdio; B- pontes cruzadas entre miosina e actina	13
Figura 8: esquema modificado demonstrando os efeitos da isquemia e reperfusão no miocárdio	14
Figura 9: esquema modificado representando mecanismo molecular de geração de radicais livres	15
Figura 10: esquema modificado demonstrando alterações que ocorrem na membrana citoplasmática e na mitocôndria principalmente ativação do poro de transição mitocondrial após lesão de isquemia e reperfusão	16
Figura 11: imagem modificada demonstrando isquemia e reperfusão, ativação e abertura do poro de transição mitocondrial, que ocorrem devido a overload de Ca ²⁺ + estresse oxidativo + restauração do fluxo de sangue e do pH	17
Figura 12: imagem modificada demonstrando isquemia e reperfusão, abertura do PTM e morte celular	18
Figura 13: Representação esquemática da preparação de coração isolado (Langendorff) modificado e aparelhos de aquisição de dados. 1- solução de Krebs; 2- bomba de infusão; 3- transdutor de pressão; 4- Conversor A/D; 5- Registro da Pressão Intraventricular ; 6 - bomba de aquecimento; 7- eletrodos. Imagem cedida gentilmente pelo Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca Antonio Paes de Carvalho (IBCCF-UFRJ).	23

Figura 14: Esquema demonstrando o protocolo de isquemia e reperfusão no qual foram realizados 5 minutos de perfusão durante a estabilização, seguidos de 25 minutos de perfusão durante o período basal, 30 minutos de isquemia e 60 minutos de reperfusão.	23
Figura 15: Esquema demonstrando o protocolo de todo o experimento: os animais foram tratados durante 35 dias. No término do tratamento, todos os animais foram submetidos a eutanásia e seus corações foram canulados para que fosse realizada isquemia e reperfusão pela técnica de Langendorff modificada. Ao fim de todo o experimento os corações foram corados com TTC para análise da área de infarto	24
Figura 16: imagem demonstrando registro de eletrocardiograma, com presença de ritmo sinusal	24
Figura 17: imagem demonstrando registro de eletrocardiograma com presença de BVP (apontado por seta)	25
Figura 18: imagem demonstrando registro de eletrocardiograma com presença de bigeminismos (apontados por seta)	25
Figura 19: imagem demonstrando registro de eletrocardiograma com presença de uma salva apontado por seta	25
Figura 20: imagem demonstrando registro de eletrocardiograma com presença de taquicardia sustentada (apontada pela seta)	25
Figura 21: imagem de registro de eletrocardiograma demonstrando fibrilação ventricular (apontado por seta)	25
Figura 22: Imagem de três fatias transversais de um coração do Grupo MMZ demonstrando a análise planimétrica da área de infarto (contorno amarelo por exemplo, na fatia do meio).	26
Figura 23: nível sérico de T4 ($\mu\text{g/dL}$) de animais dos grupos controle (n=6), MMZ (n=10) e T4 (n=11). Os níveis séricos T4 estavam aumentados no grupo T4 e reduzidos no grupo MMZ significativamente. Os dados foram representados como valor médio + S.E.M. dos grupos. Utilizou-se análise ANOVA one-way seguido do post test Bonferroni (* * $p < 0,01$, * $p < 0,05$).	28
Figura 24: nível sérico de T3 ($\mu\text{g/dL}$) de animais dos grupos controle (n=6), MMZ (n=10) e T4 (n=11). Os níveis séricos T3 estavam aumentados no grupo T4 e reduzidos no grupo MMZ significativamente. Os dados foram representados como valor médio + S.E.M. dos grupos. Utilizou-se análise ANOVA one-way seguido do post test Bonferroni (* * $p < 0,01$, * $p < 0,05$).	28

- Figura 25: peso dos animais dos grupos controle (n= 18), MMZ (n= 14) e T4 (n=10) ao fim do tratamento. Esta pesagem foi realizada no dia do experimento com coração isolado. Os dados representam valores médios + S.M.E. dos grupos controle, MMZ e T4. Utilizou-se análise ANOVA, teste one-way seguido do *post test Bonferroni* (** P < 0,01). 29
- Figura 26: peso dos corações dos grupos controle (n= 18), MMZ (n= 12) e T4 (n=9) ao final do tratamento. Esta pesagem foi realizada no dia do experimento com coração isolado. Os dados representam valores médios + S.E.M. dos grupos controle, MMZ e T4. Utilizou-se teste ANOVA, one-way seguido do *post test Bonferroni* (* * P < 0,001). 29
- Figura 27: Relação peso do coração/peso corporal dos grupos controle (n= 18), MMZ (n= 12) e T4 (n=9) ao final do tratamento. Os dados representam valores médios + S.E.M. dos grupos controle, MMZ e T4. Utilizou-se teste ANOVA, one-way seguido do *post test Bonferroni* (* * * P < 0,001). 30
- Figura 28: Relação peso do coração/comprimento da tíbia dos grupos controle (n= 17), MMZ (n= 10) e T4 (n=8) ao final do tratamento. Os dados representam valores médios + S.E.M. dos grupos controle, MMZ e T4. Utilizou-se teste ANOVA, one-way seguido do *post test Bonferroni* (* * * P < 0,001). 31
- Figura 29: Esquema demonstrativo do programa Chart 4 windows utilizado durante a realização dos experimentos. O registro demonstra pressões do ventrículo esquerdo (VE) durante o protocolo de isquemia e reperfusão de coração do grupo controle. EST- período de estabilização; PSVE – pressão sistólica ventricular do VE; PDFVE – pressão diastólica final do VE; PDVE – pressão desenvolvida pelo VE. Imagem cedida gentilmente pelo Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca Antonio Paes de Carvalho (IBCCF-UFRJ). 32
- Figura 30: Esquema demonstrativo do programa Chart 4 windows utilizado durante a realização dos experimentos. O registro demonstra pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (VE) durante o protocolo de isquemia e reperfusão de coração do grupo MMZ. Imagem cedida gentilmente pelo Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca Antonio Paes de Carvalho (IBCCF-UFRJ). 33
- Figura 31: Esquema demonstrativo do programa Chart 4 windows utilizado durante a realização dos experimentos. O registro demonstra pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (VE) durante o protocolo de isquemia e reperfusão de coração do grupo T4. Imagem cedida gentilmente pelo Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca Antonio Paes de Carvalho (IBCCF-UFRJ). 33
- Figura 32: PDVE Basal-Pressão Desenvolvida do Ventrículo Esquerdo(expressa em mmHg) durante o período basal do experimento do coração isolado dos diferentes grupos: controle (n=6), MMZ (n=6) e T4(n=5). Os dados representam os valores médios + S.E.M. dos 3 grupos. Utilizou-se teste ANOVA one-way seguido do *post test Bonferroni* (** P < 0,01) 34

- Figura 33: PSVE (120 minutos) - Curso temporal da PSVE expressa em mmHg durante o protocolo de isquemia e reperfusão nos 3 diferentes grupos: controle (n=6), MMZ (n=6) e T4(n=5). Os dados representam os valores médios + SEM dos 3 grupos.Utilizou-se teste ANOVA two-way seguido do *post test Bonferroni* . ** P < 0,01;*** P < 0,001. 35
- Figura 34: PSVE- Pressão Sistólica do Ventrículo Esquerdo expressa em mmHg no último minuto do período da reperfusão nos 3 diferentes grupos: controle (n=6), MMZ (n=6) e T4(n=5). Os dados representam os valores médios + SEM dos 3 grupos.Utilizou-se teste ANOVA one-way seguido do *post test Bonferroni* . 35
- Figura 35: PDFVE (120 minutos)- Curso temporal da PDFVE(expressa em mmHg) durante o protocolo de isquemia e reperfusão nos 3 diferentes grupos: controle (n=6), MMZ (n=6) e T4(n=5). Os dados representam os valores médios + SEM dos 3 grupos.Utilizou-se teste ANOVA two- way seguido do *post test Bonferroni* (** P < 0,01;*** P < 0,001). 36
- Figura 36: PDFVE-Pressão Diastólica Final do Ventrículo Esquerdo (expressa em mmHg) no último minuto do período da reperfusão nos 3 diferentes grupos: controle (n=6), MMZ (n=6) e T4(n=5). Os dados representam os valores médios + S.E.M. dos 3 grupos.Utilizou-se teste ANOVA one-way seguido do *post test Bonferroni* 37
- Figura 37: PDVE (120 minutos)- Curso temporal da PDVE (expressa em mm Hg) durante o protocolo de isquemia e reperfusão nos 3 diferentes grupos: controle (n=6), MMZ (n=6) e T4(n=5). Os dados representam os valores médios + SEM dos 3 grupos.Utilizou-se teste ANOVA two-way seguido do *post test Bonferroni* (* P < 0,05; ** P < 0,01;*** P < 0,001). 38
- Figura 38: Recuperação da PDVE(%) - 120 minutos - Curso temporal da recuperação da PDVE durante o protocolo de isquemia e reperfusão nos 3 diferentes grupos: controle (n=6), MMZ (n=6) e T4(n=5). Os dados representam os valores médios + SEM dos 3 grupos.Utilizou-se teste ANOVA two-way seguido do *post test Bonferroni* 38
- Figura 39: Recuperação da PDVE(%) analisada no último minuto da reperfusão-recuperação da PDVE durante o último minuto do protocolo de isquemia e reperfusão nos 3 diferentes grupos: controle (n=6), MMZ (n=6) e T4(n=5). Os dados representam os valores médios + SEM dos 3 grupos.Utilizou-se teste ANOVA one-way seguido do *post test Bonferroni* 39
- Figura 40: PSVE (5 minutos) - representação gráfica da análise da PSVE (expressa em mmHg) nos 5 minutos iniciais do período isquêmico nos 3 diferentes grupos: controle (n=6), MMZ (n=6) e T4(n=5). Os resultados representam os valores médios + S.E.M. dos 3 grupos.Utilizou-se teste ANOVA two-way seguido do *post test Bonferroni* (* p < 0,05). 39

Figura 41: PDFVE (5 minutos) - representação gráfica da análise da PDFVE (expressa em mmHg) nos 5 minutos iniciais do período isquêmico nos 3 diferentes grupos: controle (n=6), MMZ (n=6) e T4(n=5). Os resultados representam os valores médios + S.E.M. dos 3 grupos. Utilizou-se teste ANOVA two-way seguido do *post test Bonferroni*. 40

Figura 42: PDVE (5 minutos) - representação gráfica do decaimento da PDVE (expressa em mHg) nos 5 minutos iniciais do período isquêmico nos 3 diferentes grupos: controle (n=6), MMZ (n=6) e T4(n=5). Os resultados representam os valores médios + S.E.M. dos 3 grupos. Utilizou-se teste ANOVA two-way seguido do *post test Bonferroni*. 40

Figura 43- PDVE % (5 minutos) - representação gráfica do decaimento na recuperação da PDVE nos 5 minutos iniciais do período isquêmico nos 3 diferentes grupos: controle (n=6), MMZ (n=6) e T4(n=5). Os resultados representam os valores médios + S.E.M. dos 3 grupos. Utilizou-se teste ANOVA two-way seguido do *post test Bonferroni* (* P < 0,05; ** P < 0,01). 41

Figura 44: imagens demonstrando gráficos sobre a análise das arritmias durante a reperfusão dos corações dos grupos controle, MMZ e T4: a) frequência de BVP ; b) frequência de bigeminismos; c) frequência de salvas; d) frequência de TV; e) duração de TV ; f) frequência total de arritmias g) percentagem de Fibrilação Ventricular . Os resultados representam os valores médios + S.E.M. dos 3 grupos: controle (n=7), MMZ (n=6) e T4(n=5). Utilizou-se teste ANOVA one-way seguido do *post test Bonferroni* (* p < 0,05). 42

Figura 45: Área de infarto – porcentagem da área de infarto definida como área de infarto do coração/área total do coração. Imagens de cortes de corações corados com TTC estão abaixo do gráfico. Os resultados representam os valores médios + S.E.M. dos grupos controle (n=7), MMZ (n=6) e T4(n=5). Utilizou-se teste ANOVA one-way seguido do *post test Bonferroni* (** P < 0,01). 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: tabela modificada descrevendo a ação do HT na expressão de genes cardíacos.	06
Tabela 2: tabela demonstrando a mortalidade nos grupos controle, MMZ e T4	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Hormônios Tireoidianos	2
2.1.1 Eixo hipotálamo-hipófise-tireóide	2
2.1.2 Síntese do Hormônio Tireoidiano	3
2.1.3 Metabolismo do Hormônio Tireoidiano: desiodases	4
2.1.4 Mecanismo de ação do Hormônio Tireoidiano.....	5
2.1.5 Efeitos Genômicos do Hormônio Tireoidiano no Coração	5
2.1.6.Efeitos não Genômicos do Hormônio Tireoidiano no Coração.....	7
2.1.7 Hipertireoidismo - Alterações Hemodinâmicas e Cardíacas	9
2.1.8 Hipotireoidismo - Alterações Hemodinâmicas e Cardíacas	11
2.2 Acoplamento Excitação-Contração	12
3 OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVO GERAL.....	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 Animais	20
4.2 Pesagem dos animais e consumo.....	20
4.3 Protocolo Experimental	20
4.3.1 Coleta de sangue	21
4.3.2 Biometria	21
4.3.3 Protocolo Experimental – coração isolado	21
4.4 Eletrocardiograma <i>in vitro</i>	22
4.4.1 Análise das arritmias de reperfusão	24
4.5 Performance do ventrículo esquerdo	26
4.6 Análise da área de infarto	26
4.7 Análise estatística	27
5 RESULTADOS	28
5.1 Hormônios Tireoidianos	28
5.1.1 Concentração de T4 no plasma	28
5.1.2 Concentração de T3 no plasma	28
5.2 Biometria.....	29
5.2.1 Peso corporal.....	29

5.2.2	Peso do coração.....	29
5.2.3	Relação peso do coração/peso corporal.....	30
5.2.4	Relação peso do coração/comprimento da tíbia.....	30
5.3	Mortalidade	31
5.4	Coração isolado	31
5.4.1	Performance do Ventrículo Esquerdo	32
5.4.2	PDVE (Basal)	34
5.4.3	PSVE (durante 120 minutos de experimento)	34
5.4.4	PSVE (no último minuto da reperfusão)	35
5.4.5	PDFVE (durante os 120 minutos de experimento)	35
5.4.6	PDFVE (no último minuto da reperfusão)	36
5.4.7	PDVE (durante os 120 minutos de experimento)	37
5.4.8	Recuperação da PDVE (%)- durante os 120 minutos de experimento	37
5.4.9	Recuperação da PDVE (%) - no último minuto da reperfusão.....	39
5.4.10	PSVE - 5 minutos iniciais da isquemia	39
5.4.11	PDFVE - 5 minutos iniciais da isquemia	40
5.4.12	PDVE - 5 minutos iniciais da isquemia.....	40
5.4.13	Recuperação da PDVE (%) - 5 minutos iniciais da isquemia.....	40
5.5	Análise das Arritmias de Reperfusão	41
5.6	Área de Infarto.....	42
6	DISCUSSÃO	44
7	CONCLUSÕES.....	49
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

A tireoide é uma glândula endócrina importante para a homeostase do organismo. Seus principais produtos de secreção são os hormônios tireoidianos (HTs), a tetraiodotironina ou tiroxina (T4) e a triiodotironina (T3), sendo este último o hormônio metabolicamente ativo. O T3 atua em todas as células do organismo, exercendo funções fundamentais para a proliferação, diferenciação, apoptose, desenvolvimento, crescimento e metabolismo celular.

De acordo com o estado metabólico celular/tecidual, bem como, em diversas condições de desafio homeostático, os HTs sofrem regulação, por meio de uma alça de feedback envolvendo o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide, e sofrem ativação ou inativação através das desidases do tipo 1 (D1), tipo 2 (D2) e tipo 3 (D3).

Em relação ao sistema cardiovascular, o coração sofre influência direta e indireta do HT. Diversos genes cardíacos podem ser modulados pelo HT no sentido do aumento da contratilidade miocárdica, podendo levar a hipertrofia excessiva e danos ao sistema cardiovascular.

No ano de 1926, ocorreram relatos de mortes relacionadas com tireotoxicose na cidade de Ontario, Canadá, onde o índice de mortes por essa doença duplicou em relação a década anterior (STANBURY *et al*, 1998).

Em um estudo entre 1988 a 1994 realizado nos Estados Unidos, foi encontrada taxa de 4,6 % de hipotireoidismo na população americana (0,3% hipotireoidismo clínico e 4,3% subclínico). No caso do hipertireoidismo foi encontrado em 1,3% na população, sendo 0,5% clínico e 0,7% subclínico (HOLLOWELL *et. al*, 2002).

No ano de 2001, em uma pesquisa sobre saúde na cidade de Busselton, na Austrália Ocidental, em pessoas com e sem disfunção da tireoide, foi analisada a prevalência de doença coronariana. Nesse estudo foi verificado que em pacientes sem disfunção da tireoide tiveram menor prevalência da doença cardíaca. Para afirmar isso foi visto nesse estudo, que pacientes com hipotireoidismo subclínico (de um total de 119 pessoas) tiveram maior índice de doença coronariana do que pacientes eutireoideos (de um total de 1906 pessoas) (WALSH *et al*, 2005).

Também já foram descritas diversas alterações cardíacas causadas pelos HTs séricos reduzidos (hipotireoidismo) que culminam em bradicardia, diminuição da performance cardíaca, entre outras.

O hipotireoidismo secundário ao infarto do miocárdio induzido experimentalmente foi demonstrado em ratos (OLIVARES *et al*, 2007). Esta mesma condição já foi relatada nos estudos em pacientes humanos e cães com relação às cardiopatias clínicas. No caso do nosso estudo, o hipotireoidismo foi associado à indução ectópica da desidase tipo 3, a principal via catabólica dos HTs. Se o hipotireoidismo pós-infarto é uma condição alostática importante para a manutenção da vida ou se é parte integrante de uma série de complicações mal adaptativas, isso ainda não foi esclarecido.

Sabe-se que pacientes na clínica veterinária que possuem o nível de HT muito elevado ou diminuído, possuem alterações na morfologia e função cardíacas que podem ser analisadas por ecocardiograma. E esses pacientes com HT muito alterado podem estar propensos a desenvolver sérios danos cardíacos muito graves e até obstrução de vasos com comprometimento sistêmico. Através desse estudo foi importante avaliar as lesões cardíacas após a reperfusão seguida de obstrução.

O presente estudo teve por objetivo avaliar a influência do nível do HT na função cardíaca e no grau da lesão após a utilização do modelo de isquemia e reperfusão de corações isolados de ratos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Hormônios Tireoidianos

2.1.1 Eixo hipotálamo-hipófise-tireóide

A síntese do hormônio tireoidiano (HT) é regulada, em parte, devido à liberação de hormônio liberador de tireotropina (TRH) no hipotálamo. Neste local há neurônios do núcleo paraventricular que secretam este hormônio (TRH). Este hormônio é liberado via sistema porta hipotálamo-hipofisário, e age nos receptores dos tireotrofos na pituitária promovendo a síntese, liberação e glicosilação da tireotropina (TSH), que atua em seu receptor específico nas células do folículo tireoidiano promovendo a síntese e liberação dos HTs: T3 e T4 (WONDISFORD, 2002). A liberação do TSH é estimulada por essa via, porém pode ser inibida por dopamina e somatostatina que estão presentes no hipotálamo (MORENO *et al*, 1998).

Os HTs produzidos pela tireóide, como pode ser visto na figura 1, reduzem síntese de TSH e TRH e são os principais responsáveis pela regulação do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide. A redução do T4 causa aumento da expressão do TSH e TRH. Se essa redução de HT, T3 por exemplo, perdurar devido a uma deficiência nutricional de iodo ou por tratamento medicamentoso, a desidase tipo 2 presente no hipotálamo e na pituitária anterior irão converter o T4 em T3 impedindo um hipotireoidismo central (ARROJO E DRIGO *et al*, 2013).

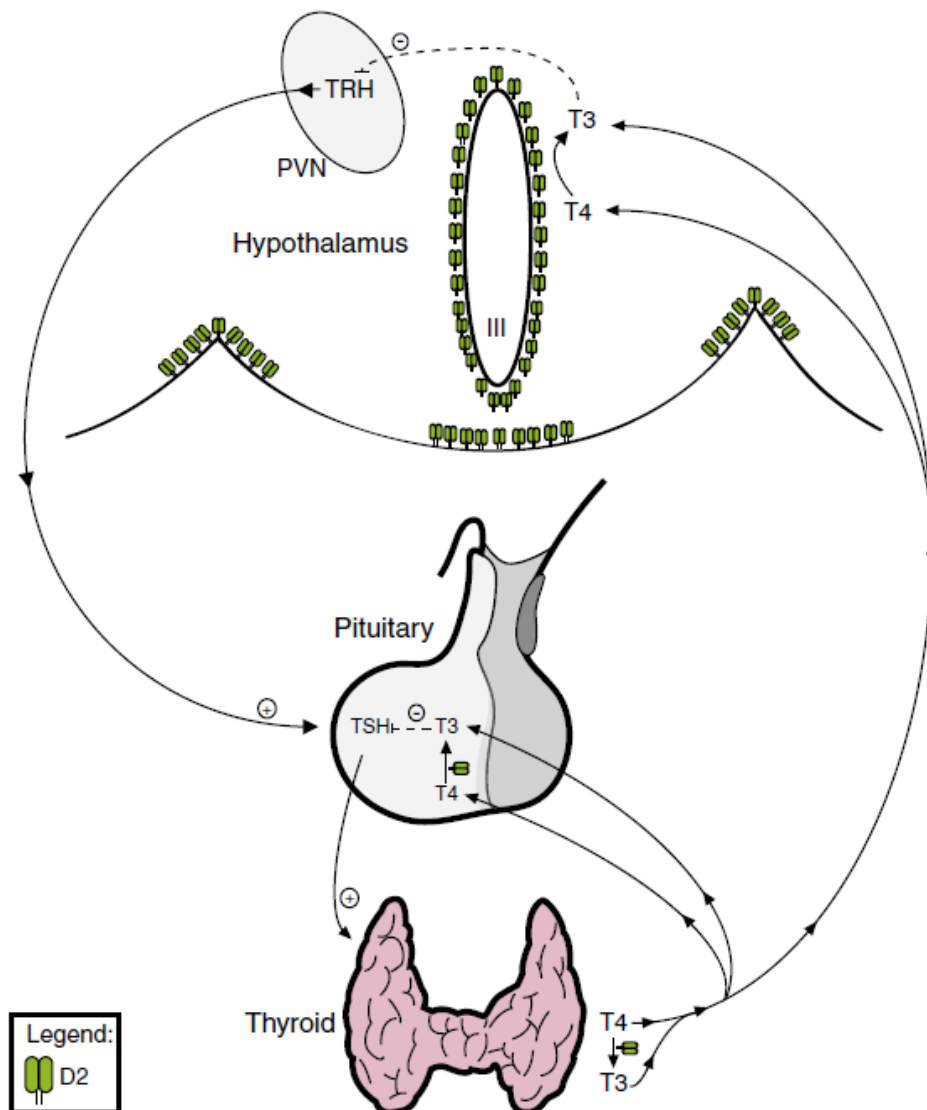


Figura1: esquema modificado demonstrando o eixo hipotálamo - hipófise- tireóide.III- 3º ventrículo ; D2-desiodase.TRH- hormônio liberador de tireotropina; PVN- núcleo paraventricular; T3- tri-iodotironina; T4 – tiroxina (Fonte: ARROJO E DRIGO *et al*, 2013).

2.1.2 Síntese do Hormônio Tireoidiano

A tireoide é uma glândula endócrina importante para a homeostase do organismo. Seus principais produtos de secreção são os hormônios tireoidianos (HTs): tetraiodotironina ou tiroxina (T4) e a triiodotironina (T3), sendo este último o hormônio metabolicamente ativo. O T3 atua em todas as células do organismo, exercendo funções fundamentais para o desenvolvimento, crescimento e metabolismo celular.

Este hormônio (HT) é sintetizado a partir de tireoglobulina e iodo. A tireoglobulina é sintetizada (na célula folicular da tireoide), exocitada na membrana apical, se acumulando na luz do folículo tireoidiano. O iodo (que é absorvido na forma de iodeto pela flora intestinal) é transportado pelo transportador de NaI (NIS) localizado na membrana basal da célula folicular e pela proteína pendrina até a membrana apical da célula folicular (KIMURA, 2008), como pode ser demonstrado na figura 2. A tireoperoxidase (TPO), que age na membrana apical, é uma enzima essencial e atua nas etapas seguintes da síntese do HT, como: oxidação

do iodeto; organificação do iodo a resíduos de tirosina da tireoglobulina (KIMURA, 2008), formando monoiodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT); e acoplamento de MIT e DIT para formar T3 e T4 (BALUCAN *et al.*, 2013). Assim, o HT é sintetizado pela tireoide em resposta ao TSH. O TSH age em seu receptor específico (TSHr) localizado na membrana basal (limite externo) da célula do foliculo tireoidiano e estimula as demais etapas descritas para a síntese do HT.

O T3 e T4 são secretados pela tireoide e no sangue são transportados principalmente pela proteína ligadora de tiroxina (TBG) (ROSEN & PRIVALSKY, 2011), pela transtirretina e albumina.

