

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FABRICIO FURTADO VIEIRA

**EFEITOS FUNCIONAIS DO HIPERTIREOIDISMO EM MÚSCULOS
PAPILARES ISOLADOS DE RATO: POSSÍVEIS ALTERAÇÕES NOS
MECANISMOS DE ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO CARDÍACO**



**CURITIBA
2012**

FABRICIO FURTADO VIEIRA

**EFEITOS FUNCIONAIS DO HIPERTIREOIDISMO EM MÚSCULOS
PAPILARES ISOLADOS DE RATO: POSSÍVEIS ALTERAÇÕES NOS
MECANISMOS DE ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO CARDÍACO**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação (Stricto Sensu) em Fisiologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça

**CURITIBA
2012**



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
 Setor de Ciências Biológicas
 Departamento de Fisiologia
 Programa de Pós-Graduação em Fisiologia




PARECER


Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **FABRICIO FURTADO VIEIRA** para fins de obter o título de Mestre em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer unânime à APROVAÇÃO do acadêmico.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

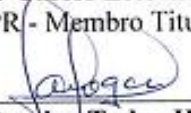
Curitiba, 05 de setembro de 2012.



Professor Doutor Julio Cesar Francisco
 PUC-PR - Membro Titular



Professor Doutor Carlos Estevam Nolf Damiani
 UFPR - Membro Titular



Professor Doutor Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça
 UFPR - Orientador e Presidente da Banca Examinadora

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo amor e a educação que me deram

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as conquistas.

Aos meus queridos pais, Sidney Vieira e Ivete Furtado Viera, que são os principais professores na minha vida e também a minha vó Zeny Buch Vieira pela ajuda.

Ao meu orientador Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça pela orientação, paciência e por me mostrar o magnífico mundo da fisiologia.

A professora Ilana Kassouf Silva pela ajuda e orientação na correção da dissertação.

Aos meus colegas de laboratório Priscyla Oliveira da Silva e João Capelli Peixoto pela amizade e colaboração nesse trabalho.

Ao meu colega de laboratório Robson Olivoto pelos ensinamentos na fase inicial do mestrado.

Ao meu amigo Gabriel Farhat pelo apoio e a grande amizade.

Ao meu amigo Mauro Ricetti Paes pelos alegres momentos de convivência.

A Vanessa Giacomet de Carvalho pelo amor, carinho, apoio e incentivo durante esses quase cinco anos.

As minhas colegas de mestrado Andressa Perin, Cláudia Pudell e Gláucia Tobaldini, pela ajuda e amizade.

A todos os professores do departamento de Fisiologia da UFPR, pelo ensinamentos passados.

E agradeço a todos que direta ou indiretamente colaboraram com esse trabalho.

RESUMO

Introdução: O íon cálcio (Ca^{2+}) tem uma grande importância como via de sinalização para a geração da despolarização, indução da liberação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático (RS) e na ativação da maquinaria contrátil. Condições fisiopatológicas que alterem o controle de Ca^{2+} pelos miócitos são uma das causas centrais de disfunções contráteis e arritmias no músculo cardíaco. No entanto, relativamente pouco se sabe sobre a influência do hormônio da tireóide sobre os eventos celulares associados com o aumento e a diminuição do Ca^{2+} citoplasmático no processo de acoplamento excitação-contração (AEC) do músculo cardíaco. **Objetivos:** Avaliar as alterações funcionais e propor como o Ca^{2+} esta sendo manuseado em músculos papilares isolados de animais com hipertireoidismo. **Materiais e métodos:** Foram utilizados 36 ratos wistars divididos em dois grupos, um grupo controle e um grupo hipertireoideo que foi induzido hipertireoidismo através de injeções intraperitoneais de T3 (15 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso animal) durante dez dias. Para avaliação funcional foram mensurados vários parâmetros contráteis como a força máxima de contração, $+\text{df}/\text{dt}$, $-\text{df}/\text{dt}$, tempo de contração e relaxamento, força de contração em diferentes concentrações de sódio extracelular, potenciação pós-pausa e força de contração induzida por cafeína. **Resultados:** As principais alterações encontradas nos animais hipertireoideos, comparado ao animal controle, foi uma diminuição na potenciação pós-pausa (PPP) em todos os tempos de pausa ($P < 0,05$); aumento na velocidade máxima de contração ($+\text{df}/\text{dt}$) e de relaxamento ($-\text{df}/\text{dt}$) ($P < 0,001$); diminuição no percentual de ganho de força com a diminuição da concentração de sódio extracelular ($P < 0,001$); diminuição da produção de força máxima na contração induzida por cafeína ($P < 0,003$); e diminuição no tempo para se atingir o pico de contração, diminuição no intervalo de tempo do pico de contração até o relaxamento máximo e diminuição no intervalo de tempo entre o início da contração até o relaxamento máximo ($P < 0,001$). O valor de força máxima na contração de músculos papilares estimulados eletricamente não apresentou diferença estatística entre os grupos ($P = 0,973$). **Conclusão:** A diminuição na PPP e na força máxima de contração induzida por cafeína é provavelmente devida à diminuição no conteúdo de cálcio do RS, causado pelo vazamento de Ca^{2+} do RS. A diminuição no percentual de ganho de força com a diminuição na concentração de sódio extracelular possivelmente reflete uma diminuição na expressão do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX). O aumento na velocidade máxima de contração e relaxamento são possivelmente devidos ao aumento na expressão da SERCA2 e α -MHC. Porém estudos mais aprofundados, com técnicas mais sensíveis para cada umas dessas hipóteses precisam ser realizados, para aumentar as evidências das possíveis modificações no AEC e no controle de cálcio pelo músculo cardíaco com hipertireoidismo.