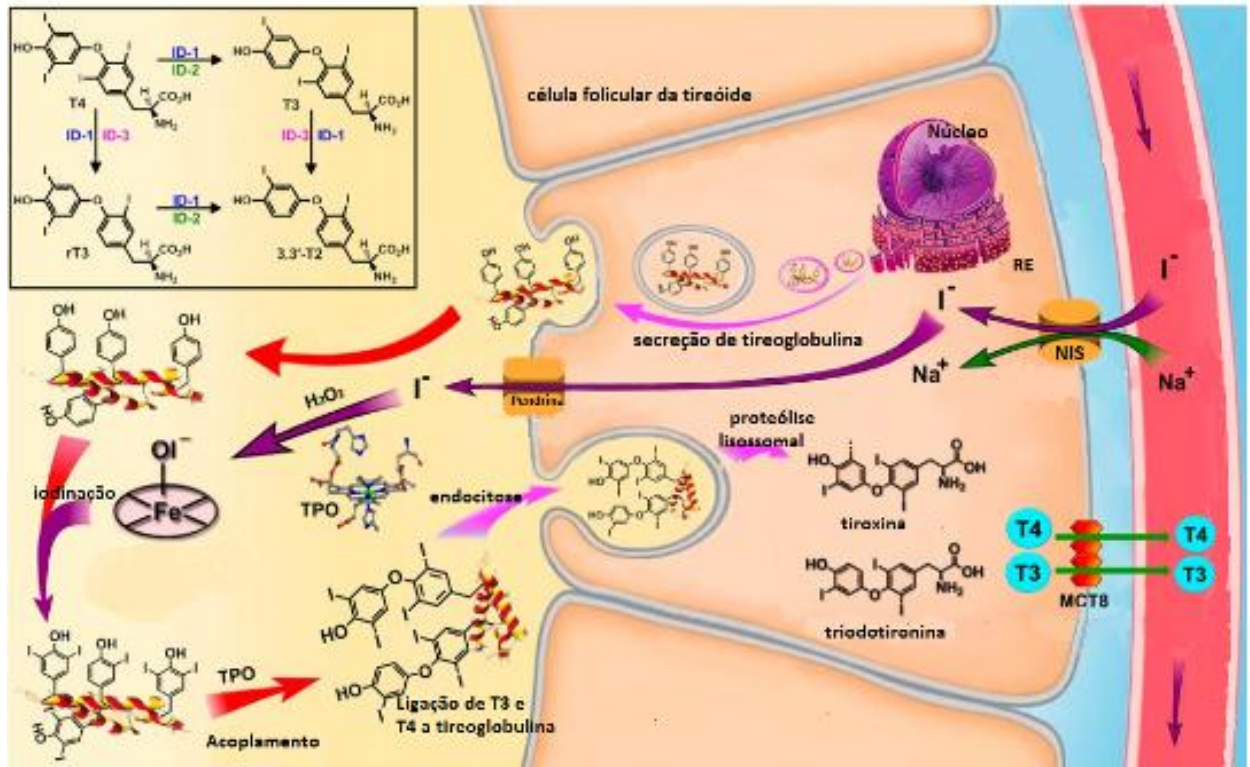


Figura 2: Esquema modificado das reações de síntese do HT- transporte de iodeto (pela NIS e pela pendrina), oxidação do iodeto (pela TPO), iodação de resíduos tirosil da tireoglobulina (organificação do Iodo) e acoplamento de 2 iodotirosinas (ID). ID1-desiodase tipo 1; ID2- desiodase tipo 2; ID3- desiodase tipo 3; T4- tiroxina, T3- triiodotironina; rT3- Tri-iodotiroinina reversa; T2 -di-iodotironina, RE- retículo endoplasmático; NIS- co-transportador de Na⁺ (sódio) e I⁻ (iodo) ; MCT8- transportador monocarboxilato 8 (Fonte: MANNA *et al.*, 2013).

2.1.3 Metabolismo do Hormônio Tireoidiano: desiodases

A produção de T4 pela tireoide predomina sobre T3. Porém, a maior parte de T3 provém do metabolismo do T4 através da desiodação pela desiodase tipo 2 (D2). O hormônio tireoidiano sofre metabolização periférica através de retirada do iodo pelas desiodases (D1, D2 e D3). A enzima D1 promove desiodação (retirada de iodo) do anel aromático externo (5' desiodação) de T4 gerando T3 (forma ativa do HT). Como pode ser visto na figura 3, esta enzima pode também remover o iodo do anel interno (5 desiodação) de T3 e T4, causando formação de formas inativas (T2 e T3r). A D2 expressa no coração tem maior afinidade por T4. Esta enzima faz desiodação do anel externo de T4 causando uma conversão local (tecidual) de T4 em T3 (forma ativa). A enzima D3 faz desiodação de T4 e T3 convertendo-os respectivamente em T3r e T2, ambas inativas (KIMURA, 2008). Nos vertebrados a D1 junto a D2 possibilita um maior ajuste de T3 plasmático, porém a D2 possui um papel importante em

ajustar o T3 a nível intracelular e em tecidos como adeno-hipófise, SNC e tecido adiposo marrom (ARROJO *et al*, 2012). Níveis maiores de expressão de D2 são encontrados em tecidos onde há necessidade maior de HT para que ocorra uma homeostase local (SALVATORE *et al.*, 1996).

A desidase tipo 1 (D1) é descrita como sendo expressa no fígado, rins, tireóide e Sistema Nervoso Central (SNC). A desidase tipo 2 (D2) é expressa no SNC, adeno-hipófise, tecido adiposo, placenta, tireóide, músculo e coração. E a desidase tipo 3 (D3) é expressa no SNC, placenta e pele (KIMURA, 2008).

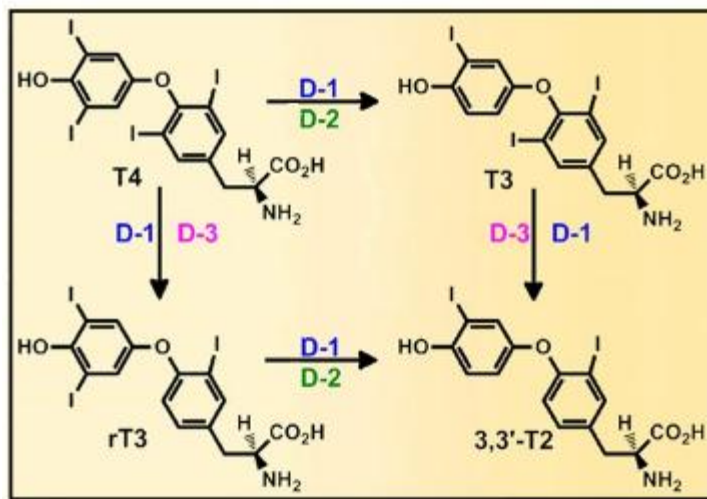


Figura 3: reações básicas de desidodação. D-1- desidase tipo 1; D-2- desidase tipo 2; D-3- desidase tipo 3; T4- tiroxina; rT3- triiodotironina reversa; T2- diiodotironina (MANNA *et al*, 2013)

2.1.4 Mecanismo de ação do Hormônio Tireoidiano

Os HTs através de seus efeitos genômicos e não genômicos exercem funções na regulação do metabolismo, proliferação e diferenciação celular. Algumas importantes funções que os HTs exercem é no sistema cardiovascular.

2.1.5 Efeitos Genômicos do Hormônio Tireoidiano no Coração

Com relação aos seus efeitos genômicos, o HT causa ativação da transcrição de genes que codificam determinada proteína. Para isso o HT atravessa a membrana do cardiomiócito através de transportadores membranais, MCT8 (transportador monocarboxilato 8) e MCT10 (transportador monocarboxilato 10) (WOJCICKA *et al*, 2013) e vai agir no núcleo da célula (ação genômica). O T3 exerce sua ação através de ligação ao receptor nuclear do HT (Tr) como pode ser visto na figura 4. Este receptor Tr possui afinidade maior por T3 do que por T4. No cardiomiócito há presença de Tr α 1 e Tr β 1 presentes no citossol e TR α 1 presente no núcleo e no citossol (OJAMAA, 2010). Mais precisamente o Tr α 1 está presente em maior número do que Tr β no miocárdio (KLEIN & DANZI, 2007). O receptor Tr reside no núcleo, ligado ao RXR- receptor X de ácido retinóico (DAVIS *et al*, 2008) e neste local, o Tr se liga a Elementos responsivos ao T3 (TRE) em uma região do DNA. Dessa forma o T3 ao se ligar ao Tr promove a transcrição genética (FAZIO *et al*, 2004) e síntese de proteína.

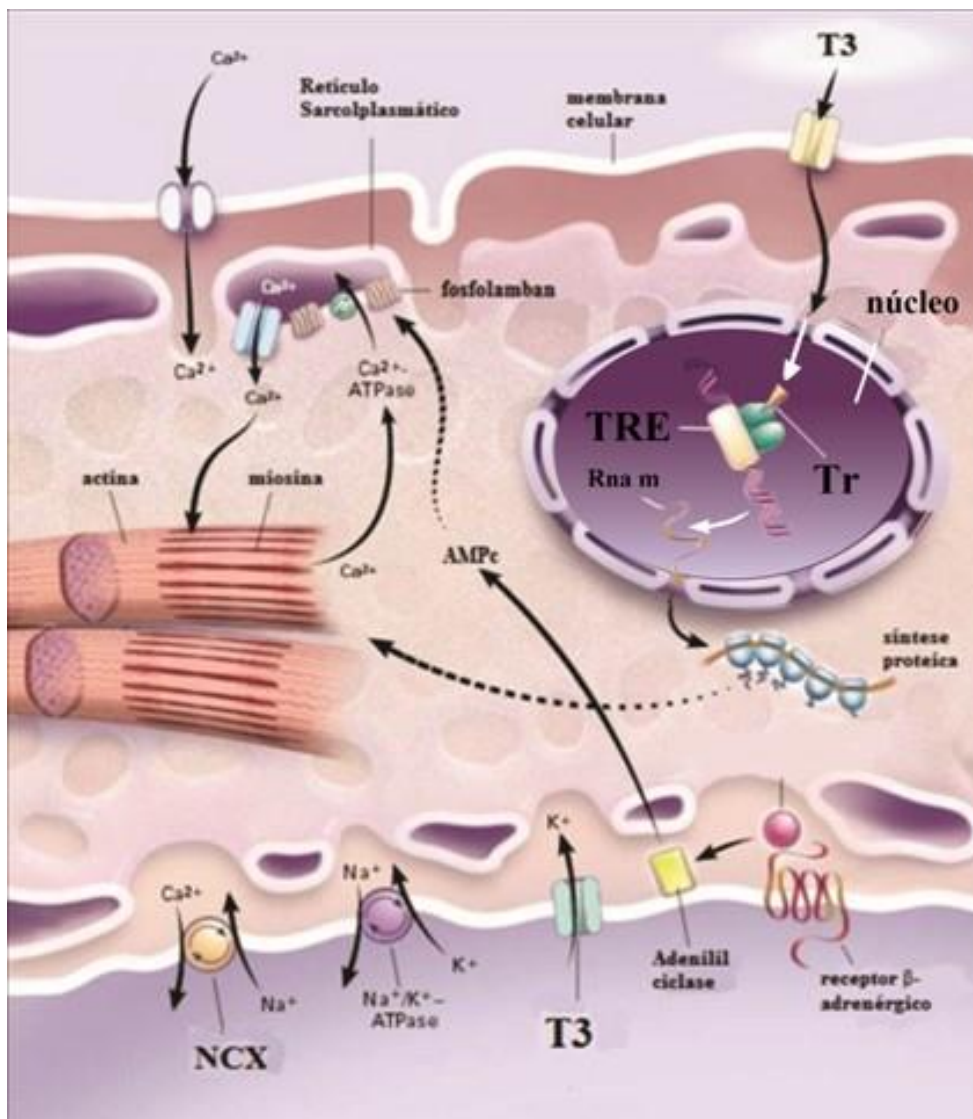


Figura 4: imagem modificada demonstrando parte do cardiomiócito e possíveis locais de ação do HT. NCX– trocador de sódio-cálcio; Na⁺/K⁺-ATPase – bomba de sódio-potássio ATPase; Ca²⁺ – cálcio; TRE- elementos responsivos ao T3 ; TR - receptor para hormônio tireoideano ;T3- tri-iodotironina;K⁺ - potássio; AMPc- adenosina monofosfato cíclico. (Fonte: KLEIN & OJAMAA, 2001).

Tabela 1: Tabela modificada descrevendo a ação do HT na expressão de genes cardíacos.

GENS REGULADOS POSITIVAMENTE	GENES REGULADOS NEGATIVAMENTE
Cadeia pesada de miosina α	Cadeia pesada de miosina β
Receptor β - adrenérgico	fosfolamban
Serca 2	Trα1
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	NCX

Serca 2- Ca²⁺ ATPase do retículo sarcoplasmático; Na⁺/K⁺ATPase – bomba de sódio-potássio ATPase; Trα1- receptor α1 para hormônio tireoideano; NCX- trocador de Na⁺/Ca²⁺ (Fonte: KLEIN & DANZI, 2007).

A partir da ligação ao Tr, o T3 ativa uma série de transcrições protéicas e aumento da expressão de alguns genes (Tabela 1), porém regula negativamente alguns genes. Essa informação pode ser exemplificada através de estudos no tratamento com T3 em modelos experimentais em ratos, que ocorre aumento da expressão da Serca 2 presente no miocárdio e

redução da expressão de fosfolamban (PLB) (SHENOY *et al*, 2001). O aumento da expressão (através de T3) da Serca 2 no cardiomiócito e redução da expressão de fosfolamban (proteína que quando desfosforilada é inibidora da Serca) aumenta entrada ativa de cálcio no retículo Sarcoplasmático do cardiomiócito e assim facilitando a diástole, porque reduz a concentração de cálcio no citossol disponível para contração. O redução da expressão de NCX é importante para a redução dos efeitos deletérios da isquemia e reperfusão no miocárdio, levando a redução de influxo de cálcio para a célula e assim diminuindo os efeitos causados por sobrecarga de cálcio intracelular que ocorre na injúria de isquemia e reperfusão.

Adicionalmente foi observado em preparações de miocárdio de ratos tratados com triiodotironina (T3), que o hormônio aumenta a expressão e a atividade da bomba Na^+/K^+ ATPase (KASTURI *et al*, 2008) que é essencial para a estabilidade da diferença de potencial de membrana.

O HT está associado também com aumento da expressão da cadeia pesada de miosina α (MHC- α) (WANG *et al*, 2006), sendo que essa isoforma está relacionada com uma maior velocidade Atpasica e portanto maior velocidade/força de encurtamento do cardiomiócito ou seja a sístole ocorreria mais rapidamente devido ao aumento da expressão de MHC- α .

2.1.6.Efeitos não Genômicos do Hormônio Tireoidiano no Coração

O mecanismo pelo qual o HT atua, neste caso, seria através de transdução de sinais na célula por atuar em receptores localizados na membrana celular.

O HT possui uma outra atividade importante no miocárdio com relação a atividade do trocador de sódio-hidrogênio (Na^+/H^+ ou NHE) presente na membrana plasmática. O T4, via ação não genômica, pode atuar via receptor $\alpha\beta 3$ na membrana plasmática, ativar a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e com isso ativar o trocador NHE (DAVIS *et al*, 2008) podendo ativar também por essa via a angiogênese. O NHE age a favor da Na^+/K^+ ATPase, e causa efluxo de H^+ e o influxo de Na^+ pela célula (SOUZA, 2008). A ativação de NHE contribui para regular o pH da célula, sendo muito importante em eventos isquêmicos, que causam acidose intracelular como após injúria de isquemia e reperfusão.

O HT pode atuar também na translocação de receptores extranucleares, Tr α ou Tr β (DAVIS *et al*, 2008) para o núcleo. Nos cardiomiócitos, Tr α 1 e Tr β 1 estão presentes no citossol, o Tr α 1 está presente no núcleo e citossol (OJAMAA, 2010).

A hipertrofia cardíaca causada pelo HT é principalmente por ação não genômica, como pode ser visto na figura 5, no cardiomiócito o T3 se liga ao Tr α 1 no citossol ou ao fator de crescimento para receptor proteína-tirosina-cinase (RPTK) que está na superfície da célula e assim ativa PI3K p110 através de interações com p85 (subunidade de PI3K). Essa isoforma PI3Kp110 causa fosforilação de fofatidilinositol difosfato (PIP 2) para produzir fofatidilinositol trifosfato (PIP3). Este último causa fosforilação de AKT através de cinase dependente de fofatidilinositol (PDK1). A AKT ativada causa ativação de *mammalian target of rapamycin* (mTor). Esta ativada causa fosforilação de rpS6 e proteína de ligação para factor eIF4E (4E-BP1) e conseqüentemente a síntese de proteínas contráteis, promovendo o aumento do sarcômero e hipertrofia cardíaca (OJAMAA, 2010). Essa hipertrofia causada pelo HT pode ser fisiológica. Porém se houver estímulo crônico pode haver indução de hipertrofia patológica resultando em cardiopatia dilatada e falência cardíaca devido a uma má resposta adaptativa do miocárdio (ARAÚJO *et. al*, 2008) .

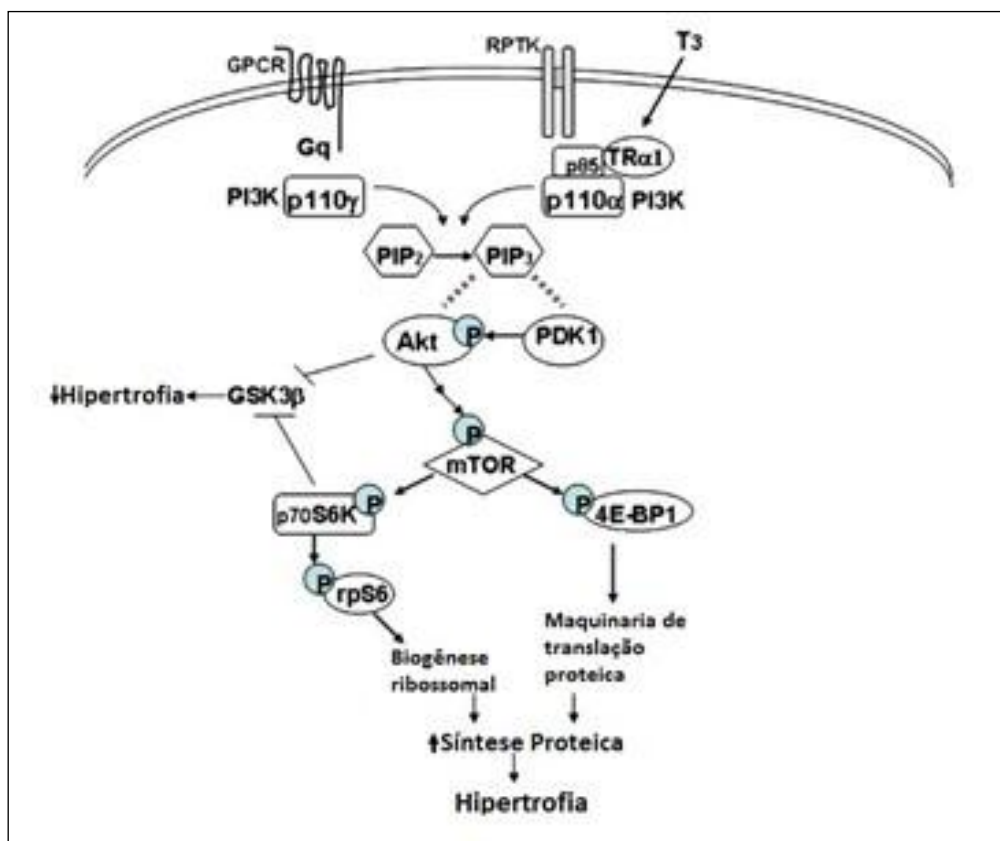


Figura 5: esquema modificado representativo de ação não genômica de T3 em cardiomiócitos. GPCR- receptor acoplado a proteína G; RPTK- fator de crescimento para receptor proteína-tirosina-cinase; T3- tri-iodotironina; p110 γ PI3K- isoforma γ de PI3K; p110 α PI3K – isoforma α de PI3K; Tr α 1- receptor α 1 para hormônio tireoidiano; PIP2-2-fosfatidilinositol difosfato; PIP3-3-fosfatidilinositol trifosfato; GSK-3 β - glicogenio sintase - 3 β ; mTor- mammalian target of rapamycin; 4E-BP1 – proteína de ligação para factor eIF4E (Fonte: OJAMAA, 2010).

O T3 pode atuar no receptor Tr β 1 localizado no citosol e assim ativar a via de fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K) levando ao aumento da atividade da bomba Na⁺/K⁺ATPase na membrana plasmática. E pela mesma via, o T3 leva a transcrição de genes como por exemplo o fator indusível de hipóxia 1 α (HIF α) (DAVIS *et al*, 2008). Seria um exemplo de ação não genômica estimulando a ação genômica. O aumento da expressão do gene HIF1 α , leva à uma adaptação a hipóxia. Como pode ser visto na figura 6, o HT através de ação não genômica age na proteína α V β 3 localizada na membrana celular do endotélio, vai ativar via quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e translocar o Tr β 1 para o núcleo e estimular a angiogênese, aumentando a perfusão do coração, que se estiver sofrendo hipertrofia se beneficia com esse aumento da vascularização (OJAMAA, 2010) promovendo também uma outra forma de adaptação à hipóxia miocárdica .

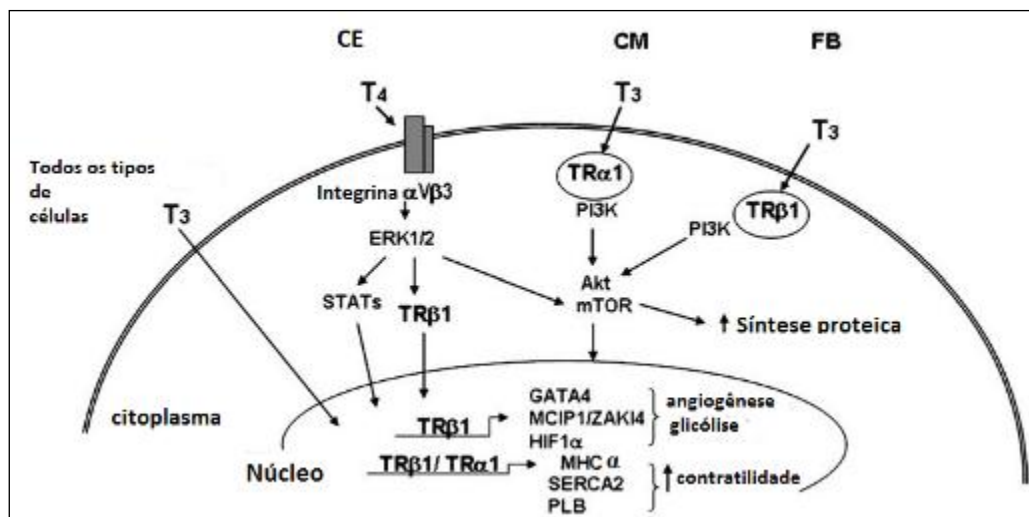


Figura 6: esquema modificado representativo de ação não genômica e genômica do T3 em diversas células (cardiomiócito-CM, Fibroblasto-FB, células endoteliais - CE). T3- tri-iodotironina; T4- tiroxina; ERK- quinase regulada por sinal extracelular; TR $\alpha 1$ - receptor $\alpha 1$ para hormônio tireoideano; TR $\beta 1$ - receptor $\beta 1$ para hormônio tireoideano; PI3k- fofatidilinositol trifosfoato; Akt- proteína cinase B; mTOR- mammalian target of rapamycin; GATA- fator de transcrição codificado pelo gene GATA 4; HIF1 α - fator indusível de hipóxia 1 α ; MHC α - cadeia pesada de miosina α ; SERCA2 - Ca+2 ATPase tipo 2 do retículo sarcoplasmático; PLB- fosfolambam. (Fonte: OJAMAA, 2010).

Na tireotoxicose (mediada por D2 em camundongos transgênicos), o HT também por via não genômica, aumenta a responsividade β -adrenérgica cardíaca aumentando a produção de AMPc que ocorre também após estímulo β -adrenérgico em corações e no tecido adiposo marrom (BIANCO *et al*, 2004).

Com relação ao potencial de ação rápido do miocárdio, na fase 3, há aumento da permeabilidade por potássio influenciando na repolarização da célula miocárdica e redução de seu potencial de ação (JAFFET, 2009). No tratamento com T3 de miócitos isolados de ratos eutireoideos e hipotireoideos há redução da duração do potencial de ação, que ocorre devido aumento da corrente de potássio repolarizante (I_k) levando ao aumento na repolarização. Esta ação de T3 seria por via não genômica que poderia ativar sinalizações que regulam os canais para potássio na membrana plasmática. Porém, por via genômica o HT aumenta a expressão de I_{k1} (canal retificador para potássio) e I_{To} , que podem também explicar a redução da duração do potencial de ação rápido do miocárdio (SUN, *et al* 2000). O aumento da saída de potássio influencia na antecipação do potencial de repouso, podendo a célula disparar um novo potencial de ação. Quanto mais curta se torna a duração do potencial de ação do miocárdio, maior a frequência de disparos de potencial de ação o que pode influenciar na taquicardia visualizada no eletrocardiograma de ratos e pacientes com hipertireotoxicose.

2.1.7 Hipertireoidismo - Alterações Hemodinâmicas e Cardíacas

Em indivíduos com hipertireoidismo pode ocorrer: aumento da frequência cardíaca, do volume sanguíneo, da fração de ejeção e do débito cardíaco; mas há redução da resistência vascular periférica e do tempo de relaxamento isovolumétrico (FAZIO *et al*, 2004).

Em excesso, os HT estão associados com manifestações cardiovasculares como: circulação hiperdinâmica (WOEBER, 1992), aumento contratilidade cardíaca em humanos e animais (KLEIN; DANZI, 2007).

Essa classe de hormônios é angiogênica (como foi descrito anteriormente em ações

não genômicas do HT) em corações de adultos e estimulam crescimento vascular em coração após infarto de ratos (TOMANEK *et al*, 1998).

O aumento moderado de níveis de HT causa aumento da expressão da SERCA 2 (MOOLMAN, 2002) e aumento dos níveis cardíacos de RNAm (ácido ribonucléico classe mensageiro) da cadeia pesada de miosina α (MHC- α), concomitante à redução dos níveis de MHC- β (EVERETT *et al.*, 1984), favorecendo o aumento da contratilidade no miocárdio (PANTOS *et al.*, 2007). A SERCA 2 presente no cardiomiócito é importante para o relaxamento uma vez que ela é importante para o transporte do Ca^{+2} de forma ativa para dentro do retículo sarcoplasmático. Essa mudança ocorre através da regulação pelo HT da transcrição de genes de miócitos que codificam essas estruturas (KLEIN; OJAMAA, 2001). A MHC- α possui atividade de sua ATPase maior e está relacionada à uma maior velocidade de contração (KIM *et al.*, 1999) favorecendo-a. Com base nisso, o tratamento com HT poderia melhorar a função cardíaca no modelo pós-infarto (MAHAFFEY *et al*, 1995) por favorecer a contração e o relaxamento e por converter uma hipertrofia patológica para uma hipertrofia fisiológica nos modelos animais de sobrecarga de pressão cardíaca (CHANG *et al*, 1997).

No hipertireoidismo a relação entre débito cardíaco e pré-carga pode estar preservada (WANG *et al*, 2010). Entretanto no hipertireoidismo tardio essa relação pode não estar bem adaptada e pode ocorrer taquicardia, que causa redução do encurtamento do cardiomiócito, contribuindo para redução da fração de ejeção (HOLUBARSCH *et al*, 1998).

Os HTs em excesso também causam hipertrofia cardíaca pelo seu efeito na proliferação celular (YAMADA-OKABE *et al*, 2003), afetando a contratilidade, podendo levar a falência cardíaca em pacientes hipertireoideos (WANG *et al*, 2010).

Há estudos que relatam que Tiroxina em excesso aumenta a susceptibilidade à apoptose, reduzindo a contratilidade de cardiomiócitos (WANG *et al.*, 2010), levando ao aumento da área focal de fibrose no coração de ratos (GOMBERG-MAITLAND & FRISHMAN, 1998), podendo indicar reparo após apoptose ou necrose de cardiomiócitos no miocárdio ventricular. Já foi mostrado que em excesso de T4 pode ocorrer ativação da via da caspase para induzir apoptose (YAMADA-OKABE *et al.*, 2003). Em cardiomiócitos neonatais de ratos, T3 inibiu a expressão de PKC ϵ (proteína quinase ϵ) (RYBIN; STEINBERG, 1996), fator que protege contra apoptose em cardiomiócitos (DORN; BROWN, 1999, in WANG *et al*, 2010) ressaltando esse efeito apoptótico do T3. Uma alta taxa de apoptose de cardiomiócitos hipertrofiados pode ser outro fator que contribui para a falência cardíaca no hipertireoidismo (WANG *et al*, 2010).

O HT reduz as correntes do canal de Ca^{+2} tipo L no átrio esquerdo, resultando em encurtamento do potencial de ação e na maior susceptibilidade ao estabelecimento de circuitos de reentrada (WATANABE *et al* 2003) e fibrilação atrial, os quais apresentam maior incidência em pacientes com hipertireoidismo em comparação à população saudável (CHEN *et al*, 2011). Neste evento, o HT atua via receptor para hormônio tireoidiano (Tr) podendo suprimir a via dependente de proteína de ligação a elemento responsivo a AMPc (CREB) reduzindo a expressão da subunidade α de canais de Ca^{+2} tipo L (CHEN *et al*, 2011). A redução na expressão dos canais de Ca^{+2} pode proteger o cardiomiócito de uma sobrecarga de cálcio, mas em oposição, resulta no encurtamento do potencial de ação e na refratariedade atrial (YUE *et al*, 1997).

Ainda com relação ao átrio esquerdo de corações hipertireoideos, mudanças hemodinâmicas como elevação da pressão do átrio (por exemplo secundário a um aumento na massa ventricular esquerda) é sugerido também constituir risco aumentado para fibrilação atrial (KAHALY; DILLMANN, 2005).

2.1.8 Hipotireoidismo - Alterações Hemodinâmicas e Cardíacas

No hipotireoidismo induzido, a redução da demanda por oxigênio é um importante fator protetor da injúria tecidual devido à redução da produção de radicais livres reativos (ÍSMAN *et al.*, 2003). Além disso, no estado metabólico reduzido há proteção contra o dano oxidativo causado por espécies reativas ao oxigênio (OREN *et al.*, 1996), protegendo os tecidos da peroxidação lipídica (SWAROO; RAMASARMA, 1985). Há diversas evidências de que através de ação na imunidade mediada por células, o hipotireoidismo pode causar este efeito protetor (ÍSMAN *et al.*, 2003).

Em indivíduos com hipotireoidismo (FAZIO *et al.*, 2004), é comum ocorrer: redução da frequência cardíaca, volume sanguíneo, fração de ejeção e débito cardíaco. Porém pode haver aumento da resistência vascular periférica e do tempo de relaxamento cardíaco.

A redução crônica do hormônio tireoidiano leva a disfunção ventricular, dilatação da câmara ventricular (TANG *et al.*, 2005), bradicardia, injúria na contratilidade cardíaca (KLEIN, 2003) e com isso redução do débito cardíaco (LIU & GERDES, 1990; KLEIN, 2002 in TANG *et al.*, 2005).

A redução da contratilidade e atraso no relaxamento isovolumétrico em corações de hipotireoideos, resulta da redução da expressão de SERCA 2 e aumento da expressão da fosfolambam (KLEIN & DANZI, 2007). Possivelmente, essa mudança na expressão dessas 2 proteínas possa influenciar em uma alteração na função diastólica.

Também é conhecido que devido ao hipotireoidismo ocorrem vários efeitos eletrofisiológicos como: bloqueio átrio-ventricular, prolongamento do intervalo QT e limiares de estimulação atrial elevados. Este aumento do intervalo QT é um parâmetro eletrocardiográfico que está associado com o risco aumentado para o desenvolvimento de arritmia ventricular maligna (PATTON *et al.*, 2008).

O hipotireoidismo promove fibrose do miocárdio, estimulando os fibroblastos, enquanto que o oposto é verdadeiro com relação ao hipertireoidismo. O HT reduzido pode estimular também fibrose miocárdica e aumento da expressão do colágeno (WU *et al.*, 2007).

Em animais submetidos ao hipotireoidismo tratados com propiltiouracil (uma droga anti-tireoidiana), a redução do HT aumentou a resistência arteriolar, causou impedimento no fluxo coronariano e reduzida densidade de arteríolas (TANG *et al.*, 2005). Hipotireoidismo crônico em ratos adultos leva à perda de arteríolas coronarianas. Com o fluxo sanguíneo prejudicado, ocorre uma má adaptação dos cardiomiócitos, e desenvolvimento de insuficiência cardíaca (GERDES & IERVASI, 2010).

Há uma associação entre a mortalidade por doença coronariana, e baixa função tireoidiana em mulheres (ASVOLD *et al.*, 2008) e o hormônio tireoidiano reduzido pode contribuir para falência cardíaca (BIONDI & KLEIN, 2004).

Assim tanto o hipertireoidismo e hipotireoidismo podem levar a lesão cardiovascular, incluindo falência cardíaca. Devido ao *status* endócrino e condição cardíaca ocorrem modificações estruturais adaptativas que podem estar sendo adequadas ou não ao coração e ao organismo. Assim, há um conjunto de informações que precisam ser avaliadas com relação ao coração em condições como hipertireoidismo e hipotireoidismo. Alterações nos hormônios tireoidianos por longo período podem levar a modificações adaptativas ao miocárdio com consequências à cardioproteção. Os mecanismos pelos quais o hormônio tireoidiano e o quanto seu *status* pode contribuir para a cardioproteção merece maior investigação.

2.2 Acoplamento Excitação-Contração

O coração é uma bomba que recebe e ejeta sangue devido aos eventos de diástole e sístole do miocárdio comandados pelo marcapasso nodo sinusal e sofrendo modulação pelo sistema nervoso autonômico. O estímulo para a sístole chega na forma de despolarização. O potencial de ação se propaga pela membrana pelos túbulos transversos e ao chegar nos receptores dihidropiridínicos (I_{CaL} - canais de cálcio tipo lento), alteram a permeabilidade da membrana; e causa aumento da $[Ca^{+2}]_i$ ou seja influxo de Ca^{+2} . Esse aumento causa ativação dos receptores de rianodina tipo 2 (RyR2). Os RyR 2 se encontram na membrana do retículo sarcoplasmático; e sua ativação causa liberação de Ca^{+2} para o sarcoplasma. Se a liberação de Ca^{+2} for alta estará disponível para a contração do músculo. Como pode ser visto na figura 7A, no retículo sarcoplasmático do cardiomiócito existe também uma ATPase denominada Ca^{+2} ATPase do retículo sarcoplasmática (SERCA 2) que através de consumo de ATP bombeia Ca^{+2} para seu interior causando relaxamento do músculo (VASSALLO *et al*, 2008). A SERCA é regulada através da fosfolambam. Quando esta é fosforilada, ocorre desligamento entre SERCA e fosfolambam, permitindo a entrada de Ca^{+2} para dentro do retículo sarcoplasmático, sendo este evento importante para a diástole (REED *et. al*, 2000).

A miosina possui uma enzima com atividade de ATPase (hidrólise de ATP) inserida na cadeia pesada da meromiosina pesada que é parte da miosina (VASSALLO *et al*, 2008). Com a presença de ATP e Ca^{+2} , este se liga a troponina C, e com isso ocorre o deslizamento da tropomiosina deixando livre o sítio da actina para ligação à miosina como pode ser visto na figura 7B. A miosina ao se ligar a actina ativa sua ATPase e com isso formam-se pontes cruzadas (entre actina e miosina) e contração (sístole). Devido a hidrólise de ATP há liberação de ADP + Pi. Se houver fornecimento de ATP, a actina se desliga da miosina (relaxamento ou diástole). O ATP se liga a miosina, ocorre clivagem do ATP e liberação de fosfato inorgânico (Pi). O ciclo continua até que a SERCA 2 bombeie Ca^{+2} de volta para o retículo sarcoplasmático. Com a presença de Ca^{+2} (REGNIER *et. al* 2004), este se mantém ligado a Troponina C, estabilizando a tropomiosina em um estado aberto e ativo de forma a manter a actina livre para a interação com a miosina, mantendo as pontes cruzadas (entre actina e miosina) mais fortes.

O trocador NCX é encontrado em todas as células na membrana plasmática e na membrana do retículo sarcoplasmático. Este trocador contribui pra o equilíbrio na $[Ca^{+2}]_i$ (concentração intracelular de Ca^{+2}) causando efluxo de Ca^{+2} (REED *et. al*, 2000) e contribuindo para evitar o acúmulo excessivo de $[Ca^{+2}]_i$.

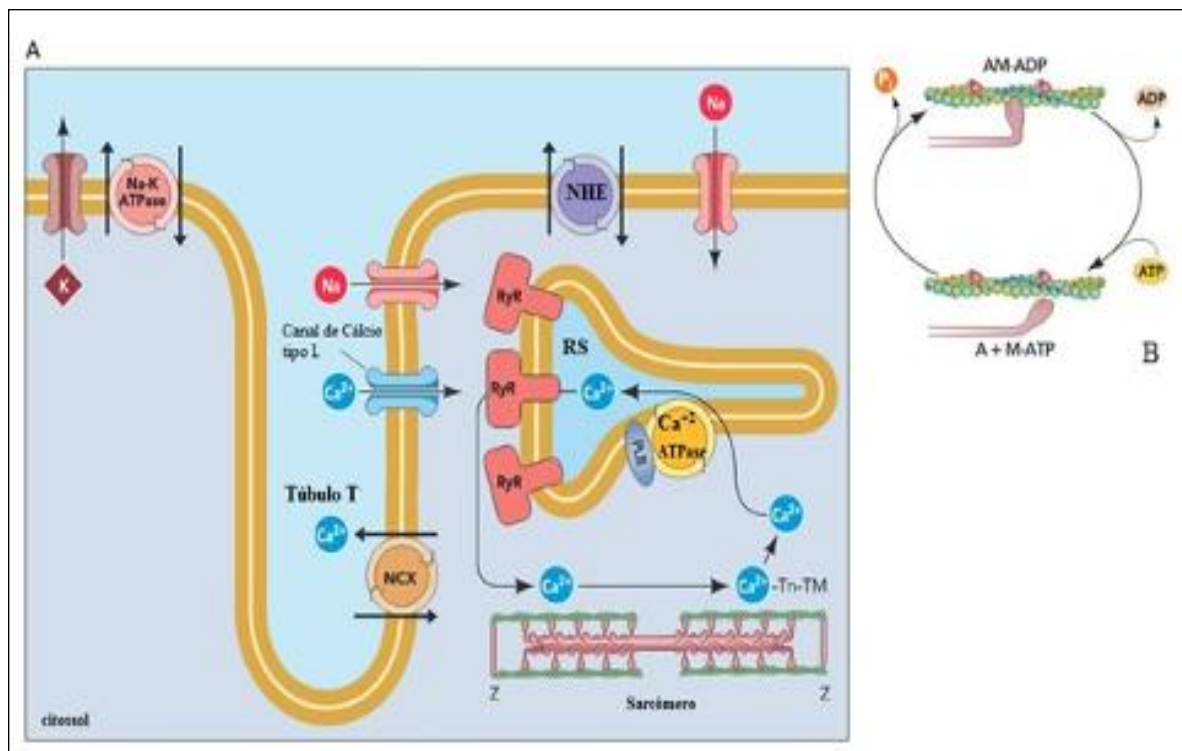


Fig7: esquema modificado demonstrando: A- acoplamento excitação-contracção no miocárdio;B- pontes cruzadas entre miosina e actina. Na⁺/K⁺ATPase - bomba de sódio-potássio ATPase; NCX-trocador de sódio/cálcio; RyR- receptor de rianodina; RS- retículo sarcoplasmático;NHE- trocador de sódio/hidrogênio; Ca²⁺ATPase-; PLB - fosfolambam; Tn-Tm- complexo troponina- tropomiosina; AM-ADP- complexo actina-miosina- adenosina difosfato; A- actina; M-ATP- complexo miosina- adenosina trifosfato; Pi - fosfato inorgânico; ADP- adenosina difosfato; ATP- adenosina trifosfato (Fonte: KANG et al, 2007).

2.3 Isquemia e Reperfusão

O estudo da isquemia e reperfusão é importante devido a alta taxa de doenças cardiovasculares com obstrução de artérias coronárias, como por exemplo arterioesclerose e aterosclerose, podendo levar ao impedimento do fluxo coronariano e infarto do miocárdio.

A doença isquêmica cardíaca causada por interrupção do fluxo sanguíneo está prevista por se tornar a principal causa de mortes no mundo em 2020 (MURRAY & LOPEZ, 1997).

Nos Estados Unidos, aproximadamente um milhão de pessoas por ano sofrem infarto do miocárdio. Além disso, 700 pacientes (por ano) passam por cardioplegia devido a serem submetidos a cirurgias cardíacas (TURER & HILL, 2010). Na cardioplegia utiliza-se a parada do coração para realização de cirurgias com uso de soluções protetoras ao coração.

Em raros casos, pacientes com dor no peito, alterações no eletrocardiograma associados com hipertireoidismo pode sugerir isquemia miocárdica (CHOI *et al*, 2005). No caso de hipotireoidismo, este tem sido associado com elevados níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL) séricos e risco de doenças cardiovasculares (ASRANNA *et al*, 2012).

A falta de fluxo de sangue provoca isquemia no tecido. Na isquemia há um desequilíbrio entre suprimento e demanda de oxigênio (O₂), resultando em dano e disfunção tecidual. Como tratamento utiliza-se a restauração do fluxo de sangue que também causa lesão no tecido denominada de injúria de isquemia e reperfusão. Como exemplo, na resolução de arteriosclerose, após cateterismo de vasos ou quando um trombo se solta de um vaso obstruído há injúria de reperfusão.

A lesão de isquemia e reperfusão pode se manifestar através de: arritmias perigosas tais como taquicardias ventriculares e fibrilação, reduzida força de desenvolvimento da contratilidade do miocárdio e aumento da área de morte celular (ROBERTS & CHRISTINI, 2011).

Esta lesão de isquemia e reperfusão induz estresse oxidativo. Pode ser visto na figura 8 que uma explosão de espécies reativas de oxigênio (Eros) ou radicais livres após a reperfusão do miocárdio isquêmico é suficiente para induzir a morte celular (ROBIN *et al.*, 2007).

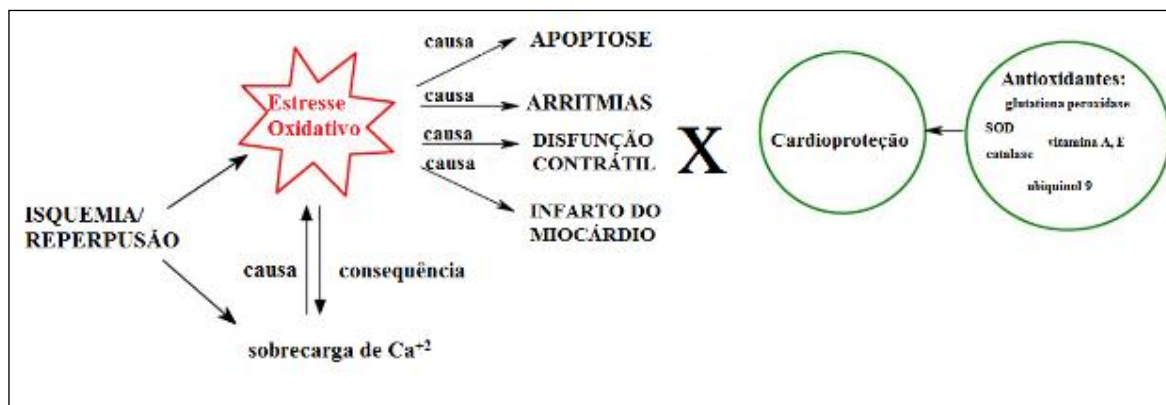


Figura 8: esquema modificado demonstrando os efeitos da isquemia e reperfusão no miocárdio. SOD-Superóxido dismutase. (Fonte: VALKO *et al.*, 2007).

No miocárdio as três maiores fontes de geração de radicais livres são: xantina oxidase (presente principalmente nas células endoteliais); cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias de cardiomiócitos e NADPH oxidase de leucócitos (ZWEIER & TALUKDER, 2006).

Devido à redução do fluxo sanguíneo, há diminuição da tensão de O₂ e formação de Eros pelas mitocôndrias. Como pode ser visto na figura 9, na isquemia, o consumo excessivo de ATP leva à formação de xantina e hipoxantina, que na reperfusão, e devido ao influxo de O₂, serão metabolizados pela xantina oxidase e haverá produção de grande quantidade dessas substâncias (Eros) (GRANGER *et al.*, 2001 in VALKO *et al.*, 2006). Assim, devido às Eros liberadas, e com a restauração do fluxo sanguíneo após um período de oclusão coronariana ocorre dano ao miocárdio (VALKO *et al.*, 2006).

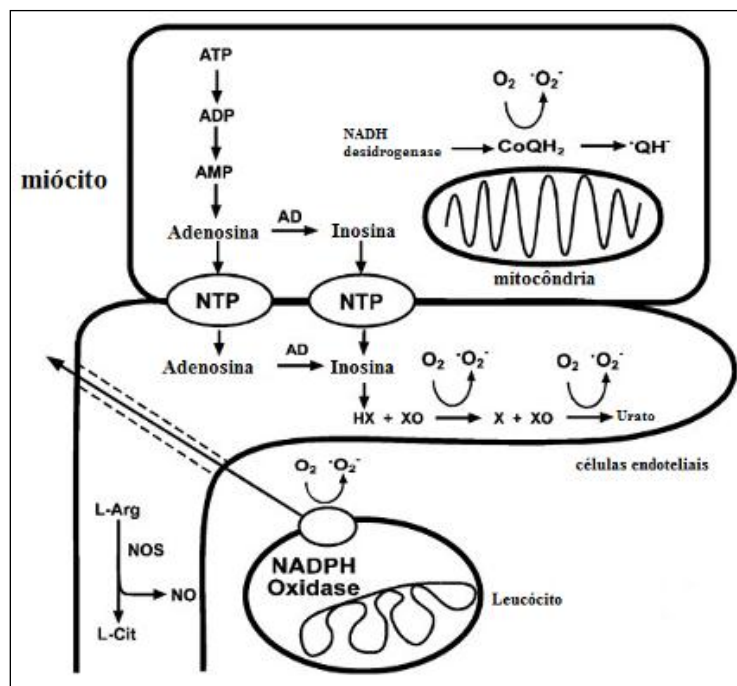


Figura 9: esquema modificado representando mecanismo molecular de geração de radicais livres. ATP- adenosina trifosfato; ADP- adenosina difosfato; AMP- adenosina monofosfato cíclico; NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase –oxidase; HX- hipoxantina; XO- xantina oxidase; O_2 - peróxido ; L arg- L arginina; L cit – L citrulina- NO- óxido nítrico; NOS- óxido nítrico sintetase; AD- adenosina deaminase ; NT – transportador de nucleotídeo; $CoQH_2$ – ubiquinona CoQ (Fonte: ZWEIER & TALUKDER, 2006).

Durante a isquemia o oxigênio se esgota. As células iniciam metabolismo anaeróbico que produz um saldo menor de ATP, com progressão para acidose metabólica. O trocador trocador sódio-hidrogênio (NHE) localizado na membrana plasmática causa efluxo de prótons (H^+) e influxo de Na^+ . Além disso, há aumento do efluxo de K^+ via K_{ATP} (canal de potássio sensível a ATP) devido a sua inativação, e reduzida atividade da bomba de Na^+/K^+ ATPase. Assim, há aumento de $[Na^+]$ intracelular e aumento da $[K^+]$ extracelular o que contribui para reduzir a duração do potencial de ação. Pode ser visto na figura 10 que devido ao aumento de $[Na^+]$ intracelular, o trocador de Sódio Cálcio (NCX) também localizado na membrana plasmática começa a trabalhar no modo reverso, aumentando o influxo de Ca^{+2} causando uma sobrecarga de cálcio intracelular (ROBERTS & CHRISTINI, 2011). Esta sobrecarga de cálcio intracelular está associada a liberações espontâneas de cálcio e arritmias cardíacas (ORCHARD & CINGOLANI, 1984 in ROBERTS & CHRISTINI, 2011).

Além da atuação de NCX no modo reverso, a ocorrência de entrada de Ca^{+2} através do canal de Ca^{+2} tipo L pode contribuir para o aumento da $[Ca^{+2}]_i$ durante a isquemia (CHEN *et al.*, 2005 in MURPHY & STEENBERGEN, 2008). Essa sobrecarga de Ca^{+2} intracelular no início da reperfusão resulta em hipercontratura e morte celular (MOENS *et al.*, 2005 in ROBERTS & CHRISTINI, 2011).

Durante a isquemia cardíaca, a célula miocárdica sofre danos e inclusive em suas mitocôndrias. A mitocôndria possui uma membrana interna que é impermeável (FRANK *et al.*, 2012). Na membrana interna da mitocôndria existe um poro denominado de poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTM). Esse poro é formado por um canal dependente de voltagem. Sob condições fisiológicas este se apresenta fechado e se abre na presença de sobrecarga de cálcio intracelular (HEUSCH *et al.*, 2010) que ocorre devido a acidose.

Durante a isquemia parte do ATP é consumido, mas sua energia é utilizada para

manter o potencial de membrana mitocondrial (MURPHY & STEENBERGEN, 2008) . Sendo que neste momento de isquemia o poro se encontra fechado. Porém na reperfusão, como pode ser visto na figura 11, com a restauração do pH, ocorre abertura deste poro nos 5 minutos iniciais (FRANK *et al*, 2012). Quando o pH é restaurado esse $[Ca^{+2}]_i$ em excesso iniciará a ativação do PTM (HALESTRAP *et al*, 1997 in SCHRIEWER *et al*, 2013). A ciclosporina é uma droga imunossupressora, atua no PTM e previne danos na membrana mitocondrial devido a sobrecarga de cálcio intracelular, reforçando assim a importância do preservação mitocondrial (BOBADILLA *et al*,2001).

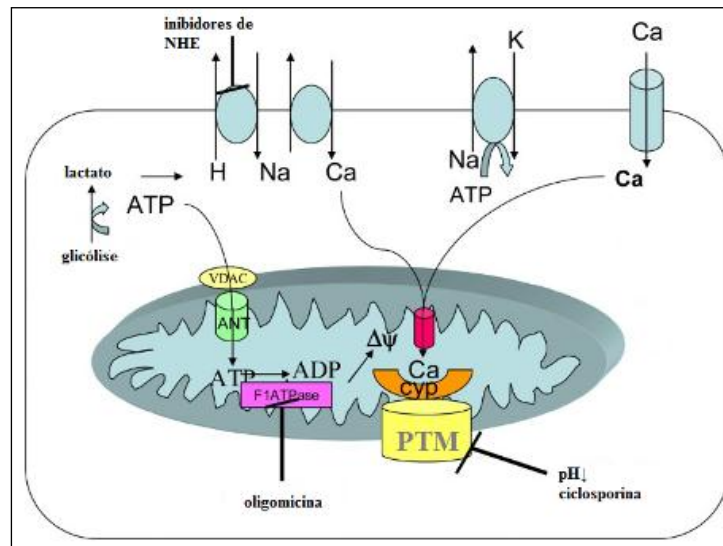


Figura10: esquema modificado demonstrando alterações que ocorrem na membrana citoplasmática e na mitocôndria principalmente ativação do poro de transição mitocondrial após lesão de isquemia e reperfusão. NHE- trocador de sódio e hidrogênio;ATP- adenosina trifosfato; ADP- adenosina difosfato;PTM- poro de transição de permeabilidade mitocondrial;pH-potencial hidrogeniônico (Fonte: MURPHY & STEENBERGEN, 2008).

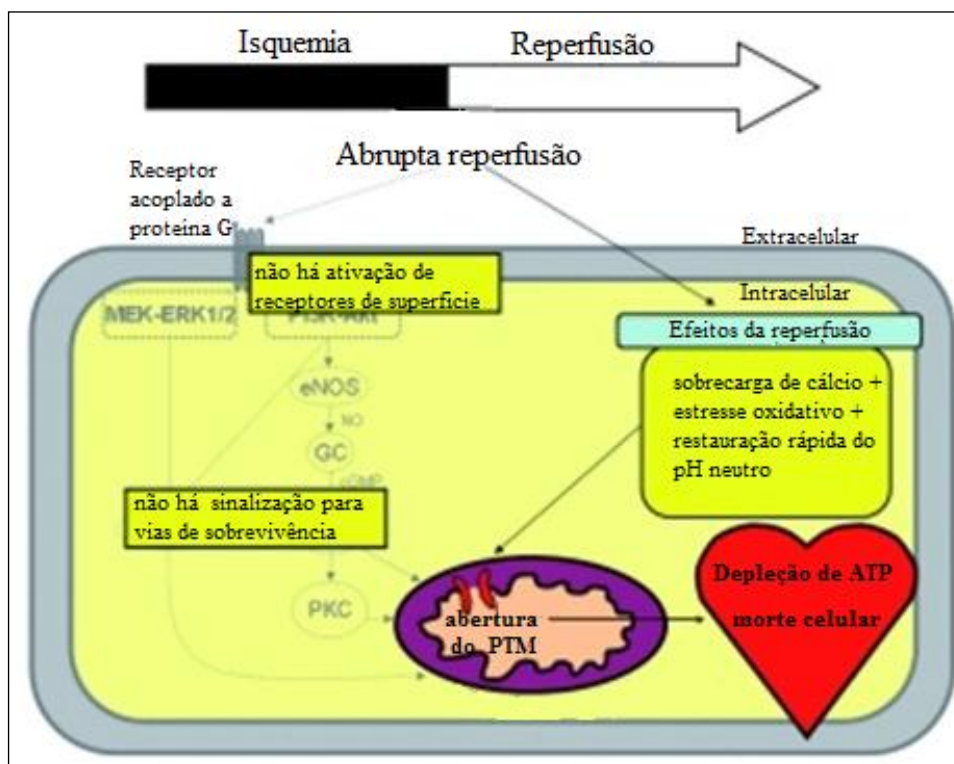


Figura 11: imagem modificada demonstrando isquemia e reperfusão, ativação e abertura do poro de transição mitocondrial, que ocorrem devido a sobrecarga de Ca^{+2} + estresse oxidativo + restauração do fluxo de sangue e do pH-potencial hidrogeniônico. ATP- adenosina trifosfato; PTM- poro de transição de permeabilidade mitocondrial (Fonte: YETGIN *et al*, 2010).