Palavras – chave: Coração, hipertireoidismo, acoplamento excitação-contração, cálcio.

ABSTRACT

Introduction: The calcium ion (Ca^{2+}) has a great importance with a signaling pathway for the generation of depolarization, induced Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum (SR) and the activation of the contractile machinery. Pathophysiological conditions that alter the control of Ca^{2+} by myocytes is one of the central causes of contractile dysfunction and arrhythmias in cardiac muscle. However, relatively little is known about the influence of thyroid hormone on the cellular events associated with increased and decreased cytoplasmic Ca^{2+} in the process of excitation-contraction coupling (ECC) of the heart muscle. **Objectives:** To evaluate the functional changes and propose how Ca^{2+} is being handled in isolated papillary muscles of animals with hyperthyroidism. **Methods:** We used 36 Wistar rats were divided into two groups, a control group and a hyperthyroid group was induced by T3 intraperitoneal injections (15 $\mu\text{g}/100\text{g}$ weight animal) for ten days. For functional evaluation were measured several contractile parameters as the maximum force of contraction, $+\text{d}f/\text{d}t$, $-\text{d}f/\text{d}t$, time of contraction and relaxation, contraction force in different concentrations of extracellular sodium, post-rest potentiation and force of contraction induced by caffeine. **Results:** The primary findings in hyperthyroid animals compared to control animals, was a decrease in post-rest potentiation (PRP) in all pause times ($P < 0.05$), increase in the speed of contraction ($+\text{d}f/\text{d}t$) and relaxation ($-\text{d}f/\text{d}t$) ($P < 0.001$), decrease in the percentage of gain in strength with decreasing extracellular sodium concentration ($P < 0.001$), decreased production of maximum force contraction induced by caffeine ($P < 0.003$) and decreased the time to reach peak shrinkage, decrease in time interval of peak contraction to relaxation and decreased interval maximum time between onset of contraction until maximal relaxation ($P < 0.001$). The value of maximum force of contraction in papillary muscles stimulated electrically no showed statistically significant difference between groups ($P = 0.973$). **Conclusion:** The decrease in the PRP and the maximum force of contraction induced by caffeine is likely due to a decrease in calcium content of SR, caused by leakage of Ca^{2+} from SR. The decrease in the percentage of gain of strength with the decrease in extracellular sodium concentration may reflect a decrease in the expression of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanges (NCX). The increase in speed of contraction and relaxation are possibly due to increased expression of α -MHC and SERCA2. However further studies with more sensitive techniques for each one of these assumptions need to be made to increase the evidence of potential changes in the AEC and the control of calcium by heart muscle with hyperthyroidism.

Key - words: Heart, hyperthyroidism, excitation-contraction coupling, calcium.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Proteínas envolvidas na sinalização por cálcio em miócitos ventriculares..	13
Figura 2 - Organização do músculo estriado.....	14
Figura 3 – Estrutura esquemática do filamento fino	16
Figura 4 – Estrutura dos filamentos contráteis.	17
Figura 5 – Acoplamento excitação-contração no miócito cardíaco.....	23
Figura 6 – Representação e localização da glândula tireóide	24
Figura 7 – Representação da potenciação pós-pausa	35
Figura 8 – Efeitos da diminuição na concentração de sódio extracelular na força de contração.....	36
Figura 9 – Representação esquemática da contração muscular cardíaca	37
Figura 10 – Representação da contração muscular induzida por cafeína	38
Figura 11 – Força máxima de contração (mN/mm ²).....	40
Figura 12 – Velocidade máxima de contração	41
Figura 13 – Velocidade máxima de relaxamento	42
Figura 14 – Tempo para se atingir a contração máxima	43
Figura 15 – Tempo para se atingir o relaxamento máximo.....	44
Figura 16 – Tempo total de contração.....	45
Figura 17 – Percentual de força após a pausa.....	46
Figura 18 – Velocidade máxima de contração (+df/dt) na primeira contração após a pausa	47
Figura 19 – Percentual de aumento na +df/dt da primeira contração após a pausa	48
Figura 20 – Velocidade máxima de relaxamento (-df/dt) na primeira contração após a pausa	49
Figura 21 – Percentual de aumento na –df/dt da primeira contração após a pausa	50
Figura 22 – Percentual de força em diferentes concentrações de sódio extracelular	51
Figura 23 – Força máxima de contração induzida por cafeína	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeitos do hormônio da tireóide na regulação gênica	29
Tabela 2 – Peso dos animais no 1 ^o e 10 ^o dia.	39
Tabela 3 – Peso dos corações após os 10 dias de tratamento.	39
Tabela 9 – Percentual de força após a pausa.	46
Tabela 10 – Percentual de força em diferentes concentrações de sódio extracelular.	51