A abertura do PTM representa o maior componente de regulação de degeneração de organelas e de necrose de cardiomiócitos (SHAHEEN *et al*, 2011).

Além da sobrecarga de $[\text{Ca}^{+2}]_i$, como pode ser visto na figura 12, a excessiva quantidade de Eros decorrente da reperfusão também causa abertura do PTM (SCHRIEWER *et al*, 2013), levando a um colapso no potencial de membrana mitocondrial (ZOROV *et al*, 2006). Além disso, o aumento de Eros durante isquemia e reoxigenação ocorre devido a danos nos componentes da cadeia de transportadora de elétrons presente na mitocôndria, resultando em ineficiente transferência de elétrons, perda da função mitocondrial, queda de ATP e mais geração de superóxidos (MURPHY & STEENBERGEN, 2008).

Assim, a abertura do PTM ativada por excessiva $[\text{Ca}^{+2}]_i$ é favorecida por altas concentrações de fosfato inorgânico, Eros, óxido nítrico e uma redução do potencial da membrana interna mitocondrial. Essas condições em conjunto acontecem durante a isquemia e reperfusão do miocárdio (HEUSCH *et al*, 2010) e irão levar a morte celular.

Seguido a injúria de isquemia e reperfusão, radicais livres que foram formados dispararão a injúria celular. Radicais livres causam lipoperoxidação que causa danificação da membrana celular e inchaço celular. Em virtude de seu elétron não emparelhado, os radicais livres são instáveis, reativos e de curta duração. As Eros além de prejudicar as células, levam a peroxidação de lipídios de membrana, desnaturação de proteínas, incluindo enzimas e canais iônicos, e danificação ao DNA (ZWEIER & TALUKDER, 2006).

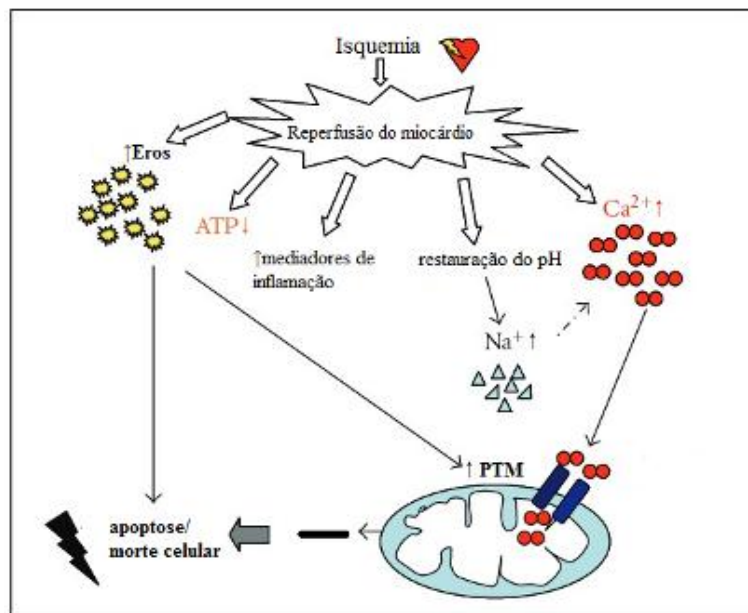


Figura 12: imagem modificada demonstrando isquemia e reperfusão, abertura do PTM e morte celular. ATP- adenosina trifosfato; Eros- espécies reativas de oxigênio; pH - potencial hidrogeniônico; PTM- poro de transição de permeabilidade mitocondrial (Fonte: WHITTINGTON et al, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Considerando que o hormônio tireoidiano exerce efeitos importantes no sistema cardiovascular, o objetivo central deste estudo foi investigar se alterações no *status* tireoidiano poderiam alterar a suscetibilidade ao infarto dos corações de ratos submetidos ao modelo de isquemia-reperfusão.

A isquemia e reperfusão é modelo clínico de infarto com manobras invasivas de reperfusão. Com esse modelo de isquemia e reperfusão é possível analisar as lesões que acontecem durante e posteriormente ao evento.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a função cardíaca e o grau de lesão miocárdica de corações isolados de ratos hipertireotóxicos e hipotireoideos.

2. Estudar o efeito da alteração do *status* tireoidiano sobre as arritmias cardíacas de reperfusão em corações isolados de ratos hipertireotóxicos e hipotireoideos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar machos, adultos (> 45 dias), peso entre 87 a 157 gramas. Os animais utilizados eram procedentes do Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFRRJ. Os animais permaneceram em sala climatizada ($\pm 27^{\circ}\text{C}$), sob controle de claro e escuro (12 horas por período), com água e ração *ad libitum*. O protocolo de estudo foi aprovado pelo comitê de ética institucional IBCCF194-07/16.

A idade de 45 dias para os animais foi necessária para que os animais pudessem ser tratados e após o tratamento tivessem mais do que 2 meses (180 e 200 gramas) o que estava de acordo com técnica realizada em outros estudos com coração isolado (ZIVKOVIC *et al* , 2013).

4.2 Pesagem dos animais e consumo

Os animais foram pesados em balança digital (Marte A500) no primeiro dia de tratamento, depois a cada 3 dias e no dia da eutanásia.

A ingestão de água dos animais foi realizada diariamente no mesmo horário. Este consumo definimos como quantidade de água ingerida pelos animais durante 24 horas. Sendo que esta água continha Metimazol (grupo MMZ); ou Tiroxina + NaOH (grupo T4) ambos diluídos em água destilada; ou água destilada + Na OH (grupo controle).

4.3 Protocolo Experimental

Os animais foram divididos em 3 grupos: hipertireoideos (Grupo T4, n=17), hipotireoideos (Grupo MMZ, n= 14) e eutireoideos (Grupo controle, n=18). A tireotoxicose foi induzida por T4 na concentração de 12 mg/L (BARALDI *et. al* 2013) e o hipotireoidismo induzido por metimazol na concentração de 300mg/L (NAM *et. al* 2012), ambos administrados na água de beber por 35 dias (figura 15). O metimazol é um fármaco do grupo das tionamidas. Foi utilizado neste estudo por ser um fármaco inibidor da tireoperoxidase (BANDYOPADHYAY *et al*, 2002), enzima que atua na síntese do HT e por isso esse fármaco é capaz de reduzir o HT plasmático.

O hipertireoidismo pode ser primário (tireoide executando sua função em excesso) ou secundário (o hipotálamo ou hipófise estimulando em excesso a tireoide); nos dois casos há aumento de T4 séricos. Na tireotoxicose utilizada em nosso modelo também há aumento de T4 sérico porém este aumento não foi devido ao estímulo da tireoide, uma vez que o T4 era administrado por via oral, era absorvido e portanto ficava circulante.

Para a diluição da solução do grupo controle, nós utilizávamos 4 gramas de NaOH diluídos em 50ml de água destilada. Após diluição, nós transferíamos a solução para um balão volumétrico e avolumávamos até obter uma solução de 100ml que ficava estocada em geladeira. Desta solução nós retirávamos 5 ml e avolumávamos até 200 ml que era transferida para uma garrafinha de beber que era utilizada para o grupo controle.

Para a diluição da solução do grupo T4, nós diluíamos 2,75 miligramas de T4 adicionados a 5 ml da solução estoque de NAOH e avolumávamos até obter 200 ml pra uma garrafinha. Esta garrafinha era utilizada para o grupo T4.

Para a diluição da solução do grupo MMZ, nós pesávamos 2100 mg de metimazol adicionados a 7000 ml de água pura que ficava estocada. Desta solução estoque nós retirávamos 200 ml para preencher a garrafinha de água de beber para o grupo MMZ.

Durante 2,5 semanas os animais eram tratados na UFRRJ e as semanas seguintes foram conduzidos para a UFRJ (Universidade Federal do Rio de Janeiro) para que os animais fossem ambientados. Assim durante as 5 semanas do tratamento, o peso corporal e o consumo dos animais era mensurado com a frequência relatada anteriormente.

Após o período de tratamento, os animais foram submetidos à injeção IP (intraperitoneal) de heparina (heparina sódica 5000 UI/ml :1 ml /Kg). Cinco minutos após, foram submetidos à inalação por CO₂ e eutanásia por meio de decaptação em guilhotina para que fosse realizada toracotomia, retirada do coração, e o coração isolado fosse canulado em aparato de Langendorff modificado. Todo o procedimento foi realizado em ambiente tranquilo, com imediata inconsciência seguida de morte, seguindo as normas da Resolução 1000 do CFMV (Conselho Federal de Medicina Veterinária) de 2012. A utilização do método de guilhotina foi realizado por ser um artifício pelo qual é possível ser coletado o máximo de sangue para as dosagens séricas que serão descritas a seguir e para que o coração pudesse ser facilmente excisado por toracotomia sem sofrer hemodinamicamente e/ou lesão por demora do procedimento. Uma vez que haja demora na retirada do coração (no caso de se fazer coleta de sangue por flebotomia), este sofre estímulos iniciais que podem levar a cardioproteção comprometendo todo o experimento.

4.3.1 Coleta de sangue

Logo após a toracotomia, os animais tiveram o sangue coletado para as dosagens de T4 e T3 séricos pela técnica de radioimunoensaio (RIE) utilizando kits específicos. Através dessas dosagens foi possível determinar se houve alterações dos níveis hormonais para confirmar tireotoxicose e hipotireoidismo nos grupos experimentais .

4.3.2 Biometria

Para que fosse realizada a biometria, os animais foram pesados como já descrito anteriormente. Foi realizada pesagem dos corações em balança digital (Marte A500) e medição do comprimento da tibia. Foram realizadas a razão do peso do coração/peso corporal e razão peso do coração/comprimento da tibia para medição de índice indireto de hipertrofia cardíaca.

4.3.3 Protocolo Experimental – coração isolado

Neste estudo foi utilizada técnica de Langendorff modificada ou técnica de coração isolado modificada. A preparação do coração isolado modificada proporciona estudos com pesquisa cardiovascular, farmacologia, incluindo estudos com lesão de isquemia e reperfusão, terapia celular e transplante cardíaco (SKRZYPIEC-SPRING *et al.*, 2007). Sendo que no nosso trabalho nós estudamos lesão de isquemia e reperfusão como modelo de indução de infarto.

Para que fosse realizada a técnica, após a toracotomia e coleta do sangue, os corações dos ratos foram retirados rapidamente e submersos em solução de Krebs-Henseleit modificada [NaCl (118 mM), KCL (4,7 mM), NaHCO₃ (25 mM), KH₂PO₄ (1,2 mM), MgSO₄ (1,2mM), glicose (10 mM) e CaCl₂ (1,8mM)], saturada com mistura carbogênica (95% O₂ +5 % CO₂) para ajustar o pH em 7,4 e aquecida a 37°C. Esses corações foram pesados e a seguir, rapidamente a aorta era canulada para que fosse realizada técnica modificada de Langendorff (PANTOS *et al.*, 2000). Como demonstrado na figura 13, a aorta era perfundida com fluxo constante de 10 ml/min de forma retrógrada com a solução de Krebs-Henseleit modificada

através de uma bomba peristáltica (Gilson, Miniplus 3). Um balão de látex era inserido no ventrículo esquerdo através de uma incisão no átrio esquerdo para que fosse medida a pressão dentro do ventrículo esquerdo. Este balão era conectado por uma cânula, que estava conectada à um transdutor de pressão (PT 300, Grass Technologies). O volume deste balão era preenchido com água destilada para que a pressão ventricular atingisse pressão diastólica inicial de 10 mmHg. Este transdutor era conectado a um amplificador (ML 110 ADInstruments), que era conectado a um conversor digital analógico (PowerLab 400, ADInstruments). Assim os registros eram digitalizados e armazenados em computador para posterior análise através do programa Chart 4.0 (ADInstruments). Logo após a inserção do balão de látex, e verificada a pressão diastólica intraventricular de 10 mmHg os corações eram imersos novamente em solução de Krebs.

Os corações eram perfundidos com solução de Krebs modificada durante 5 minutos iniciais (período de estabilização), seguido por 25 minutos (período controle ou basal), isquemia global de 30 minutos e reperfusão de 1 hora como demonstrado na figura 14. A isquemia era realizada por parada do fluxo da bomba de infusão e a reperfusão por retorno da ligação desta. A isquemia e reperfusão foi realizada com o objetivo de avaliar se os corações dos ratos dos 3 diferentes grupos estariam mais ou menos susceptíveis ao insultos causados pela injúria.

4.4 Eletrocardiograma *in vitro*

Durante o experimento no coração isolado foi medida a atividade elétrica do coração através de eletrodos imersos na solução próximo ao epicárdio para que fossem analisadas as arritmias de reperfusão. O eletrodo negativo era colocado próximo ao átrio direito e o eletrodo positivo era colocado próximo ao ápice ventricular. Era imerso em solução um fio terra de forma que os três eletrodos eram mantidos em distâncias equivalentes para obtermos o melhor registro possível. Os sinais elétricos eram conduzidos através dos eletrodos até um amplificador (Bioamp 136, AD Instruments). Após a amplificação, os sinais eram digitalizados (Powerlab 400) e gravados no computador para análise no programa Chart 4.0 (AD Instruments).

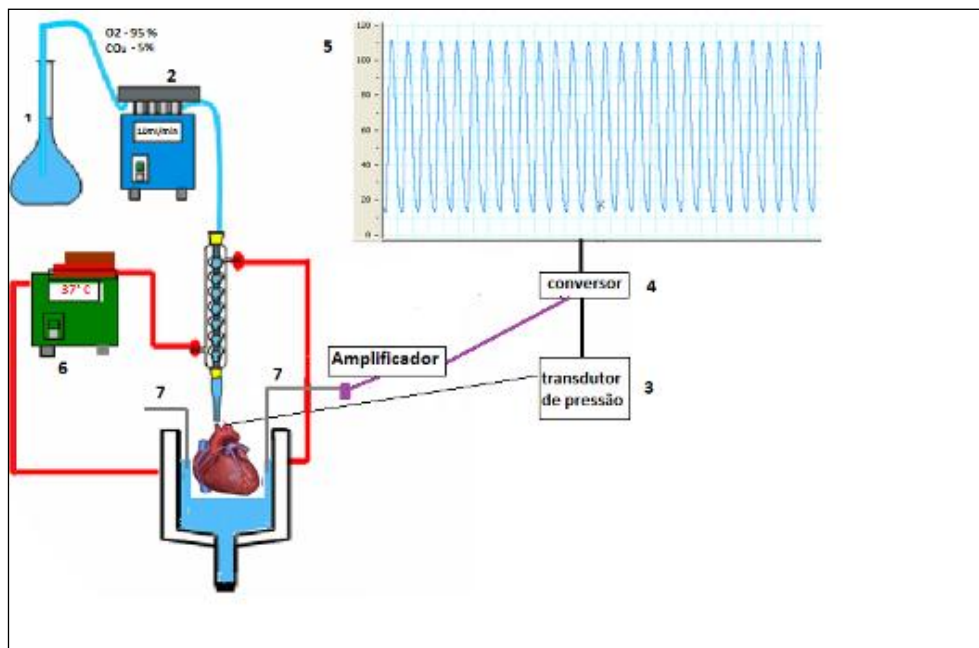


Figura 13: Representação esquemática da preparação de coração isolado (Langendorff) modificado e aparelhos de aquisição de dados. 1- solução de Krebs; 2- bomba de infusão; 3- transdutor de pressão; 4- Conversor A/D; 5- Registro da Pressão Intraventricular; 6 - bomba de aquecimento; 7- eletrodos. Imagem cedida gentilmente pelo Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca Antonio Paes de Carvalho (IBCCF-UFRJ).

Estabilização	Basal	Isquemia	Reperusão
5 minutos	25 minutos	30 minutos	60 minutos

Figura 14: Esquema demonstrando o protocolo de isquemia e reperusão no qual foram realizados 5 minutos de perfusão durante a estabilização, seguidos de 25 minutos de perfusão durante o período basal, 30 minutos de isquemia e 60 minutos de reperusão.

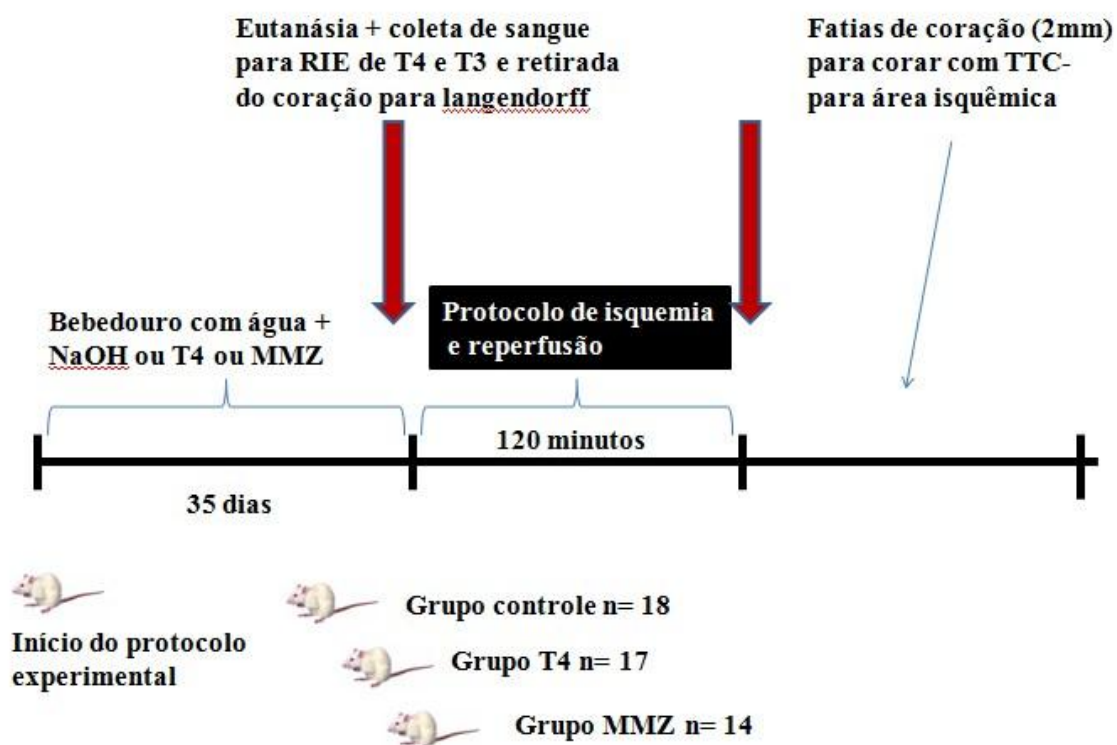


Figura 15: Esquema demonstrando o protocolo de todo o experimento: os animais foram tratados durante 35 dias. No término do tratamento, todos os animais foram submetidos a eutanásia e seus corações foram canulados para que fosse realizada isquemia e reperfusão pela técnica de Langendorff modificada. Ao fim de todo o experimento os corações foram corados com TTC para análise da área de infarto. RIE- radioimunoensaio; T4- tiroxina; T3- tri-iodotironina; NaOH- hidróxido de sódio; TTC- trifeniltetrazólio

4.4.1 Análise das arritmias de reperfusão

O registro do eletrocardiograma dos corações isolados foi analisado porque após a injúria de isquemia e reperfusão é comum ocorrerem arritmias. Estes registros foram analisados durante os 30 primeiros minutos de reperfusão (descartando o primeiro minuto). Estes registros foram analisados de acordo com o guia de estudos de arritmias experimentais: Convecção de Lambeth (WALKER *et. al*, 1988). As arritmias foram classificadas em: batimentos ventricular prematuro (BVP); bigeminismo (BG), salvas (SS); taquicardia ventricular (TV) e fibrilação ventricular (como demonstrados nas figuras 17 a 21). Com a relação as taquicardias ventriculares foi contado o tempo de sua duração.

a) ritmo sinusal – batimento com onda P seguido de complexo QRS normal.



Figura 16: imagem demonstrando registro de eletrocardiograma, com presença de ritmo sinusal

b) BVP- são batimentos ventriculares isolados, com complexo QRS (despolarização ventricular) prematuro, que não é precedido por onda P (despolarização dos átrios). Os BVP normalmente possuem QRS anormais, prolongados e bizarros.



Figura 17: imagem demonstrando registro de eletrocardiograma com presença de BVP (apontado por seta)

c) Bigeminismo: variante do batimento ventricular prematuro. É caracterizado por registro periódico de uma sequência mínima de uma onda P, um complexo QRS normal e um batimento ventricular prematuro. Sendo que essa sequência pode se repetir.

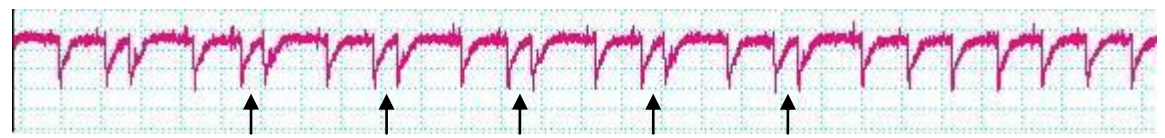


Figura 18: imagem demonstrando registro de eletrocardiograma com presença de bigeminismos (apontados por seta).

d) Salva: são dois ou três batimentos ventriculares prematuros consecutivos.

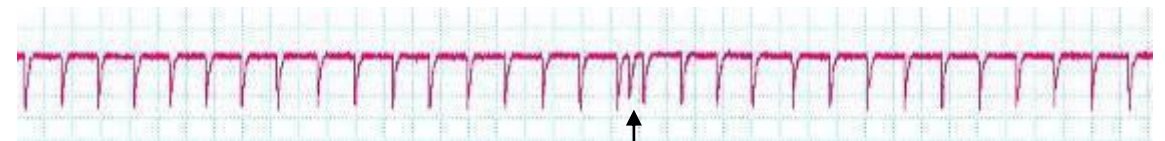


Figura 19: imagem demonstrando registro de eletrocardiograma com presença de uma salva apontado por seta

e) Taquicardia Ventricular- é definida por uma sequência de 4 ou mais batimentos ventriculares prematuros consecutivos.

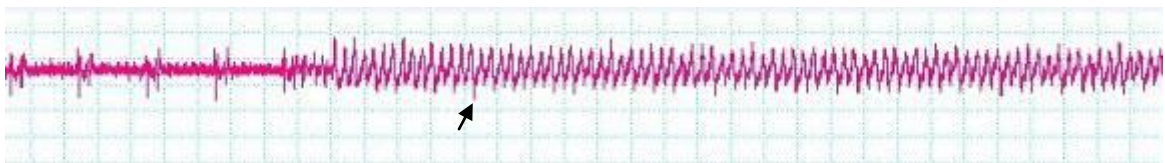


Figura 20: imagem demonstrando registro de eletrocardiograma com presença de taquicardia ventricular sustentada (apontada pela seta) .

f) Fibrilação Ventricular: é definida como um sinal a partir do qual não se pode distinguir um complexo QRS do próximo complexo QRS. É uma instabilidade morfológica pela qual não se pode medir a frequência cardíaca.

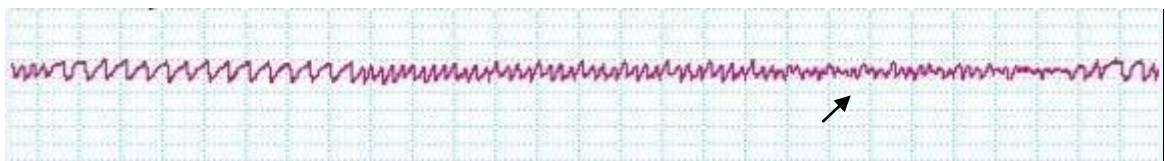


Figura 21: imagem de registro de eletrocardiograma demonstrando fibrilação ventricular (apontado por seta)

4.5 Performance do ventrículo esquerdo

As avaliações funcionais (*in vitro*) foram feitas por cateterização ventricular para registro de pressão isovolumétrica. Através de cateterização intraventricular esquerda foi possível a obtenção dos parâmetros de contratilidade: pressões sistólica (PSVE), pressão diastólica final (PDFVE) e pressão desenvolvida (PDVE) pelo ventrículo esquerdo durante o experimento em coração isolado para posterior análise no programa Chart 4. Foram descartados os corações que tiveram arritmias e PDVE < 80 mmHg no final do período de estabilização (anterior ao período basal).

4.6 Análise da área de infarto

Após o experimento como demonstrado na figura 17, os corações eram retirados da solução de Krebs. Em seguida nós extraímos os átrios. O restante do coração (ventrículos esquerdo e direito) foi seccionado em 3 ou 4 fatias transversais. Essas fatias (com 2 mm) eram imersas e coradas em uma solução tampão fosfato (pH 7,4) com TTC (trifeniltetrazólio, Sigma[®]) a 1% no qual era incubadas por 3 minutos. Este reagente, TTC é uma substância que cora área viável do tecido (VIVALDI *et al.*, 1985). Após os 3 minutos, os corações eram imersos em formol a 10% por um período entre 1 hora e 24 horas com o objetivo de obter uma melhor imagem de contraste. Após este período os cortes eram secos em papel toalha e colocados entre 2 lâminas para que a sua imagem fosse obtida através de um scanner (HP photosmart). As imagens gravadas foram analisadas através do programa Image J, para determinação planimétrica da área de infarto como demonstrado na figura 22. Através das imagens, eram somadas as áreas totais e as áreas infartadas (de cor esbranquiçada) separadamente e foi feita a razão dessas 2 áreas (área de infarto/área total), na qual foi obtida a porcentagem da área de isquemia.



Figura 22: Imagem de três fatias transversais de um coração do Grupo MMZ demonstrando análise planimétrica da área de infarto (contorno amarelo por exemplo, na fatia do meio).

4.7 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa ANOVA seguido do teste de Bonferoni com o auxílio do programa GhraphPad Prism (versão 5.0). E os resultados foram representados como média \pm erro padrão da média e as diferenças foram consideradas significativas se $P < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 Hormônios Tiroidianos

5.1.1 Concentração de T4 no plasma

A figura 23 demonstra que no grupo T4 houve maior concentração plasmática de T4 comparando com o grupo controle ($12,19 \pm 1,346 \mu\text{g/dL}$ versus $4,103 \pm 0,2525 \mu\text{g/dL}$, sendo grupo T4 versus grupo controle, $P < 0,01$). Por outro lado, no grupo MMZ houve menor concentração plasmática de T4 comparando com o grupo controle, ($2,058 \pm 0,1352 \mu\text{g/dL}$ versus $4,103 \pm 0,2525 \mu\text{g/dL}$, sendo grupo MMZ versus grupo controle respectivamente, $P < 0,05$).

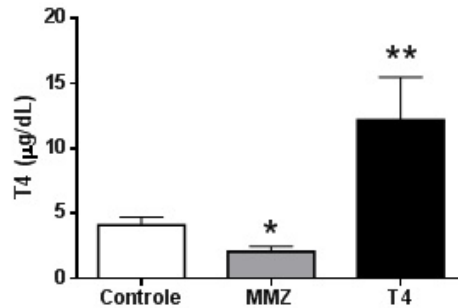


Figura 23: nível sérico de T4 ($\mu\text{g/dL}$) de animais dos grupos controle ($n=6$), MMZ ($n=10$) e T4 ($n=11$). Os níveis séricos T4(tiroxina) estavam aumentados no grupo T4 e reduzidos no grupo MMZ significativamente. Os dados foram representados como valor médio \pm S.E.M. dos grupos. Utilizou-se análise ANOVA one-way seguido do post test Bonferroni (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).

5.1.2 Concentração de T3 no plasma

É possível observar na figura 24 que o valor de T3 plasmático sérico de animais do grupo T4 foi superior ao valor do grupo controle ($347,1 \pm 36,82 \text{ ng/dL}$ versus $27,86 \pm 5,536 \text{ ng/dL}$, sendo grupo T4 versus grupo controle respectivamente, $P < 0,01$). O valor de T3 plasmático em animais do grupo MMZ foi menor comparando com o valor do grupo controle ($8,744 \pm 0,9188 \text{ ng/dL}$ versus $27,86 \pm 5,536 \text{ ng/dL}$, sendo grupo MMZ versus grupo controle respectivamente, $P < 0,05$).

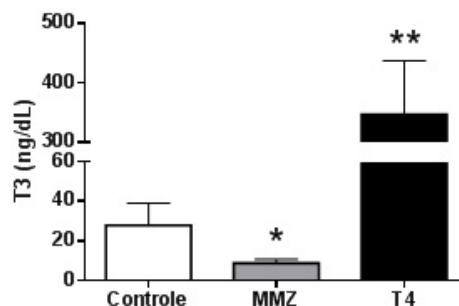


Figura 24: nível sérico de T3 (ng/dL) de animais dos grupos controle ($n=6$), MMZ ($n=10$) e T4 ($n=11$). Os níveis séricos T3 (tri-iodotironina) estavam aumentados no grupo T4 e reduzidos no grupo MMZ significativamente. Os dados foram representados como valor médio \pm S.E.M. dos grupos. Utilizou-se análise ANOVA one-way seguido do post test Bonferroni (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).

5.2 Biometria

5.2.1 Peso corporal

A figura 25 demonstra que ao final do tratamento, o peso corporal dos ratos dos grupos MMZ e GrupoT4 não foram diferentes em relação ao grupo controle.

5.2.2 Peso do coração

Como pode ser demonstrado na figura 26, no dia do experimento com coração isolado (35 dias após o tratamento), o peso dos corações do grupo T4 possuía valor maior do que o peso dos corações do grupo controle ($1734 \pm 59,80$ mg *versus* $1043 \pm 58,00$ mg, sendo grupo T4 *versus* grupo controle respectivamente, $P < 0,001$). E mais um dado verificado foi que o peso dos corações do grupo MMZ foi menor do que o peso dos corações do grupo controle ($678,3 \pm 75,12$ mg *versus* $1043 \pm 58,00$ mg, sendo grupo MMZ *versus* grupo controle respectivamente, $p < 0,01$).

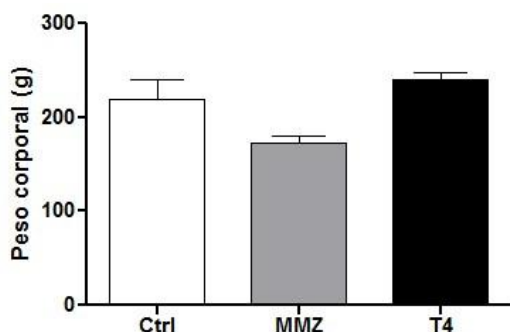


Figura 25: peso dos animais dos grupos controle (n= 6), MMZ (n= 6) e T4 (n=5) ao fim do tratamento. Esta pesagem foi realizada no dia do experimento com coração isolado. Os dados representam valores médios \pm S.E.M dos grupos controle, MMZ e T4. Utilizou-se análise ANOVA, teste one-way seguido do post test Bonferroni

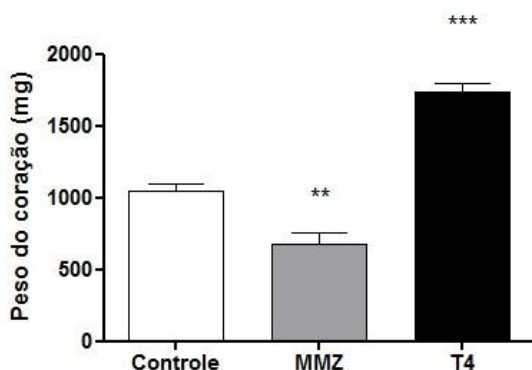


Figura 26: peso dos corações dos grupos controle (n= 6), MMZ (n= 6) e T4 (n=5) ao final do tratamento. Esta pesagem foi realizada no dia do experimento com coração isolado. Os dados representam valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle, MMZ e T4. Utilizou-se teste ANOVA, one-way seguido do post test Bonferroni (** * P < 0,001; * * p < 0,01).

5.2.3. Relação peso do coração/peso corporal

Esta relação foi analisada por ser um dos índices indiretos para se avaliar se havia hipertrofia cardíaca. A relação peso do coração/peso corporal no grupo T4 foi maior do que no grupo controle ($7,301 \pm 0,4691$ mg/g *versus* $4,901 \pm 0,4001$ mg/g, sendo grupo T4 *versus* grupo controle respectivamente, ** $p < 0,01$), o que pôde ser demonstrado através da figura 27. Não houve diferença no valor desta relação entre o grupo MMZ e o grupo controle.

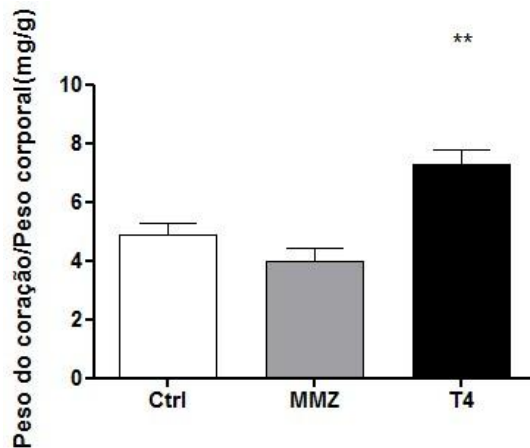


Figura 27: Relação peso do coração/peso corporal dos grupos controle (n= 6), MMZ (n= 6) e T4 (n=5) ao final do tratamento. Os dados representam valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle, MMZ e T4. Utilizou-se teste ANOVA, one-way seguido do post test Bonferroni (** $p < 0,01$).

5.2.4 Relação peso do coração/comprimento da tíbia

A figura 28 mostra que no grupo T4 o peso do coração/comprimento da tíbia foi maior do que em relação ao grupo controle ($745,0 \pm 144,2$ mg/cm *versus* $340,9 \pm 12,52$ mg/cm, sendo grupo T4 *versus* grupo controle respectivamente, ** $p < 0,01$).

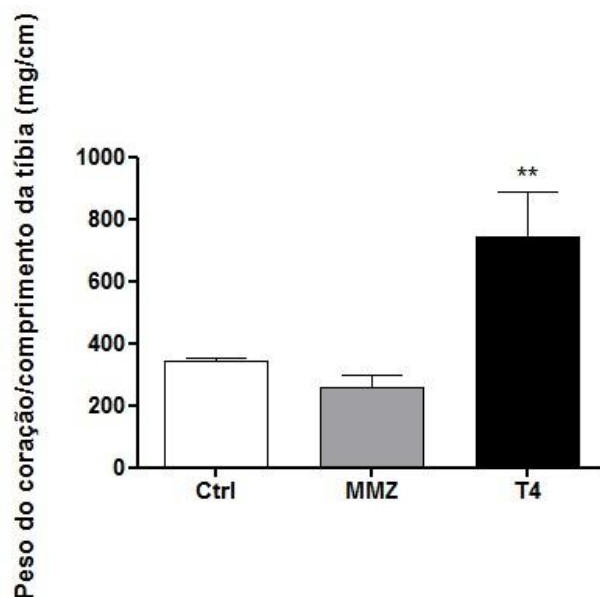


Figura 28: Relação peso do coração/comprimento da tíbia dos grupos controle (n= 6), MMZ (n= 6) e T4 (n=4) ao final do tratamento. Os dados representam valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle, MMZ e T4. Utilizou-se teste ANOVA, one-way seguido do post test Bonferroni (** $p < 0,01$).

5.3 Mortalidade

Na tabela 2 a seguir pode ser visualizado que ocorreu ao final do tratamento maior número de mortes no grupo T4 do que nos outros 2 grupos. Ao final do tratamento os animais do grupo MMZ apresentavam-se com cacquesia e bastante letárgicos, porém apenas um animal deste grupo veio a óbito. Enquanto os animais do grupo T4, em sua maioria ao fim do tratamento apresentavam-se muito agitados, com sangramento nasal e ocular. Neste grupo T4 6 animais vieram a óbito. No grupo MMZ um animal veio a óbito no biotério, no 35° dia de tratamento (experimento de outubro de 2012). Do grupo T4, 4 animais vieram a óbito no biotério, no 9° dia de tratamento (experimento de janeiro de 2013); e 2 animais vieram a óbito no biotério, no 31° dia de tratamento (experimento de março de 2013).

Tabela 2: Tabela demonstrando a mortalidade nos grupos controle, MMZ e T4

	Número de animais antes do tratamento	Número de mortes após o tratamento	Porcentagem de mortes após o tratamento
Grupo Controle	18	0	0
Grupo T4	17	6	35%
Grupo MMZ	14	1	7%

5.4. Coração isolado

Para o protocolo experimental do coração isolado, todos os corações ficaram durante o experimento inteiro (120 minutos) imersos em solução de Krebs-Hanseleit modificada. O experimento foi gravado através do programa Chart 4.0. Foram aceitos para as análises os

registros dos corações que apresentaram ritmo sinusal e pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo de ≥ 80 mmHg no fim da estabilização. Assim, foram utilizados para análise estatística os registros de 6 animais do grupo controle, 6 animais do grupo MMZ e 5 animais do grupo T4.

5.4.1 Performance do Ventrículo Esquerdo

Pode ser verificado nas figuras 29, 30 e 31 uma representação dos registros de pressões intraventriculares do ventrículo esquerdo dos grupos controle, MMZ e T4 durante o experimento com coração isolado. Na figura 29, 30 e 31 estão representadas a pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE), pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) e pressão desenvolvida (PDVE), que é a PSVE subtraída da PDFVE. A presença de PDVE indica que há contratilidade (sístole e diástole) do coração, o que durante a isquemia não ocorre.

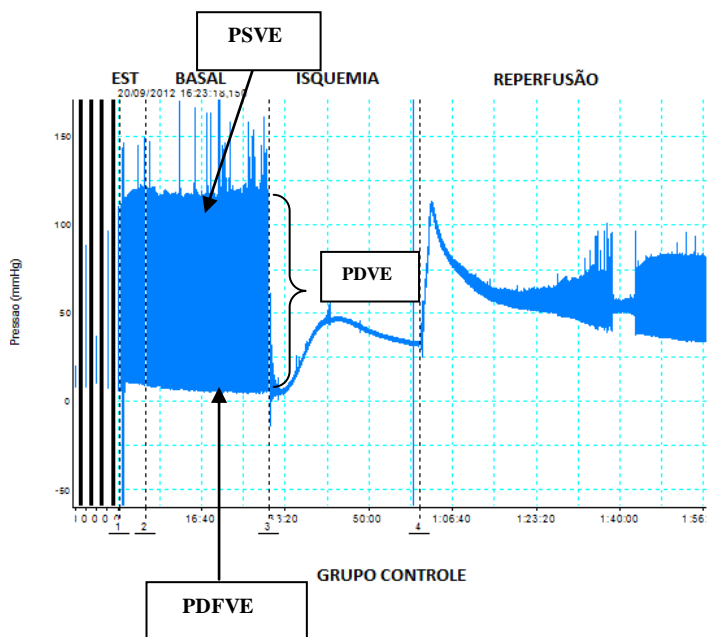


Figura 29:Esquema demonstrativo do programa Chart 4 windows utilizado durante a realização dos experimentos. O registro demonstra pressões do ventrículo esquerdo (VE) durante o protocolo de isquemia e reperfusão de coração do grupo controle. EST- período de estabilização; PSVE – pressão sistólica ventricular do VE; PDFVE – pressão diastólica final do VE; PDVE – pressão desenvolvida pelo VE. Imagem cedida gentilmente pelo Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca Antonio Paes de Carvalho (IBCCF-UFRJ).

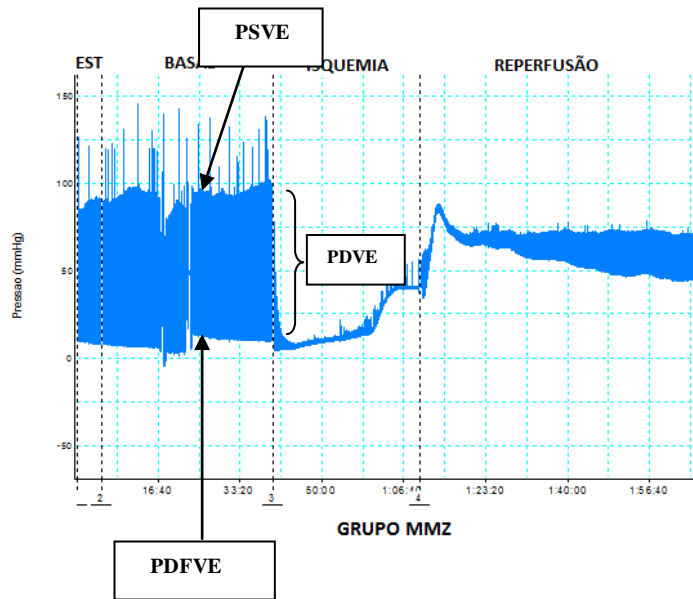


Figura 30: Esquema demonstrativo do programa Chart 4 windows utilizado durante a realização dos experimentos. O registro demonstra pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (VE) durante o protocolo de isquemia e reperfusão de coração do grupo MMZ. Imagem cedida gentilmente pelo Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca Antonio Paes de Carvalho (IBCCF-UFRJ).

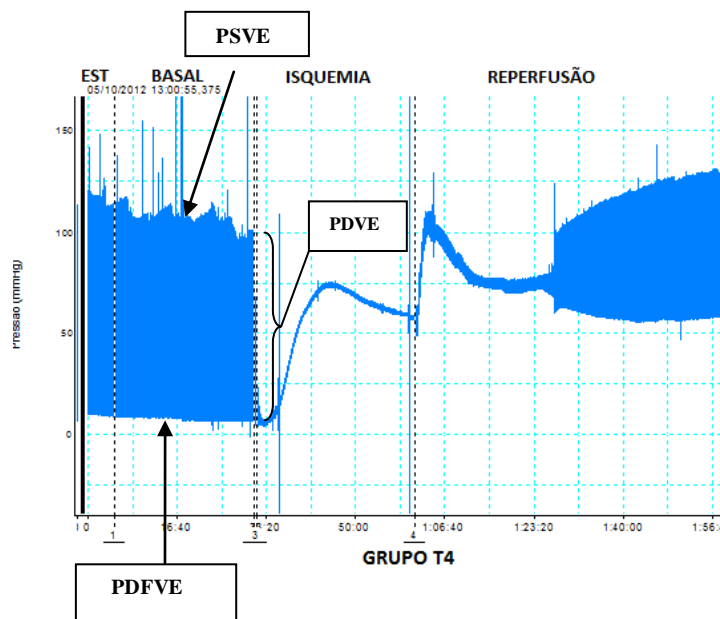


Figura 31: Esquema demonstrativo do programa Chart 4 windows utilizado durante a realização dos experimentos. O registro demonstra pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (VE) durante o protocolo de isquemia e reperfusão de coração do grupo T4. Imagem cedida gentilmente pelo Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca Antonio Paes de Carvalho (IBCCF-UFRJ).

5.4.2 PDVE (Basal)

No período basal após o período de estabilização, pode se observar na figura 32, que o valor médio da PDVE (expressa em mmHg) do grupo MMZ foi menor que no grupo controle ($87,99 \pm 3,783$ mmHg *versus* $110,7 \pm 3,233$ mmHg sendo, grupo MMZ *versus* grupo controle, $P < 0,01$).

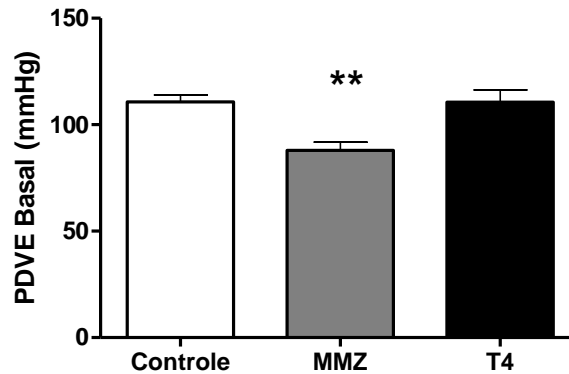


Figura 32: PDVE Basal-Pressão Desenvolvida pelo Ventrículo Esquerdo (expressa em mmHg) durante o período basal do experimento do coração isolado dos diferentes grupos: controle (n=6), MMZ (n=6) e T4(n=5). Os dados representam os valores médios + S.E.M. dos 3 grupos. Utilizou-se teste ANOVA one-way seguido do post test Bonferroni (** $P < 0,01$).

5.4.3 PSVE (durante 120 minutos de experimento)

No período basal, e durante a reperfusão não houve diferença entre os valores da PSVE (expressa em mmHg) nos 3 grupos como poder ser visualizado na figura 33. Porém durante a isquemia nos corações do grupo T4 houve maior PSVE no 10^o e 15^o minuto da isquemia comparado ao controle (tempo 10^o - $53,4476 \pm 9,27167$ mmHg *versus* $19,290 \pm 5,228727$ mmHg; tempo 15^o - $63,4656 \pm 4,275493$ mmHg *versus* $32,34517 \pm 5,068883$ mmHg sendo grupo T4 *versus* grupo controle, $P < 0,01$). Além disso, no grupo MMZ no 15^o e 20^o minuto da isquemia ocorreu menor PSVE comparado ao grupo controle (tempo 15^o - $1,960167 \pm 3,025598$ mmHg *versus* $32,34517 \pm 5,068883$ mmHg; tempo 20^o - $2,905667 \pm 3,332993$ mmHg *versus* $36,9375 \pm 3,952968$ mmHg, sendo grupo MMZ *versus* controle, respectivamente $P < 0,01$ e $P < 0,001$). Entretanto durante o período da reperfusão, no grupo T4 os corações apresentaram tendência a uma pressão sistólica maior comparado com o grupo controle.

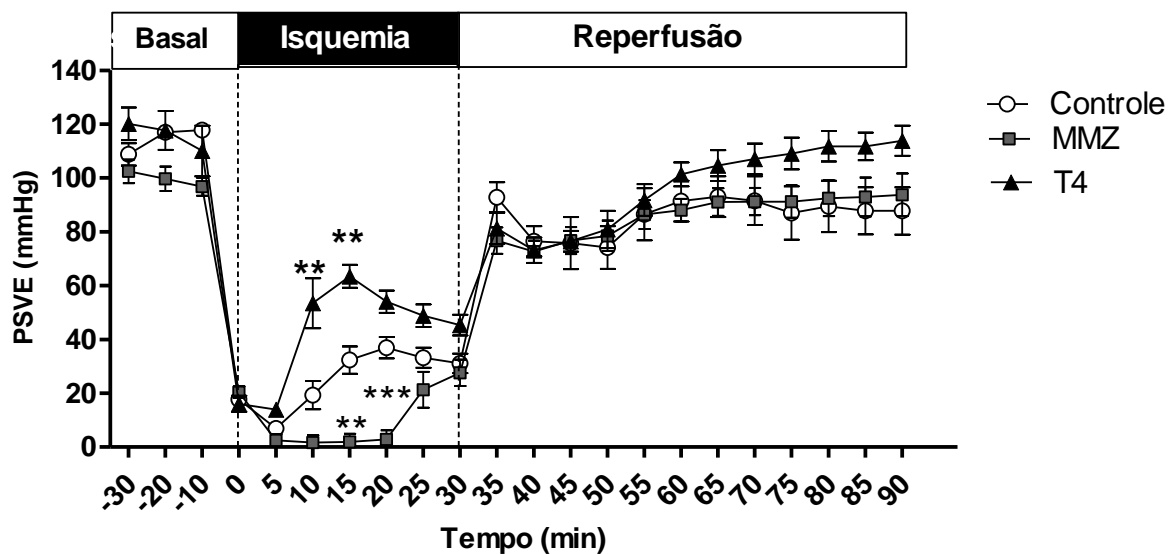


Figura 33: PSVE (120 minutos) - Curso temporal da PSVE expressa em mmHg durante o protocolo de isquemia e reperusão nos 3 diferentes grupos: controle (n=6), MMZ (n=6) e T4(n=5). PSVE-pressão sistólica do ventrículo esquerdo. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos 3 grupos. Utilizou-se teste ANOVA two-way seguido do post test Bonferroni. ** P < 0,01; *** P < 0,001.

5.4.4 PSVE (no último minuto da reperusão)

Como pode ser visualizado na figura 34 que no último minuto da reperusão, a PSVE (expressa em mmHg) dos corações do grupo T4 apenas tendeu a ser maior do que comparado ao grupo controle ($113,8 \pm 5,610$ mmHg *versus* $87,75 \pm 8,840$ mmHg, sendo grupo T4 *versus* grupo controle respectivamente, P = 0,06).

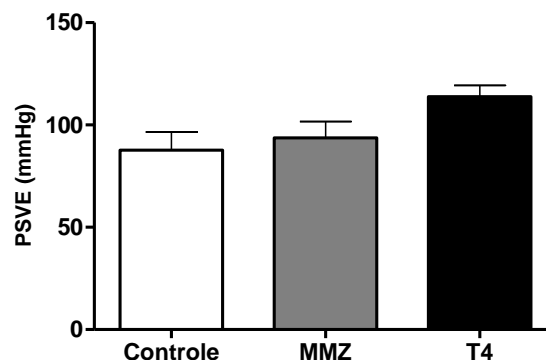


Figura 34: PSVE- Pressão Sistólica do Ventrículo Esquerdo expressa em mmHg no último minuto do período da reperusão nos 3 diferentes grupos: controle (n=6), MMZ (n=6) e T4(n=5). Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos 3 grupos. Utilizou-se teste ANOVA one-way seguido do post test Bonferroni.

5.4.5 PDFVE (durante os 120 minutos de experimento)

A figura 35 indica que no período basal não houve diferença entre os grupos. Durante o período isquêmico, os corações do grupo T4 apresentaram maior PDFVE (expressa em mmHg) comparado com o grupo controle (tempo 10^o- $53,4476 \pm 9,27167$ mmHg *versus*

19,290 ± 5,228727 mmHg, sendo grupo T4 *versus* grupo controle; tempo 15° - 63,4656 ± 4,275493 mmHg *versus* 32,34517 ± 5,068883 mmHg sendo grupo T4 *versus* grupo controle, ambos com diferença entre os valores, P < 0,01). Nos corações do grupo MMZ ocorreu uma menor PDFVE comparado com o grupo controle durante a isquemia (tempo 15° - 1,296333 ± 2,911018 mmHg *versus* 32,34517 ± 5,068883 mmHg; tempo 20° - 2,589833 ± 3,424036 mmHg *versus* 36,9375 ± 3,952968 mmHg, respectivamente P < 0,01; P < 0,001). O gráfico da figura 35 sugere que ocorreu uma maior contratura isquêmica nos corações do grupo T4 durante o período da isquemia sendo que ocorreu o inverso no grupo MMZ. A curva mais elevada da PDFVE sugere um aumento da contratura isquêmica durante o período sem perfusão (CROSS *et al*, 1996). Na reperfusão, o tratamento com T4 do grupo T4 pode ter reduzido a PDFVE comparando ao grupo controle, como pode ser visualizado na figura 34, porém houve apenas uma tendência à redução desta pressão (P= 0,07). Além disso, neste mesmo período no grupo MMZ houve maior tendência a uma maior PDFVE comparado ao grupo controle, P= 0,06.

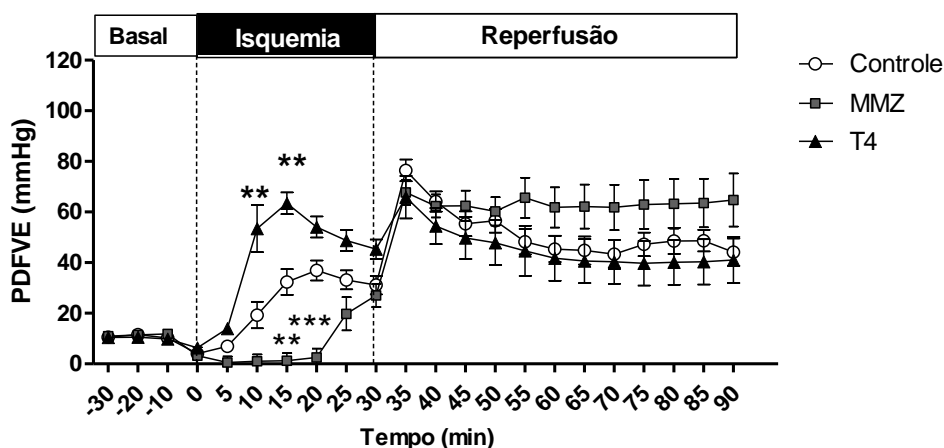


Figura 35: PDFVE (120 minutos)- Curso temporal da PDFVE (expressa em mmHg) durante o protocolo de isquemia e reperfusão nos 3 diferentes grupos: controle (n=6), MMZ (n=6) e T4(n=5). PDFVE – pressão diastólica final do ventrículo esquerdo. Os dados representam os valores médios ± S.E.M. dos 3 grupos. Utilizou-se teste ANOVA two- way seguido do post test Bonferroni (** P < 0,01; *** P < 0,001).

5.4.6 PDFVE (no último minuto da reperfusão)

A figura 36 mostra que no final do último minuto da reperfusão o tratamento com metimazol do grupo MMZ pode ter levado a uma tendência ao aumento da PDFVE (expressa em mmHg) comparado ao grupo controle (64,72 ± 10,50 mmHg *versus* 44,18 ± 5,395 mmHg, sendo grupo MMZ *versus* grupo controle).

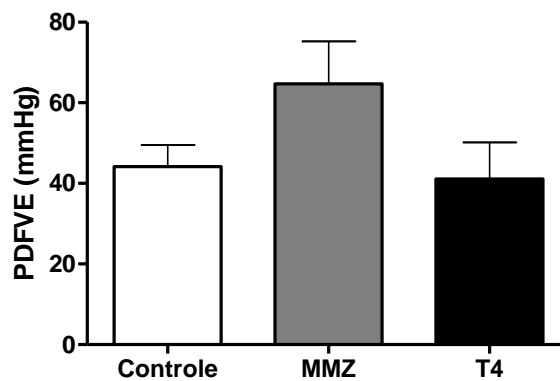


Figura 36: PDFVE-Pressão Diastólica Final do Ventrículo Esquerdo (expressa em mmHg) no último minuto do período da reperfusão nos 3 diferentes grupos: controle (n=6), MMZ (n=6) e T4(n=5). Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos 3 grupos. Utilizou-se teste ANOVA one-way seguido do post test Bonferroni .

5.4.7 PDVE (durante os 120 minutos de experimento)

A PDVE representa o índice de contratilidade do ventrículo (PANTOS *et. al*, 2002). Na figura 37 está representada a análise do curso temporal da PDVE, expressa em mmHg. No período da isquemia, a PDVE cai a zero uma vez que não há sístole e diástole cardíacas neste período. Ao longo da reperfusão, o coração vai recuperando parcialmente a PDVE. No final da reperfusão, o grupo T4 teve uma maior PDVE comparado com o grupo controle (tempo 80° - 71,6002 \pm 11,58576 mmHg versus 40,81917 \pm 10,53255 mmHg; tempo 85° - 71,387 \pm 9,942193 mmHg versus 39,16433 \pm 10,46591 mmHg sendo grupo T4 *versus* grupo Controle, $P < 0,05$).

5.4.8 Recuperação da PDVE (%)- durante os 120 minutos de experimento

A PDVE (%) representa o valor percentual da PDVE basal. Esse percentual indica a recuperação da PDVE comparado ao período basal. Na figura 38 pode ser demonstrado o curso temporal da recuperação da PDVE (%). No período da isquemia a PDVE (%) cai a zero, uma vez que não há recuperação desta durante a isquemia. A PDVE se recupera parcialmente ao longo do tempo da reperfusão. No final da reperfusão, o grupo T4 tendeu a ter maior recuperação da PDVE comparado ao grupo controle ($P > 0,05$).

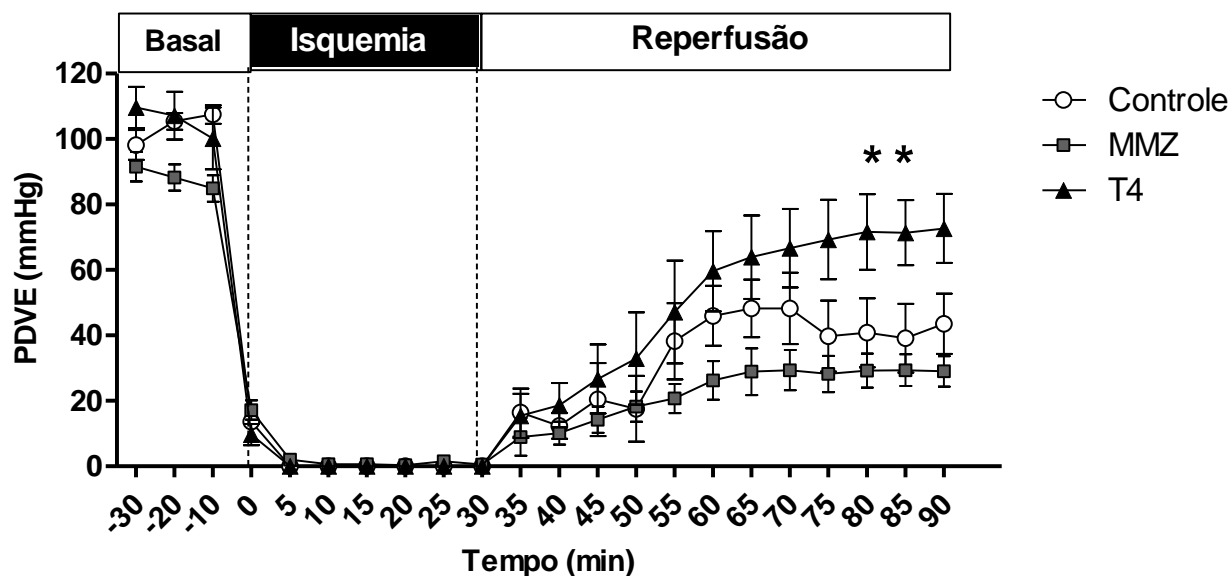


Figura 37: PDVE (120 minutos) - Curso temporal da PDVE (expressa em mm Hg) durante o protocolo de isquemia e reperusão nos 3 diferentes grupos: controle (n=6), MMZ (n=6) e T4(n=5). PDVE (pressão desenvolvida ventricular esquerda). Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos 3 grupos. Utilizou-se teste ANOVA two-way seguido do post test Bonferroni (* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001).

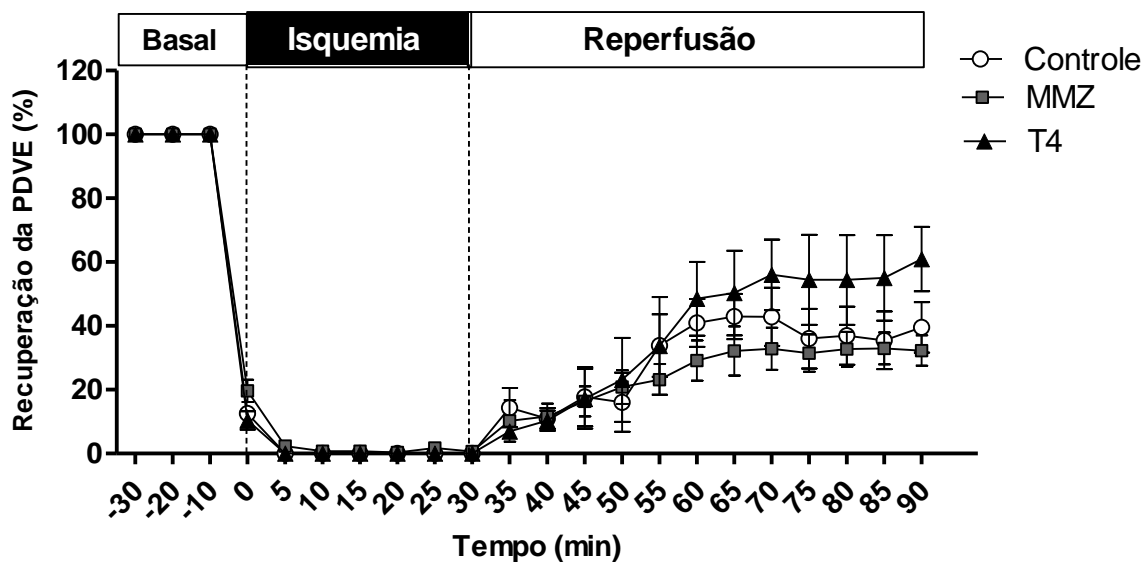


Figura 38: Recuperação da PDVE(%) - 120 minutos - Curso temporal da recuperação da PDVE (pressão desenvolvida ventricular esquerda) durante o protocolo de isquemia e reperusão nos 3 diferentes grupos: controle (n=6), MMZ (n=6) e T4(n=5). Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos 3 grupos. Utilizou-se teste ANOVA two-way seguido do post test Bonferroni .

5.4.9 Recuperação da PDVE (%) - no último minuto da reperfusão

Este índice da PDVE (%) representa o quanto ocorreu de recuperação da PDVE no último minuto da reperfusão. A figura 39 indica que o grupo T4 comparado com o grupo controle teve apenas tendência a ter uma maior recuperação na PDVE no último minuto, ($60,95 \pm 10,09\%$ versus $39,52 \pm 7,885\%$, sendo grupo T4 versus grupo controle, $P = 0,07$).

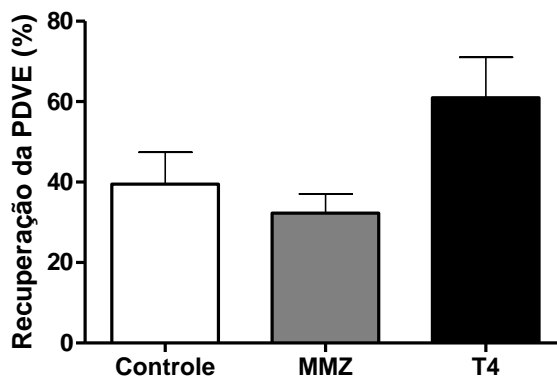


Figura 39: Recuperação da PDVE(%) analisada no último minuto da reperfusão- recuperação da PDVE durante o último minuto do protocolo de isquemia e reperfusão nos 3 diferentes grupos: controle (n=6), MMZ (n=6) e T4(n=5). PDVE (pressão desenvolvida ventricular esquerda). Os dados representam os valores médios \pm SEM dos 3 grupos. Utilizou-se teste ANOVA one-way seguido do post test Bonferroni.

5.4.10 PSVE - 5 minutos iniciais da isquemia

Pode ser visualizado nesta figura 40 que no curso temporal de 5 minutos de isquemia, a Pressão Sistólica do Ventrículo Esquerdo no 1º minuto foi sendo reduzida nos 3 grupos. Houve diferença entre os valores apenas no 5º minuto. Neste tempo, a PSVE nos corações do grupo T4 foi maior que do grupo controle ($10,79 \pm 1,785$ mmHg versus $8,336 \pm 2,385$ mmHg, sendo grupo T4 versus grupo controle, $P < 0,05$).

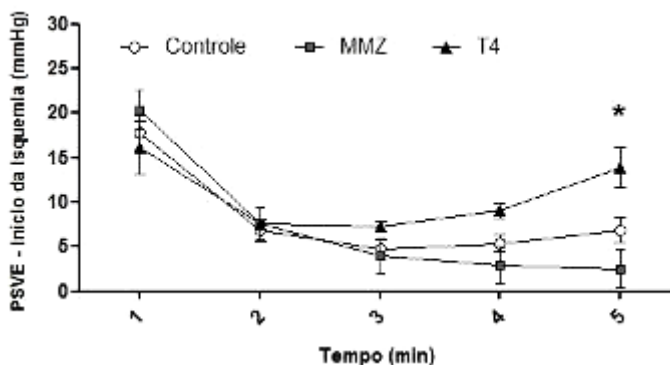


Figura 40- PSVE (5 minutos) - representação gráfica da análise da PSVE (expressa em mmHg) nos 5 minutos iniciais do período isquêmico nos 3 diferentes grupos: controle (n=6), MMZ (n=6) e T4(n=5). PSVE (pressão sistólica ventricular esquerda). Os resultados representam os valores médios \pm S.E.M. dos 3 grupos. Utilizou-se teste ANOVA two-way seguido do post test Bonferroni (* $p < 0,05$).

5.4.11 PDFVE - 5 minutos iniciais da isquemia

Ao longo do período dos 5 minutos iniciais da isquemia, foi verificado na figura 41 que no 5º minuto houve apenas uma tendência de um aumento da PDFVE com relação ao grupo T4 comparando ao grupo controle, ($P= 0,08$).

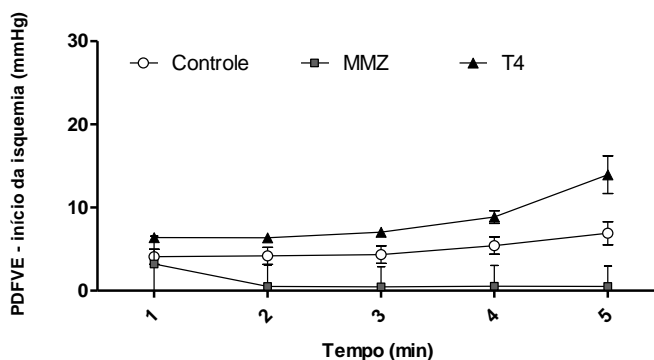


Figura 41- PDFVE (5 minutos) - representação gráfica da análise da PDFVE (expressa em mmHg) nos 5 minutos iniciais do período isquêmico nos 3 diferentes grupos: controle (n=6), MMZ (n=6) e T4(n=5). PDFVE- pressão diastólica final ventricular esquerda. Os resultados representam os valores médios \pm S.E.M. dos 3 grupos. Utilizou-se teste ANOVA two-way seguido do post test Bonferroni .

5.4.12 PDVE - 5 minutos iniciais da isquemia

A figura 42 demonstra que durante os 5 minutos iniciais da isquemia, a PDVE foi sendo reduzida até chegar a valor próximo de zero e que os valores das diferenças entre os grupos não ocorreram ao longo deste período.

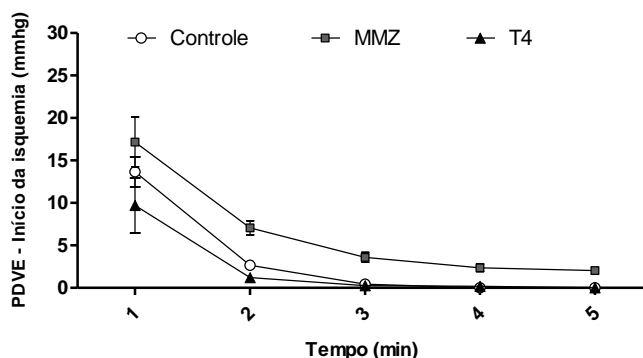


Figura 42- PDVE (5 minutos) - representação gráfica do decaimento da PDVE (expressa em mmHg) nos 5 minutos iniciais do período isquêmico nos 3 diferentes grupos: controle (n=6), MMZ (n=6) e T4(n=5). PDVE- pressão desenvolvida ventricular esquerda. Os resultados representam os valores médios \pm S.E.M. dos 3 grupos. Utilizou-se teste ANOVA two-way seguido do post test Bonferroni.

5.4.13 Recuperação da PDVE (%) - 5 minutos iniciais da isquemia

Nesta figura 43 pode ser visualizado que a recuperação da PDVE no 1º e 2º minutos foi sendo reduzida. No 1º minuto, nos corações do grupo MMZ, a recuperação da PDVE foi maior comparando com corações do grupo controle ($19,65158 \pm 3,465748$ % *versus* $12,51015 \pm 1,891908$ % sendo grupo MMZ *versus* grupo controle, $P < 0,01$). No 2º minuto

nos corações do grupo MMZ apresentaram também maior recuperação da PDVE comparando ao grupo controle ($8,162516 \pm 1,160851\%$ versus $2,447896 \pm 0,424953\%$, $P < 0,05$).

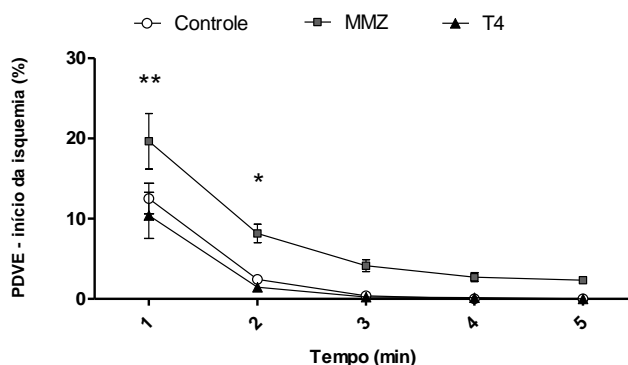


Figura 43- PDVE % (5 minutos) - representação gráfica do decaimento na recuperação da PDVE (pressão desenvolvida ventricular esquerda) nos 5 minutos iniciais do período isquêmico nos 3 diferentes grupos: controle (n=6), MMZ (n=6) e T4 (n=5). Os resultados representam os valores médios \pm S.E.M. dos 3 grupos. Utilizou-se teste ANOVA two-way seguido do post test Bonferroni (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

5.5 Análise das Arritmias de Reperusão

Os parâmetros de anormalidade do eletrocardiograma utilizados para avaliação foram: número de batimentos ventriculares prematuros (BVP), bigeminismos (BG), salvas, taquicardias ventriculares (TV), fibrilação e duração de TV.

Pode ser visto na figura 44 que no grupo controle houve apenas uma tendência ao número maior de BVP, bigeminismos e salvas. Quanto ao número de taquicardias ventriculares houve sua diminuição nos corações do grupo MMZ comparado ao grupo controle ($3,556 \pm 0,9876$ versus $11,58 \pm 2,506$, sendo grupo MMZ versus grupo controle, $P < 0,05$). A duração das taquicardias ventriculares no grupo MMZ foi menor comparado ao grupo controle ($7,484 \pm 3,860$ versus $135,5 \pm 36,38$ sendo grupo MMZ versus grupo controle, $P < 0,05$). A soma total das arritmias foi menor no grupo MMZ comparado ao grupo controle ($26,74 \pm 8,055$ versus $148,8 \pm 31,70$ sendo grupo MMZ versus grupo controle, $P < 0,05$). Além disso a porcentagem de fibrilação ventricular tendeu a ser maior no grupo T4.

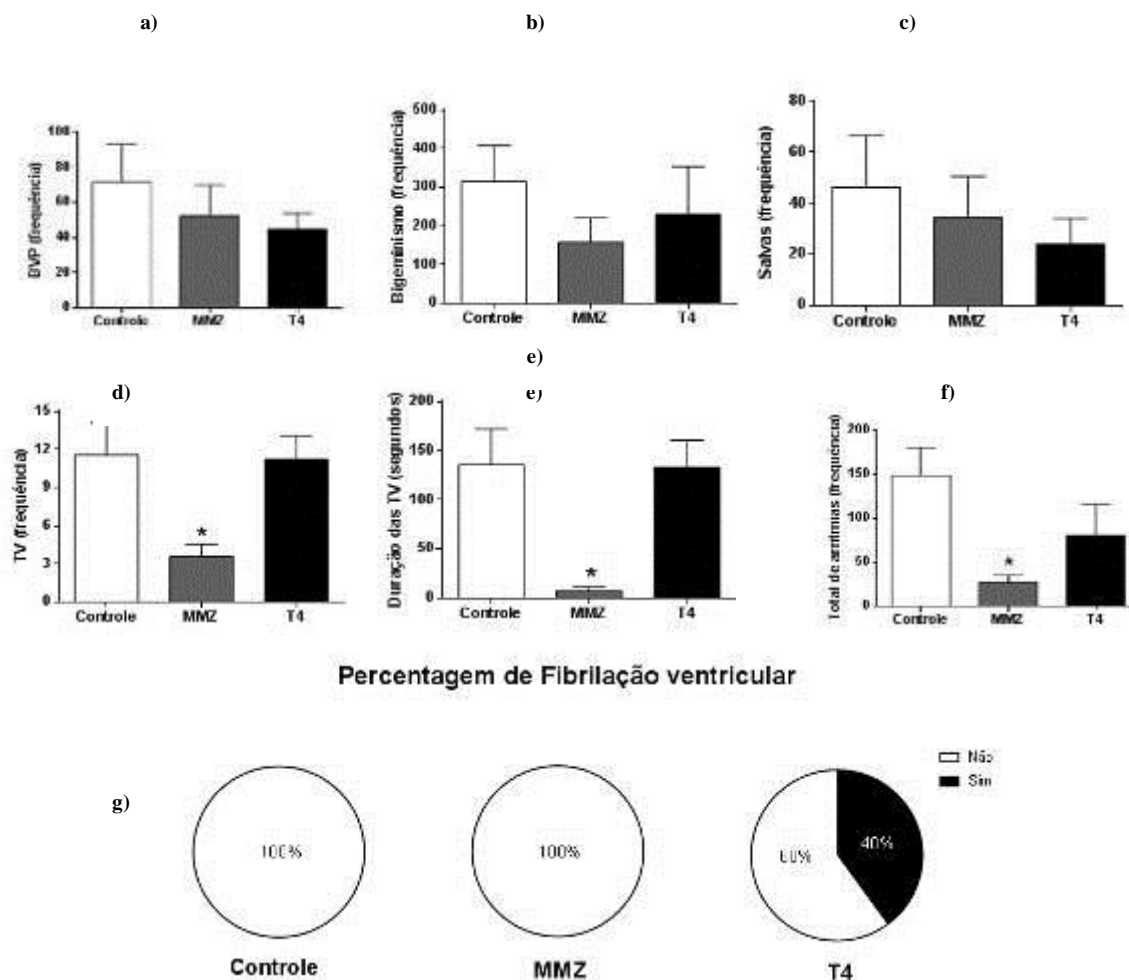


Figura 44: imagens demonstrando gráficos sobre a análise das arritmias durante a reperfusão dos corações dos grupos controle, MMZ e T4: a) frequência de BVP (batimento ventricular prematuro ; b) frequência de bigeminismos; c) frequência de salvas; d) frequência de TV; e) duração de TV (taquiverricular) ; f) frequência total de arritmias g) percentagem de Fibrilação Ventricular . Os resultados representam os valores médios \pm S.E.M. dos 3 grupos: controle (n=7), MMZ (n=6) e T4(n=5). Utilizou-se teste ANOVA one-way seguido do post test Bonferroni (* $p < 0,05$).

5.6 Área de Infarto

Pode ser demonstrado na figura 45 a área de infarto expressa em percentual da área de risco (soma da área infartada/soma da área total) analisado após os 120 minutos de experimento. A percentagem da área de infarto dos corações do grupo MMZ foi maior do que esta mesma percentagem dos corações do grupo controle ($34,04 \pm 4,922$ % *versus* $10,59 \pm 2,188$ % sendo grupo MMZ *versus* grupo controle, $P < 0,01$). Nos grupos T4 e controle, a área de risco ou percentagem de área infartada foi semelhante ($8,422 \pm 2,549$ % *versus* $10,59 \pm 2,188$ %).

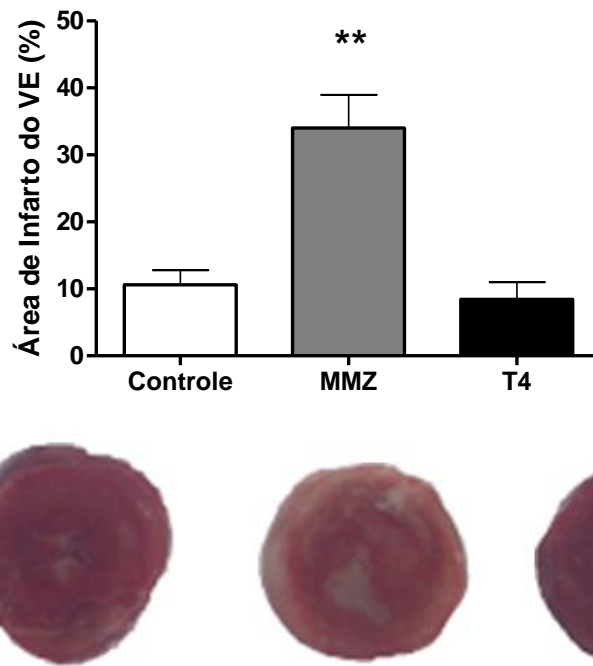


Figura 45: Área de infarto – porcentagem da área de infarto definida como área de infarto do coração/área total do coração. Imagens de cortes de corações dos respectivos grupos corados com TTC (trifeniltetrazólio) estão abaixo do gráfico. VE- ventrículo esquerdo. Os resultados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle (n=7), MMZ (n=6) e T4(n=5). Utilizou-se teste ANOVA one-way seguido do post test Bonferroni (** P < 0,01).

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, nosso modelo de indução de hipertireoidismo e hipotireoidismo em ratos Wistar foi confirmado pelos níveis séricos de T4 e T3 analisados através de radioimunoensaio. Ressaltando que os níveis de T3 estavam demasiadamente elevados no grupo T4.

O tratamento dos ratos Wistar não causou diferença de peso corporal dos animais dos grupos MMZ e T4 comparado ao controle. Porém em um estudo foi demonstrado que animais submetidos a hipotireoidismo apresentavam-se com caquexia (TANG *et. al*, 2005) e redução de peso (WU *et. al*, 2013; MOUROUZIS *et. al*, 2009; SOUKUP *et. al* 2001; CANO-EUROPA *et. al*, 2011; CARNEIRO-RAMOS *et al*, 2007) após tratamento com metimazol ou propiltiouracil mostrando o estudo estar diferente do nosso. Há estudos sobre homeostase energética nos quais os ratos hipotireoideos que foram alojados em gaiolas metabólicas (KLIEVERIK *et. al*,2009) tinham menor ingestão de ração do que os ratos do grupo controle e grupo hipertireoideo. Quando há redução do peso corporal nos ratos com redução do HT, pode ocorrer devido a uma redução do GH (hormônio do crescimento). Em outro estudo, (SILVA *et. al*, 2006) ratos que foram submetidos a tireoidectomia apresentavam redução da expressão gênica deste hormônio. Adicionalmente, a explicação mais plausível para uma redução do crescimento em ratos com hipotireoidismo seria que a falta de HT em níveis ideais, não conseguiria estimular TR α que tem papel importante na ação metabólica do HT (WOJCICKA *et. al*, 2013) no osso e podendo levar a um atraso na ossificação endocondral e intramembranosa de ratos em desenvolvimento. Os receptores TR α_1 tem importante função não só no desenvolvimento no osso, como também no coração, intestino e cerebelo (WOJCICKA *et al*,2013).

Em nosso estudo, no grupo T4, não houve alteração significativa do peso corporal comparado ao grupo controle, porém há estudos (GÓMEZ *et. al* , 2008) que relatam que a tireotoxicose causou redução significativa do peso corporal de ratos wistar. Diferenças no protocolo experimental podem explicar, pelo menos em parte, esses resultados conflitantes.

O peso do coração no grupo MMZ estava reduzido comparado ao grupo controle. O mesmo ocorreu em outros estudos (CHEN *et. al* 2010; SOUKUP *et. al* ,2001). No nosso grupo MMZ não sugere atrofia cardíaca uma vez que não houve redução dos índices indiretos que avaliam o tamanho relativo do coração.

O aumento do peso do coração no grupo T4 pode ter sido devido ao tratamento com tiroxina. Essa informação sugere aumento do coração. Em outros estudos (PANTOS *et.al*, 2000; KUZMAN *et. al* , 2005; LIU *et. al*, 2007; ARAUJO *et. al* , 2008; HEATHER *et al*,2010) também ocorreu aumento do peso do coração de ratos hipertireoideos.

Esse aumento do peso do coração no grupo T4 adicionado aos dados de aumento dos índices indiretos de hipertrofia cardíaca como relação do peso do coração/peso corporal e peso do coração/comprimento da tíbia aumentam a nossa sugestão de que o T4 causou hipertrofia cardíaca no grupo T4, confirmando o que foi anteriormente revisado na literatura (OJAMAA, 2010). Este índice elevado do peso do coração/ peso corporal já foi demonstrado anteriormente em ratos hipertireoideos (PANTOS *et.al* , 2000; KUZMAN *et. al* 2005; SONG *et. al* , 2008; ARAUJO *et. al* , 2008). Porém a hipertrofia cardíaca só pode ser confirmada de fato através da análise do comprimento e diâmetro do cardiomiócito ventricular.

O HT além de regular o crescimento corporal, independentemente de sobrecarga, regula o crescimento do coração e atua através do receptor TR α_1 ativando as vias de sinalização PI3K/AKT/mtor (KENESSEY *et. al*, 2006 in PANTOS *et. al*, 2010) devido a sua ação não genômica indo de acordo com nossos dados de revisão de literatura (OJAMAA, 2010).

Em nossa primeira análise das pressões intraventriculares, a PDVE basal dos corações de ratos hipotireoideos neste estudo, estava reduzida e estava de acordo com outros estudos (PANTOS *et. al* , 2003; MOUROUZIS *et. al*, 2009). De fato ocorreu uma redução no desenvolvimento da pressão nesses corações, e por tanto uma menor contratilidade que pode ter sido devido a uma disfunção na sístole e ou na diástole, corroborando com o estudo de que o hipotireoidismo está relacionado com redução da expressão de SERCA, importante para a diástole; e do receptor de rianodina, importante para a sístole (PANTOS *et. al* 2013).

Na análise da PSVE, com relação ao período isquêmico não houve relatos na literatura que pudessem fazer comparação com nossos dados. Com relação à esta pressão, foi verificado que nos nossos corações isolados do grupo T4 houve uma maior tendência da PSVE aumentada durante o período da reperfusão, que pode ter contribuído para uma melhora na PDVE na reperfusão. O tratamento com T4 de ratos causou aumento da pressão sistólica no estudo *in vivo* (KUZMAN *et. al*,2005) na qual foi mensurada através da cateterização da carótica e do ventrículo.

Quanto a PDFVE, outros estudos (PANTOS *et. al* , 2000) corroboram com o nosso estudo, uma vez que nos ratos hipertireotóxicos houve aumento da contratatura isquêmica ou seja aumento da PDFVE. O inverso ocorreu com nosso grupo MMZ. Há estudos que estão de acordo com o nosso (PANTOS *et. al* ,2013) uma vez que também houve reduzida contratatura isquêmica em corações isolados de ratos hipotireoideos .

A contratatura isquêmica cardíaca, também conhecida como “coração empedrado” (HEARSE *et al.* 1977), ocorre no início da isquemia. A isquemia miocárdica causa uma deficiência na contratilidade e leva ao aumento da contratatura (PANTOS *et. al*, 2000). Neste evento formam-se gradualmente novas pontes cruzadas de actina e miosina no tecido do miocárdio, levando a contratatura isquêmica. Com a continuação desta, ocorre simultaneamente gasto de glicogênio, aceleração da queda do ATP e aumento da $[Ca^{+ 2}]_i$ aumentando a contratatura isquêmica, resultando em falência diastólica. O aumento desta contratatura isquêmica seria pior para a recuperação pós-isquêmica miocárdica (KOLOCASSIDES *et. al*, 1996). No momento da contratatura isquêmica há influencia do aumento da $[Ca^{++ 2}]_i$ (sobrecarga de cálcio) que previne o relaxamento do miocárdio e o complexo actina-miosina permanece ligado até que haja nova fonte de ATP e assim novas pontes cruzadas vão se formando (HEARSE *et al*, 1977). Porém em nosso grupo T4 no qual houve aumento da contratatura isquêmica, a reperfusão não foi prejudicada.

No período de reperfusão, no grupo T4, na análise da PDFVE, esta apresentou tendência a redução, o que significou uma redução no incremento isquêmico, ou seja o coração neste grupo foi capaz de relaxar mais após o desafio da injúria de isquemia e reperfusão.

No nosso grupo T4, a tendência ao aumento da PSVE e a tendência a redução da PDFVE podem ter influenciado de forma significativa, e podendo ser verificado estatisticamente na melhora da PDVE durante a reperfusão, no final dos 120 minutos (comparado ao grupo controle). Esta informação com relação a PDVE, indica que no grupo T4 houve uma maior força desenvolvida pelo coração, uma maior contratilidade e um melhor relaxamento do ventrículo esquerdo no período pós-reperfusão. Embora tenha ocorrido maior contratatura isquêmica, o tratamento com T4 proporcionou um pré-condicionamento isquêmico em nossos corações e por isso pode ter sido um cardioprotetor sendo refletido no período da reperfusão da PDVE. Porém, com relação à recuperação da PDVE, no grupo T4 houve apenas uma tendência na melhora da recuperação desta.

O HT atua via ação não genômica ativando a sinalização de AKT no coração de ratos (KUZMAN *et. al*, 2005^a) que é uma via importante para a proteção contra a injúria de reperfusão. O HT por essa via da AKT através de PI3K causa uma proteção contra morte

celular e falta de nutrientes (KUZMAN *et. al*, 2005^b) em cultura de células de cardiomiócitos de ratos.

Após a injúria de isquemia e reperfusão a p38MAPK quando fosforilada representa uma via apoptótica do miocárdio (MA *et. al*, 1999). A apoptose representa um tipo de morte celular que ocorre após injúria de isquemia e reperfusão. A ativação de p38MAPK em cardiomiócitos pode ser atenuada após isquemia e reperfusão de corações de ratos tratados com tiroxina (PANTOS *et. al*, 2002). Em outro estudo (PANTOS *et. al*, 2002) houve aumento da fosforilação de PKC δ nos ratos tratados com L-tiroxina e que esta proteína pode reduzir danos causados pela isquemia e reperfusão. O HT atuando por via não genômica ativa vias de sinalização intracelular no cardiomiócito e com isso podendo aumentar a fosforilação de PKC δ (IORDANIDOU *et. al*, 2010).

O tratamento com T4 pôde ter sido importante para a cardioproteção pós-isquêmica e para a hipertrofia cardíaca. O T3 ativa MAPK após isquemia e reperfusão (TAKANO *et. al*, 2013), e com isso aumenta a contração do cardiomiócito e aumento o tempo de relaxamento cardíaco.

Embora no hipotireoidismo, possa ter menor consumo energético que poderia ser benéfico na injúria de isquemia e reperfusão cardíaca, o mesmo induz redução da expressão da SERCA (importante pra o relaxamento cardíaco) de corações de ratos assim como o aumento da expressão da MHC- β (MOUROUZIS *et. al*, 2009) indo de acordo com nossos dados de revisão de literatura (OJAMA, 2010). Esse dado sugere a idéia de que em corações de ratos tratados com MMZ, o HT muito reduzido possa ter contribuído na piora da contração cardíaca e relaxamento cardíaco pós-isquemia e reperfusão.

Em nosso estudo nos corações do grupo MMZ ocorreu durante a reperfusão uma redução significativa de TV, duração das TVs e do número total das arritmias. Porém no nosso grupo T4, mesmo com a melhora da pressão desenvolvida no grupo T4 no período da reperfusão, houve uma maior número de fibrilações. As fibrilações e aumento de arritmias no grupo T4 pode ter sido a causa da mortalidade em nosso grupo T4. Em outros estudos (ZHANG *et. al*, 2002; BOBADILLA *et. al*, 2001) com corações de ratos, animais hipotireoideos apresentaram durante a oclusão da artéria coronária esquerda e na reperfusão nenhuma fibrilação ventricular. Estudos demonstraram (CHESS-WILLIAMS & COKER, 1989) que devido ao tratamento com propiltiouracil (um fármaco anti-tireoidiano e também utilizado para induzir hipotireoidismo experimental em ratos) houve redução da FV e da mortalidade durante a isquemia e reperfusão. Se por um lado, o grupo MMZ em nosso estudo, apresentou tendência a menores índices de performance cardíaca mecânica, por outro lado este mesmo grupo apresentou melhores características eletrofisiológicas pois apresentou frequências menores de arritmias de reperfusão.

Como primeiro evento que pôde ter contribuído para ocorrência no nosso estudo com relação às FV, são citados: remodelamento elétrico, estrutural e metabólico que são influenciados pelo segundo evento: tônus simpático, *status* tireoidiano e isquemia. Estes dois eventos sofrem influência um sobre o outro (TRIBULOVA *et. al*, 2010), e se adicionados a sobrecarga de $[Ca^{++}]_i$ que ocorre na injuria de isquemia e reperfusão provocam o gatilho para o desenvolvimento de fibrilação ventricular. Para a explicação da ocorrência desta (XIA *et. al*, 2006) há citação de que na reperfusão de corações isquêmicos a função de canais de membrana plasmática estaria alterada, e conseqüentemente a repolarização poderia estar afetada e que o tratamento com HT causa o aumento de corrente repolarizantes como I_{kr} (correntes de efluxo para potássio), I_{ks} (correntes de efluxo para potássio) e hiperpolarizante I_{CaL} . Essa informação sobre I_{CaL} não estaria de acordo com o que foi relatado anteriormente (CHEN *et al*, 2011), citado em nossa revisão de literatura. O aumento da corrente I_{CaL} significa que ocorreria aumento do influxo de Ca^{++} , elevando mais a sobrecarga de cálcio

durante reperfusão de corações hipertireoideos e sendo este evento importante para o gatilho para arritmias e inclusive FV. No estudo de miócitos isolados de ratos na técnica de Patch Clamp, (SUN *et. al*, 2000) foi demonstrado que HT causa encurtamento do potencial de ação por sua ação não genômica em I_{K1} e em I_K (corrente repolarizante); e por sua ação genômica em I_{to} (canal para potássio transiente de efluxo). Se ocorreram esses eventos em nossos corações do grupo T4, isso pôde ter se refletido na análise do eletrocardiograma (no nosso estudo realizado) durante o coração isolado com maior número de FV neste grupo.

O tamanho da área de infarto foi maior no nosso grupo MMZ. Sugerindo que a reduzida concentração de HT levou uma má resposta do miocárdio à injúria de isquemia e reperfusão. Em um estudo anterior (CHEN *et al*, 2010), após 4 semanas de tireoidectomia em ratas, os corações de ratas Sprague-Dawley fêmeas, tiveram aumento da área de infarto, e esse aumento poderia ser devido a redução da densidade arteriolar, vasoconstricção, redução mitocondrial, sugerindo ser devido a redução do HT. Porém com relação ao MMZ utilizado em um dos nossos grupos por ser um inibidor da catalase pode ter contribuído para o aumento da injúria de isquemia e reperfusão (CANO-EUROPA *et. al*, 2011). A catalase é uma enzima intracelular que reduz a formação de peróxidos que causa danos e morte celular. Assim não se pode afirmar que a área de infartada elevada neste grupo MMZ seria devido ao hipotireoidismo ou se teria sido efeito do fármaco.

Em um estudo anterior (CHEN *et. al*, 2008), o tratamento com T3 foi capaz de reduzir a fragmentação do DNA ou seja teve um efeito anti-apoptótico em corações infartados de ratas Sprague Dawley e foi capaz de aumentar níveis de AKT- fosforilada na área da borda do ventrículo esquerdo e reduzida apoptose nessa mesma área. No grupo T4 pode ter ocorrido redução da expressão de NCX, uma vez que o mesmo já ocorreu em estudos com camundongos transgênicos (REED *et. al*, 2000). A redução da expressão de NCX no cardiomiócito pode contribuir para uma redução de sobrecarga de cálcio intracelular, o que pode ter sido importante na cardioproteção.

Sugerimos a partir de nossos resultados que a tiroxina apresentou ação cardioprotetora pois melhorou alguns parâmetros mecânicos, muito embora não tenha interferido com o tamanho da lesão isquêmica comparado ao controle eutireoideo. Nosso estudo sugere que hipotireoidismo induzido por metimazol não foi cardioprotetor, uma vez que a área de infarto foi maior.

Curiosamente, trabalhando com modelo de hipertireoidismo cardíaco e eutireoidismo sistêmico, induzido pela ausência da desidase do tipo 3 em camundongos knockout, nosso grupo demonstrou piora em diversos índices de contractilidade e remodelamento cardíaco em resposta a administração de isoproterenol, um agonista beta adrenérgico, em doses suficientes para induzir a hipertrofia cardíaca (UETA *et al.*, 2012). Neste mesmo estudo, demonstramos que os animais controle Wild Type apresentaram hipotireoidismo cardíaco e consequentemente, hipertrofia cardíaca atenuada, provavelmente devido a capacidade de induzir a atividade da desidases do tipo 3 no coração e atenuar a sinalização do HT no coração. Estes dados sugerem que o hipotireoidismo cardíaco é uma condição importante para a adaptação durante a hipertrofia cardíaca. Embora pareça paradoxal com nossos resultados obtidos e descritos nessa dissertação de mestrado e este estudo (UETA *et al.*, 2012), seria mais um dado a ser acrescentado e discutido.

É importante ressaltar que as análises funcionais realizadas no estudo citado (UETA *et al.*, 2012) foram realizadas *in vivo*, e dez dias após do início do estímulo hipertrófico. No presente estudo, realizamos análises funcionais e morfológicas (patológicas) durante e pouco tempo depois do insulto isquêmico (60 minutos durante a reperfusão), além de diferenças marcantes nos modelos: hipertrofia *in vivo* vs isquemia global *in vitro*, seria muito precoce e linear concluirmos, baseados em nossos resultados, que o hipertireoidismo é cardioprotetor ou

que o hipotireoidismo sensibiliza o miocárdio as lesões isquêmicas.

De qualquer forma, consideramos nossos resultados relevantes para a melhor compreensão do papel dos hormônios tireoidianos nos modelos de isquemia miocárdica e que o modelo de coração isolado utilizado aqui, foi decisivo para se retirar quaisquer influências sistêmicas que pudessem interferir durante o processo de isquemia cardíaca.

7 CONCLUSÕES

Todos os resultados em conjunto sugerem que o HT, na dose utilizada foi capaz de causar hipertrofia cardíaca, pode ser cardioprotetor contra à injúria de isquemia e reperfusão no coração isolado, porém torna os corações mais susceptíveis a fibrilação sendo esta importante na morte súbita. O nível demasiadamente reduzido de HT foi deletério ao coração do ponto de vista mecânico, aumentou a área de infarto, mas por outro lado, atenuou as arritmias de reperfusão.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUJO, A.S.; RIBEIRO, M.F.; ENZVEILER, A.; SCHENKEL, P.; FERNANDES, T.R.; PARTATA, W.A.; IRIGOYEN, M.C.; LLESUY, S.; BELLÓ-KLEIN, A. Myocardial antioxidant enzyme activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism. *Mol Cell Endocrinol.*, v. 249, n. 1-2, p. 133-9, abril 2006.

ARAUJO, A.S.; SCHENKEL, P.; ENZVEILER, A.T.; FERNANDES, T.R.; PARTATA, W.A.; LLESUY, S.; RIBEIRO, M.F.; KHAPER, N.; SINGAL, P.K.; BELLÓ-KLEIN, A. The role of redox signaling in cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism. *J mol endocrinol.*, v. 41 n. 6, p. 423-30, dez 2008.

ARROJO, E DRIGO, R.; BIANCO, A.C. Type 2 deiodinase at the crossroads of thyroid hormone action. *Int J Biochem Cell Biol.*, v. 43, n. 10, p. 1432-41, jun 2012.

ARROJO E DRIGO, R.; FONSECA, T.L.; WERNECK-DE-CASTRO, J.P.; BIANCO, A.C. Role of the type 2 iodothyronine deiodinase (D2) in the control of thyroid hormone signaling. *Biochim Biophys Acta.* , v. 1830, n.7, p.3956-64, jul 2013.

ASRANNA, A.; TANEJA, R.S.; KULSHRESHTA, B. Dyslipidemia in subclinical hypothyroidism and the effect of thyroxine on lipid profile. *Indian J Endocrinol Metab.*,v.16, n. 2, p. 347-349 , dez 2012.

ASVOLD, B.O.; BJORO, T.; NILSEN, T.I.; GUNNELL, D.; VATTEN, L.J. Thyrotropin levels and risk of fatal coronary heart disease: the HUNT study. *Arch InternMed*, v. 168, n.8, p. 855–860, abril 2008.

BANDYOPADHYAY, U.; BISWAS, K.; BANERJEE, R.K. Extrathyroidal actions of antithyroid thionamides. *Toxicol Lett* , v. 128, n. 1-3, p. 117-27, , mar 2002.

BARALDI, D.; CASALI, K.; FERNANDES, R.O.; CAMPOS, C.; SARTÓRIO, C.; CONZATTI, A.; COUTO, G.K.; SCHENKEL, P.C.; BELLÓ-KLEIN, A.; ARAUJO, A.R. The role of AT1-receptor blockade on reactive oxygen species and cardiac autonomic drive in experimental hyperthyroidism. *Auton Neurosci*. Abr 2013.

BIANCO, S. D. C ; KIM, B. W.; ZHANG, J. X ; HARNEY, J. W. ; RIBEIRO, R.S. ; GEREBEN, B.; BIANCO, A. C.; MENDE, U.; LARSEN, P. R. Chronic Cardiac-Specific Thyrotoxicosis Increases Myocardial β -Adrenergic Responsiveness. *Molecular Endocrinology*, v. 18, n. 7, p. 1840–1849, jul 2004.

BIONDI B; KLEIN I. Hypothyroidism as a risk factor for cardiovascular disease. *Endocrine*, v. 24, n. 1, p.1-13, jun 2004.

BOBADILLA, I.; FRANCO, M.; CRUZ, D.; ZAMORA, J.; ROBLES, S.G.; CHÁVEZ, E. Hypothyroidism provides resistance to reperfusion injury following myocardium ischemia. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*v.33, n. 5. P. 499-506, mai 2001.

CANO-EUROPA, E.; BLAS-VALDIVIA, V.; FRANCO-COLIN, M.; GALLARDO-CASAS,

C.A.; ORTIZ-BUTRÓN, R. Methimazole-induced hypothyroidism causes cellular damage in the spleen, heart, liver, lung and kidney. *Acta Histochem.*, v. 113, n. 1, p. 1-5, jan 2011.

CARNEIRO-RAMOS, M.S.; DINIZ, GP.; ALMEIDA, J.; VIEIRA, R.L.; PINHEIRO, S.V.; SANTOS, R.A.; BARRETO-CHAVES, M.L. Cardiac angiotensin II type I and type II receptors are increased in rats submitted to experimental hypothyroidism. *J. Physiol.* , v.583, p. 213-23, mai 2007.

CARVALHO-BIANCO, S.D.; KIM, B.W.; ZHANG, J.X.; HARNEY, J.W.; RIBEIRO, R.S.; GEREBEN, B.; BIANCO, A.C.; MENDE, U.; LARSEN, P.R. Chronic Cardiac-Specific Thyrotoxicosis Increases- Myocardial -Adrenergic Responsiveness. *Mol Endocrinol*, v.18, n. 7, p.1840-9, jul 2004.

CHANG, K.C.; FIGUEREDO, V.M.; SCHREUR, J.H.; KARIYA, K.; WEINER, M.W.; SIMPSON, P.C.; CAMACHO, S.A. Thyroid hormone improves function and Ca²⁺ handling in pressure overload hypertrophy. Association with increased sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ -ATPase and alpha-myosin heavy chain in rat hearts. *J. Clin. Invest*, v. 100, n. 7, p. 1742–9, out 1997.

CHEN, W.J.; YEH, Y.H.; LIN, K.H.; CHANG, G.J.; KUO, C.T. Molecular characterization of thyroid hormone-inhibited atrial L-type calcium channel expression: implication for atrial fibrillation in hyperthyroidism. *Basic Res Cardiol*, v. 106, n. 2, p. 163-164, Mar 2011.

CHEN, Y.F.; KOBAYASHI, S.; CHEN, J.; REDETZKE, R.A.; SAID, S.; LIANG, Q.; GERDES, A.M. Short term triiodo-L-thyronine treatment inhibits cardiac myocyte apoptosis in border area after myocardial infarction in rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, v. 44, n. 1, p. 180-7, jan 2008.

CHEN, Y.F.; REDETZKE, R.A.; SAID, S.; BEYER, A.J.; GERDES, A.M. Changes in left ventricular function and remodeling after myocardial infarction in hypothyroid rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 298, n. 1, p. 259-62, jan 2010.

CHESS-WILLIAMS, R.; COKER, S.J. Ventricular fibrillation is reduced in hypothyroid rats with enhanced myocardial alpha-adrenoceptor responsiveness. *Br. J. Pharmacol*, v. 98, n. 1, p. 95-100, set 1989.

CHOI, Y.H.; CHUNG, J.H.; BAE, S.W.; LEE, ; JEONG, E.M.; KANG, M.G.; KIM, B.J.; KIM, K.W.; PARK, J.E. Severe coronary artery spasm can be associated with hyperthyroidism. *Coron. Artery Dis.*, v.16, n. 3, p. 135-9., mai 2005.

COTOMACCI, G, SARKIS, J.J., FÜRSTENAU, C.R., BARRETO-CHAVES, M.L. Thyroid hormones are involved in 5'-nucleotidase modulation in soluble fraction of cardiac tissue. *Life Sci.*, v. 91, n. 3-4, p.137-42, ago 2012.

CROSS, H.R.; OPIE, L.H.; RADDA, G.K.; CLARKE, K. Is a high glycogen content beneficial or detrimental to the ischemic rat heart? A controversy resolved. *Circ Res.*, v. 78 .n 3, p. 482-91, mar 1996.

DAVIS, P. J.; LEONARD, J. L.; DAVIS, F.B. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front Neuroendocrinol*, v. 29, n. 2, p. 211-8, mai 2008.

EVERETT, A.W.; SINHA, A.M.; UMEDA, P.K.; JAKOVIC, S.; RABINOWITZ, M.; ZAK, R. Regulation of myosin synthesis by thyroid hormone: relative change in the alpha-and beta-myosin heavy chain mRNA levels in rabbit heart. *Biochemistry*, v. 23, n. 8, p. 1596–1599, abril 1984.

FAZIO, S.; PALMIERI, E.A.; LOMBARDI, G.; BIONDI, B. Effects of thyroid hormone on the cardiovascular system. *Recent Prog Horm Res.*, v. 59, p. 31-50, 2004.

FRANK, A.; BONNEY, M.; BONNEY, S.; WEITZEL, L.; KOEPPEN, M.; ECKLE, T. Myocardial ischemia reperfusion injury - from basic science to clinical bedside. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth.*, v. 16, n. 3, p. 123-32, set 2012.

GERDES, A. M. ; IERVASI, G. Thyroid Replacement Therapy and Heart Failure. *Circulation.*, v. 122, n. 4, p. 385-93, jul 2010.

GOMBERG-MAITLAND, M.; FRISHMAN, W.H. Thyroid hormone and cardiovascular disease. *Am. Heart J.*, n. 135, p. 187-196, fev 1998.

GROVER, G.J.; MELLSTRÖM, K.; YE, L.; MALM, J.; LI, Y.L.; BLADH, L.G.; SLEPH, P.G.; SMITH, M.A.; GEORGE, R.; VENNSTRÖM, B.; MOOKHTIAR, K.; HORVATH, R.; SPEELMAN, J.; EGAN, D.; BAXTER, J.D. Selective thyroid hormone receptor-beta activation: a strategy for reduction of weight, cholesterol, and lipoprotein (a) with reduced cardiovascular liability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 100, n. 17, p. 10067-72, ago 2003.

HEARSE, D.J.; GARLICK, P. B.; HUMPHREY, S.M. Ischemic contracture of the myocardium: Mechanisms and prevention. *Am J Cardiol.*, v. 39 n. 7, p. 986-93, jun 1977.

HEATHER, L.C.; COLE, M.A.; ATHERTON, H.J.; COUMANS, W.A.; EVANS, R.D.; TYLER, D.J.; GLATZ, J.F.; LUIKEN, J.J.; CLARKE, K. Adenosine monophosphate-activated protein kinase activation, substrate transporter translocation, and metabolism in the contracting hyperthyroid rat heart. *Endocrinology*, v. 151, n. 1, p:422-31, jan 2010.

HEUSCH, G.; BOENGLER, K.; SCHULZ, R. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: the Holy Grail of cardioprotection. *Basic Res Cardiol*, v. 105, n. 2, p. 151-4, mar 2010.

HOLLOWELL, J.G.; STAEHLING, N.W.; FLANDERS, W.D.; HANNON, W.H.; GUNTER, E.W.; SPENCER, C.A.; BRAVERMAN, L.E. Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab.* V. 87, n. 2, p.489-99, fev 2002.

HOLUBARSCH, C.; LUDEMANN, J.; WIESSNER, S.; RUF, T.; SCHULTE-BAUKLOH, H.; SCHMIDT-SCHWEDA, S.; PIESKE, B.; POSIVAL, H.; JUST, H. Shortening versus isometric contractions in isolated human failing and non-failing left ventricular myocardium: dependency of external work and force on muscle length, heart rate and inotropic stimulation. *Cardiovasc. Res.*, v. 37, n. 1, p. 46–57, jan 1998.

IERVASI G; MOLINARO S; LANDI P; TADDEI MC; GALLI E; MARIANI F; L'ABBATE A; PINGITORE A. Association between increased mortality and mild thyroid dysfunction in cardiac patients. *Arch. Intern. Med.*, v. 167, n.14, p.1526-32, jul 2007.

IORDANIDOU, A.; HADZOPOULOU-CLADARAS, M.; LAZOU, A. Non-genomic effects of thyroid hormone in adult cardiac myocytes: relevance to gene expression and cell growth. *Mol Cell Biochem.*, v. 340, n 1-2, p.291-300, jul 2010.

IŞMAN, C.A.; YEĞEN, B.C.; ALICAN, I. J. Methimazole-induced hypothyroidism in rats ameliorates oxidative injury in experimental colitis. *J Endocrinol*, v.177, n.3, p. 471-6, Jun 2003.

JAFFET, R. R.F. Fisiología cardíac. In: Ciencias básicas. Disponível em: < <http://www.medigraphic.com/pdfs/revmed/md-2009/md093d.pdf> > data de acesso 2de junho de 2013.

KAHALY, G.J.; DILLMANN, W.H. Thyroid hormone action in the heart. *Endocr Rev*, v.26, n. 5, p. 704-728, ago 2005.

KANG, M.; CHUNG, K.Y.; WALKER, J.W. G-protein coupled receptor signaling in myocardium: not for the faint of heart. *Physiology (Bethesda)*, v. 22, p. 174-84, jun 2007.

KASTURI, S.; ISMAIL-BEIGI, F. Effect of thyroid hormone on the distribution and activity of Na, K-ATPase in ventricular myocardium. *Arch Biochem Biophys*, v. 475, n. 2, p. 121-7, jul 2008.

KIM, S.J.; IIZUKA, K.; KELLY, R.A.; GENG, Y.J.; BISHOP, S.P.; YANG, G.; KUDEJ, A.; MCCONNELL, B.K.; SEIDMAN, C.E.; SEIDMAN, J.G.; VATNER, S.F. An alpha-cardiac myosin heavy chain gene mutation impairs contraction and relaxation function of cardiac myocytes. *Am. J. Physiol*, n. 276, p.1780–1787, mai 1999.

KIMURA, E.T. Glândula Tireóide. In: MARGARIDA DE MELLO AYRES. *Fisiologia*. São Paulo: Guanabara Koogan,. P. 991-1014, 2008.

KLEIN, I. Thyroid hormone and cardiac contractility. *Am J Cardiol*.v.91, n. 11, p.1331-2, jun 2003.

KLEIN, I.; DANZI, S. Thyroid disease and the heart. *Circulation.*, v. 116, n. 15, p. 1725-35, out 2007.

KLEIN, I.; OJAMAA, K. Thyroid Hormone and the Cardiovascular System. *N. Engl. J. Med.*, v. 344, p. 501-509, fev 2001.

KLEIN, I.; OJAMAA, K. Thyroid hormone – targeting the heart. *Endocrinology*, v.142, n.1, p. 11-12, Jan 2001.

KLIEVERIK, L.P.; COOMANS, C.P.; ENDERT, E.; SAUERWEIN, H.P.; HAVEKES, L.M.; VOSHOL, P.J.; RENSEN, P.C.; ROMIJN, J.A.; KALSBECK, A.; FLIERS, E. Thyroid hormone effects on whole-body energy homeostasis and tissue-specific fatty acid uptake in

vivo. *Endocrinology*, v.150, n.12, p. 5639-48, dez 2009.

KOLOCASSIDES, K.G.; SEYMOUR, A.M.; GALIÑANES, M.; HEARSE, D.J. Paradoxical effect of ischemic preconditioning on ischemic contracture? NMR studies of energy metabolism and intracellular pH in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol.*, v. 28, n. 5, p. 1045-57, maio 1996.

KUTLUTURK, F.; YUCE, S.; TASLIYURT, T.; YELKEN, B.M.; AYTAN, P.; OZTURK, B.; YILMAZ, A. Changes in metabolic and cardiovascular risk factors before and after treatment in overt hypothyroidism. *Med Glas (Zenica)*, v. 10, n. 2, p. 348-53, ago 2013.

KUZMAN, J.A.; GERDES, A.M.; KOBAYASHI, S.; LIANG, Q. Thyroid hormone activates Akt and prevents serum starvation-induced cell death in neonatal rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* v. 39, n. 5, p. 841-4, nov 2005.b

KUZMAN, J.A.; VOGELSANG, K.A.; THOMAS, T.A.; GERDES, A.M. L-Thyroxine activates Akt signaling in the heart. *J Mol Cell Cardiol*, v. 39, n.2 , p. 251-8, ago 2005.a

LIU, C.R.; LI, L.Y.; SHI, F.; ZANG, X.Y.; LIU, Y.M.; SUN, Y.; KAN, B.H. Effects of hyper- and hypothyroid on expression of thyroid hormone receptor mRNA in rat myocardium. *J. Endocrinol.*, v.195, n. 3, p. 429-38, dez 2007.

MA, X.L.; KUMAR, S.; GAO, F.; LOUDEN, C.S.; LOPEZ, B.L.; CHRISTOPHER, T.A.; WANG, C.; LEE, J.C.; FEUERSTEIN, G.Z.; YUE, T.L. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation.*,v. 99, n. 13, p. 1685-91, abril 1999.

MAHAFFEY, K.W.; RAYA, T.E.; PENNOCK, G.D.; MORKIN, E.; GOLDMAN, S. Left ventricular performance and remodeling in rabbits after myocardial infarction. Effects of a thyroid hormone analogue. *Circulation*, v. 91, n. 3, p. 794–801, fev 1995.

MANNA, D.; ROY, G.; MUGESH, G. Antithyroid Drugs and Their Analogues: Synthesis, Structure, and Mechanism of Action. *Acc. Chem. Res.*, jul 2013.

MOOLMAN, J.A. Thyroid hormone and the heart. *Cardiovasc. J. S. Afr.*, v.13, n. 4, p. 159–163, ago 2002

MORENO, M.; LOMBARDI, A.; LOMBARDI, P.; GOGLIA, F.; LANNI, A. Effect of 3,5-diiodo-L-thyronine on thyroid stimulating hormone and growth hormone serum levels in hypothyroid rats. *Life Sci.*,v. 62, n.26, p. 2369-77, 1998.

MOUROUZIS, I.; DIMOPOULOS, A.; SARANTEAS, T.; TSINARAKIS, N.; LIVADAROU, E.; SPANOU, D.; KOKKINOS, A.D.; XINARIS, C.; PANTOS, C.; COKKINOS, D.V. Ischemic preconditioning fails to confer additional protection against ischemia-reperfusion injury in the hypothyroid rat heart. *Physiol Res*, v. 58, n. 1, p. 29-38 , 2009.

MURPHY, E; STEENBERGEN, C. Mechanisms Underlying Acute Protection From Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *Physiol Rev.*, v.88, n.2, p. 581–609, abril 2008.

MURRAY, C.J.; LOPEZ, A.D. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet.* , v. 349, n. 9064, p. 1498-504 , mai 1997.

NAM, S.M.; KIM, Y.N.; YOO, D.Y.; YI, S.S.; KIM, W.; HWANG, I.K.; SEONG, J.K.; YOON, Y.S. Hypothyroid states mitigate the diabetes-induced reduction of calbindin D-28k, calretinin, and parvalbumin immunoreactivity in type 2 diabetic rats. *Neurochem Res.*, v. 37, n. 2, p.253-60, fev 2012.

OJAMAA, K. Signaling mechanisms in thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy. *Vascul Pharmacol*, v. 52, n. 3-4, p. 113-9 , abril 2010.

OLIVARES, E.L.; MARASSI, M.P.; FORTUNATO, R.S.; DA SILVA, A.C.; COSTA-E-SOUSA, R.H.; ARAÚJO, I.G.; MATTOS, E.C.; MASUDA, M.O.; MULCAHEY, M.A.; HUANG, S.A.; BIANCO, A.C.; CARVALHO, D.P. Thyroid function disturbance and type 3 iodothyronine deiodinase induction after myocardial infarction in rats a time course study. *Endocrinology.*, v.148, n. 10, p. 4786-92, out 2007.

OREN, R.; DOTAN, I.; PAPA, M.; MARRAVI, Y.; AEED, H.; BARG, J.; ZEIDEL, L.; BRUCK, R.; HALPERN, Z. Inhibition of experimentally induced cirrhosis in rats by hypothyroidism. *Hepatology*, v.24, n.2, p. 419–23, ago 1996.

OZTAY, F.; ERGIN, B.; USTUNOVA, S.; BALCI, H.; KAPUCU A.; CANER, M.; DEMIRCI, C. Effects of coenzyme Q10 on the heart ultrastructure and nitric oxide synthase during hyperthyroidism. *Chin J. Physiol*, v. 50, n. 5, p. 217-24, out 2007.

PANTOS, C.I.; MALLIOPOULOU, V.A.; MOUROUZIS, I.S.; KARAMANOLI, E.P.; PAIZIS, I.A.; STEIMBERG, N.; VARONOS, D.D.; COKKINOS, D.V. Long-term thyroxine administration protects the heart in a pattern similar to ischemic preconditioning. *Thyroid*, v. 12, n. 4 , p. 325-9, abril 2002.

PANTOS, C.; MALLIOPOULOU, V.; MOUROUZIS, I.; SFAKIANOUDIS, K.; TZEIS, S.; DOUMBA , P.; XINARIS, C.; COKKINOS, A.D.; CARAGEORGIOU, H.; VARONOS, D.D.; COKKINOS, D.V. Propylthiouracil-induced hypothyroidism is associated with increased tolerance of the isolated rat heart to ischaemia-reperfusion. *J Endocrinol*, v. 178, n.3 p. 427-35, set 2003.

PANTOS, C.; MOUROUZIS, I.; COKKINOS, D.V. Thyroid hormone as a therapeutic option for treating ischaemic heart disease: from early reperfusion to late remodelling. *Vascul Pharmacol*, v. 52, n. 3-4,p. 157-65, mar-abril 2010.

PANTOS, C.; MOUROUZIS, I.; DELBRUYÈREB, M.; MALLIOPOULOU, V.; TZEIS, S.; COKKINOS, D. D.; NIKITAS, N. ; CARAGEORGIOU, H.; VARONOS, D.; COKKINOS, D.; NISATO, D. Effects of dronedarone and amiodarone on plasma thyroid hormones and on the basal and postischemic performance of the isolated rat heart. *Eur J Pharmacol.*, v. 444, n. 3, p. 191-6, mai 2002.

PANTOS, C.; MOUROUZIS, I.; MARKAKIS, K.; DIMOPOULOS, A.; XINARIS, C.; KOKKINOS, A.D.; PANAGIOTOU, M.; COKKINOS, D.V. Thyroid hormone attenuates

cardiac remodeling and improves hemodynamics early after acute myocardial infarction in rats. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, v. 32, n.2, p. 333–339, ago 2007.

PANTOS, C.I.; MOUROUZIS, I.S.; TZEIS, S.M.; MALLIOPOULOU, V.; COKKINOS, D.D.; ASIMACOPOULOS, P.; CARAGEORGIOU, H.C.; VARONOS, D.D.; COKKINOS, D.V. Propranolol diminishes cardiac hypertrophy but does not abolish acceleration of the ischemic contracture in hyperthyroid hearts. *J Cardiovasc Pharmacol*, v. 36, n. 3 p. 384-9, set 2000.

PATTON, K. K.; LEVY, M.; VISWANATHAN, M. Atrial lead dysfunction: an unusual feature of hypothyroidism. *Pacing Clin Electrophysiol*, v. 31, n. 12, p.1650-2, dec 2008.

REED, T.D.; BABU, G.J.; JI, Y.; ZILBERMAN, A.; VER HEYEN, M.; WUYTACK, F.; PERIASAMY, M. The expression of SR calcium transport ATPase and the Na⁺/Ca²⁺Exchanger are antithetically regulated during mouse cardiac development and in Hypo/hyperthyroidism. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, v. 32, n. 3, p.453-64, mar 2000.

REGNIER, M.; MARTIN, H.; BARSOTTI, R.J.; RIVERA, A.J.; MARTYN, D.A.; CLEMMENS, E. Cross-bridge versus thin filament contributions to the level and rate of force development in cardiac muscle. *Biophys. J.*, v. 87, n. 3, p.1815-24, set 2004.

ROBERTS, B.N.; CHRISTINI, D.J. NHE inhibition does not improve Na⁺ or Ca²⁺ overload during reperfusion: using modeling to illuminate the mechanisms underlying a therapeutic failure. *PLoS Comput Biol.*, v. 7, n. 10, out2011.

ROBIN, E.; GUZY, R.D.; LOOR, G.; IWASE, H.; WAYPA, G.B.; MARKS, J.D.; HOEK, T.L.; SCHUMACKER, P.T. Oxidant stress during simulated ischemia primes cardiomyocytes for cell death during reperfusion. *J Biol Chem.*, v. 282, n. 26, jun 2007.

RODRÍGUEZ-GÓMEZ I; CRUZ, A.; MORENO, J.M.; SOLER, A.; OSUNA, A.; VARGAS, F. Clofibrate prevents and reverses the hemodynamic manifestations of hyperthyroidism in rats. *Am J Hypertens.*, v. 21, n. 3, p. 341-7 mar 2008.

ROSEN, M.D.; PRIVALSKY, M.L. Thyroid hormone receptor mutations in cancer and resistance to thyroid hormone: perspective and prognosis. *J Thyroid Res.*, jun 2011.

RYBIN, V.; STEINBERG, S.F. Thyroid hormone represses protein kinase C isoform expression and activity in rat cardiac myocytes. *Circ. Res.*, v. 79, n. 3, p. 388–398, set 1996.

SALVATORE, D.; LOW, S.C.; BERRY, M.; MAIA, A.L.; HARNEY, J.W.; CROTEAU, W.; ST. GERMAIN, D.L.; LARSEN, P.R. Type 3 iodothyronine deiodinase: cloning, in vitro expression, and functional analysis of the placental selenoenzyme. *J Clin Invest.*, v. 96, n. 5, p. 2421–2430, nov, 1996.

SANTOS, R.A.; BARRETO-CHAVES, M.L. Cardiac angiotensin II type I and type II receptors are increased in rats submitted to experimental hypothyroidism. *J Physiol.*, v. 583, pt 1, p. 213-23, ago 2007.

SCHRIEWER, J.M.; PEEK, C.B.; BASS, J.; SCHUMACKER, P.T. Ros-mediated PARP

activity undermines mitochondrial function after permeability transition pore opening during myocardial ischemia-reperfusion. *J Am Heart Assoc.* , v. 2, n.2, abril 2013.

SHAHEEN, M.; CHEEMA, Y.; SHAHBAZ, A.U.; BHATTACHARYA, S.K.; WEBER, K.T. Intracellular calcium overloading and oxidative stress in cardiomyocyte necrosis via a mitochondriocentric signal-transducer-effector pathway. *Exp Clin Cardiol*, v. 16, n. 4, p. 109-15, 2011.

SHENOY, R.; KLEIN, I.; OJAMAA, K. Differential regulation of SR calcium transporters by thyroid hormone in rat atria and ventricles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, v. 281, n. 4, p.1690-6. , out 2001.

SILVA, F.G.; GIANNOCCO, G.; SANTOS, M.F.; NUNES, M.T. Thyroid hormone induction of actin polymerization in somatotrophs of hypothyroid rats: potential repercussions in growth hormone synthesis and secretion. *Endocrinology.*, v. 147, n. 12, p. 5777-85, dez 2006.

SIMPSON, P.C.; CAMACHO, S.A. Thyroid hormone improves function and Ca²⁺ handling in pressure overload hypertrophy. Association with increased sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ -ATPase and alpha-myosin heavy chain in rat hearts. *J. Clin. Invest*, v. 100, n. 7, p. 1742–9, out 1997.

SONG, L.J.; WANG, G.L.; LIU, J.; QIU, Q.Y.; OU, J.H.; GUAN, Y.Y. Cellular mechanisms of reduced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in L-thyroxin induced rat ventricular hypertrophy. *Acta Pharmacol Sin.*, v. 29, n. 4, p. 430-6, abril 2008.

SOUKUP, T.; ZACHAROVÁ, G.; SMERDU, V.; JIRMANOVÁ, I. Body, heart, thyroid gland and skeletal muscle weight changes in rats with altered thyroid status. *Physiol Res.*, v. 50, n.6, p.619-26, 2001.

SOUZA, M. O. Transportadores de Membrana. In: MARGARIDA DE MELLO AYRES. *Fisiologia*. São Paulo: Guanabara Koogan,. P. 167-181.

STANBURY, J.B.; ERMANS, A.E.; BOURDOUX, P.; TODD, C.; OKEN, E.; TONGLET, R.; VIDOR, G.; BRAVERMAN, L.E.; MEDEIROS-NETO, G. Iodine-induced hyperthyroidism: occurrence and epidemiology., *Thyroid* v. 8, n. 1, p. 83-100, jan 1998.

SKRZYPIEC-SPRING, M.; GROTHUS, B.; SZELAG, A.; SCHULZ, R. Isolated heart perfusion according to Langendorff-still viable in the new millennium. *J Pharmacol Toxicol Methods.*, v. 55, n.2, p.113-26, Mar 2007.

SUN, Z.Q.; OJAMAA, K.; COETZEE, W.A.; ARTMAN, M.; KLEIN, I. Effects of thyroid hormone on action potential and repolarizing currents in rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v. 278, n.2, p.302-7, fev 2000.

SWAROOP, A.; RAMASARMA, T. Heat exposure and hypothyroid conditions decrease hydrogen peroxide generation in liver mitochondria. *Biochemical Journal*, v. 226, n. 2, p. 403–408, mar 1985.

TAKANO, A.P.; DINIZ, G.P.; BARRETO-CHAVES, M.L. AMPK signaling pathway is

rapidly activated by T3 and regulates the cardiomyocyte growth. *Mol Cell Endocrinol*, v. 376, n. 1-2, p. 43-50, ago 2013.

TANG, YD; KUZMAN JA; SAID S.; ANDERSON BE; WANG X; GERDES A.M. Low thyroid function leads to cardiac atrophy with chamber dilatation, impaired myocardial blood flow, loss of arterioles, and severe systolic dysfunction. *Circulation*, v.112, n.20, p.3122–3130, nov 2005.

TOMANEK, R.J.; ZIMMERMAN, M.B.; SUVARNA, P.R.; MORKIN, E.; PENNOCK, G.D.; GOLDMAN, S. A thyroid hormone analog stimulates angiogenesis in the post-infarcted rat heart. *J Mol Cell Cardiol*, v. 30, n.5, p. 923–932, maio 1998.

TRIBULOVA, N.; KNEZL, V.; SHAINBERG, A.; SEKI, S.; SOUKUP, T. Thyroid hormones and cardiac arrhythmias. *Vascul. Pharmacol.*, v.52, n. 3-4, p.102-12, mar 2010.

TURER, A.T.; HILL, J.A. Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for Therapy. *Am J cardiol.*, v. 106, n. 3, p.360–8, ago 2010.

UETA, C.B.; OSKOU EI, B.N.; OLIVARES, E.L.; PINTO, J.R.; CORREA, M.M.; SIMOVIC, G.; SIMONIDES, W,S,; HARE, J.M.; BIANCO, A.C. Absence of myocardial thyroid hormone inactivating deiodinase results in restrictive cardiomyopathy in mice. *Mol Endocrinol*, v. 26, n. 5, p. 809-18, maio 2012.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.*, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VASSALO, D. V.; OLIVEIRA, E.M; STEFANON, I. Contratilidade Miocárdica. In: MARGARIDA DE MELLO AYRES. *Fisiologia*. São Paulo: Guanabara Koogan, p.435-469., 2008.

VIVALDI, M. T; KLONER, R. A; SCHOEN, F. J. Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rats. *Am. J. Pathol.*, v.121, n.3, p. 522–530, dez 1985.

WALKER, M.J.; CURTIS, M.J.; HEARSE, D.J.; CAMPBELL, R.W.; JANSE, M.J.; YELLON, D.M.; COBBE, S.M.; COKER, S.J.; HARNESS, J.B.; HARRON, D.W., HIGGINS, A. J.; JULIAN, D. J.; LAB, M. J.; MANNING, A. S.; NORTHOVER, B. J.; PARRATT, J. R.; RIEMERSMA, R. A.; RIVA, E.; RUSSELL, D.C.; SHERIDAN, D. J.; WINSLOW, E.; WOODWARD, B. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res* , v. 22, n. 7, p. 447-55, jul 1988.

WALSH, J.P.; BREMNER, A.P.; BULSARA, M.K.; O'LEARY, P.; LEEDMAN, P.J.; FEDDEMA, P.; MICHELANGELI, V. Subclinical thyroid dysfunction as a risk factor for cardiovascular disease. *Arch Intern Med.* , v.165, n. 21, p. 2467-72, nov 2005.

WANG, B.; OUYANG, J.; XIA. Z. Effects of triiodo-thyronine on angiotensin-induced cardiomyocyte hypertrophy: reversal of increased β -myosin heavy chain gene expression.

Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, v. 84, n. 8-9, p. 935-941 , out 2006.

WANG, Y.Y.; JIAO, B.; GUO, W.G.; CHE, H.L.; YU, Z.B. Excessive thyroxine enhances susceptibility to apoptosis and decreases contractility of cardiomyocytes. *Mol Cell Endocrinol*, v. 14, n. 320, (1-2), p.67-75, Feb 2010.

WATANABE, H.; MA, M.; WASHIZUKA, T.; KOMURA, S.; YOSHIDA, T.; HOSAKA, Y.; HATADA, K.; CHINUSHI, M.; YAMAMOTO, T.; WATANABE, K.; AIZAWA, Y. Thyroid hormone regulates mRNA expression and currents of ion channels in rat atrium. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 308, n. 3, p. 439–444, ago 2003.

WHITTINGTON, H. J.; BABU, G.G.; MOCANU, M. M.; YELLON, D. M.; HAUSENLOY, D. J. The Diabetic Heart: Too Sweet for Its Own Good? *Cardiol Res Pract.* , fev 2012.

WOEBER, K.A. Thyrotoxicosis and the heart. *N. Engl. J. Med.*, v. 327, n. 2, p. 94–98, jul 1992.

WOJCICKA, A.; BASSETT, J.H.; WILLIAMS, G.R. Mechanisms of action of thyroid hormones in the skeleton. *Biochim Biophys Acta.*, v.1830, n.7, p.:3979-86, jul 2013.

WU, S.; TAN, G.; DONG, X.; ZHU, Z.; LI, W.; LOU, Z.; CHAI, Y. Metabolic profiling provides a system understanding of hypothyroidism in rats and its application. *PLoS One*, v. 8, n. 2. , fev 2013.

WU, Y.; PENG, J.; CAMPBELL, K.B.; LABEIT, S.; GRANZIER, H. Hypothyroidism leads to increased collagen-based stiffness and re-expression of large cardiac titin isoforms with high compliance. *J Molec Cell Cardiol*, v. 42, n. 1, p. 186-95, jan 2007.

XIA, H.J.; DAI, D.Z.; DAI, Y. Up-regulated inflammatory factors endothelin, NFkappaB, TNFalpha and iNOS involved in exaggerated cardiac arrhythmias in l-thyroxine-induced cardiomyopathy are suppressed by darusentan in rats. *Life Sci.*, v. 79, n. 19, p.1812-9, out 2006.

YAMADA-OKABE, T.; SATOH, Y.; YAMADA-OKABE, H. Thyroid hormone induces the expression of 4-1BB and activation of caspases in a thyroid hormone receptor–dependent manner. *Eur. J. Biochem.*, v. 270, n. 14, p. 3064-3073, jul 2003.

YETGIN, T.; MANINTVELD, O.C.; DUNCKER, D.J.; VAN DER GIESSEN, W.J. Postconditioning against ischaemia-reperfusion injury: ready for wide application in patients? *Neth Heart J.*, v. 18, n. 7-8, p. 389-92 , ago 2010.

YUE, L.; FENG, J.; GASPO, R.; LI, G.R.; WANG, Z.; NATTEL, S. Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ Res*, v. 81, n.4, p.512–525, out 1997.

ZHANG, L.; PARRATT, J.R.; BEASTALL, G.H.; PYNE, N.J.; FURMAN, B.L. Streptozotocin diabetes protects against arrhythmias in rat isolated hearts: role of hypothyroidism. *Eur. J. Pharmacol.* , v. 435, n. 2-3, p. 269-276, jan 2002.

ZIVKOVIC, V.; DJURIC, D.; TURJACANIN-PANTELIC, D.; MARINKOVIC, Z.; STEFANOVIC, D.; SREJOVIC, I.; JAKOVLJEVIC, V. The effects of cyclooxygenase and nitric oxide synthase inhibition on cardiodynamic parameters and coronary flow in isolated rat hearts. *Exp Clin Cardiol.*, v. 18, n. 2, p. 102-110, 2013.

ZOROV, D.B.; JUHASZOVA, M.; SOLLOTT, S.J. Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. *Biochim Biophys Acta.*, v. 1757, n. 5-6, p. 509-17, mai 2006.

ZWEIER, J.L.; TALUKDER, M.A. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res.*, v. 70, n. 2, p. 181-90, mai 2006.