LISTA DE ABREVIATURAS

+df/dt	-	Primeira derivada da produção de força no tempo
-df/dt	-	Primeira derivada de decréscimo de força no tempo
AEC	-	Acoplamento excitação-contração
AMPc	-	Monofosfato cíclico de adenosina
ATP	-	Adenosina trifosfato
DHPR	-	Receptor diidropiridínico
DNA	-	Ácido desoxirribonucléico
FC	-	Frequência cardíaca
MHC	-	Cadeia pesada de miosina
MLC	-	Cadeia leve de miosina
NCX	-	Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
PKA	-	Proteína quinase A
PKC	-	Proteína quinase C
PLB	-	Fosfolambano
PPP	-	Potenciação pós-pausa
RNA _m	-	Ácido ribonucléico mensageiro
RS	-	Retículo sarcoplasmático
RyR	-	Receptor de rianodina
SERCA2	-	Bomba de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático
SLN	-	Sarcolipina
T3	-	Triiodotironina
T4	-	Tiroxina
TnC	-	Troponina C
TnI	-	Troponina I
TnT	-	Troponina T
TRs	-	Receptor de hormônio tireoidiano
TREs	-	Elementos responsivos aos hormônios tireoidianos
TRH	-	Hormônio liberador da tireotropina
TSH	-	Hormônio estimulante da tireóide

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Aspectos Estruturais e Moleculares da Célula Muscular Cardíaca	12
1.1.1 Filamentos Finos.....	15
1.1.2 Filamento Grosso.....	16
1.1.3 Ca ²⁺ - ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2).....	17
1.1.4 Receptor de Rianodina (RyR).....	18
1.1.5 Trocador Na ⁺ /Ca ²⁺ (NCX).....	19
1.1.6 Canal de Cálcio do Tipo-L.....	20
1.2 Acoplamento Excitação-Contração (AEC) do Músculo Cardíaco	20
1.3 Glândula Tireóide	23
1.3.1 Hipertireoidismo e suas implicações no sistema cardiovascular.....	26
1.3.2 Efeitos Genômicos.....	28
1.3.3 Efeitos Extranucleares.....	29
1.4 Justificativa	29
2 OBJETIVOS	31
2.1 Geral	31
2.2 Específicos	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Protocolos experimentais	33
3.2 Experimentos com músculo papilar estimulado eletricamente	34
3.2.1 Potenciação Pós Pausa.....	34
3.3.2 Produção de Força em Diferentes Concentrações de Sódio Extracelular.....	35
3.3.3 Velocidade Máxima de Contração e Relaxamento.....	36
3.3.4 Tempo para Contração Máxima, Relaxamento Máximo e Tempo Total de Contração.....	36
3.3 Avaliação da contração em papilares quiescentes	37
3.4 Análise estatística	38
4 RESULTADOS	39
4.1 Peso dos animais	39
4.2 Peso dos corações	39
4.3 Força máxima de contração	39
4.4 Velocidade de máxima de contração (+df/dt) e de relaxamento (-df/dt)	40
4.5 Tempo para contração máxima	42
4.6 Tempo para relaxamento máximo	43

4.7 Tempo Total de Contração	44
4.8 Potenciação Pós-Pausa (PPP)	45
4.9 $+df/dt$ da primeira contração após a pausa.....	47
4.10 $-df/dt$ da primeira contração após a pausa.....	48
4.11 Produção de força em diferentes concentrações de sódio extracelular	50
4.12 Avaliação da contração induzida por cafeína em músculos papilares quiescentes	52
5 <i>DISCUSSÃO</i>	53
6 <i>CONCLUSÕES</i>	63
7 <i>REFERÊNCIAS</i>	64
8 <i>APÊNDICE</i>	73

1 INTRODUÇÃO

Função endócrina normal é essencial para o bom desempenho das funções cardiovasculares. Distúrbios do sistema endócrino, consistindo de hiperfunção ou hipofunção hormonal, têm vários efeitos sobre o sistema cardiovascular (Rhee & Pearce, 2011).

A estreita ligação entre a glândula tireóide e coração ficou clara nas primeiras descrições do hipertireoidismo. Influências do aumento da secreção do hormônio da tireóide na função cardiovascular foram notados a mais de 200 anos atrás. Em 1785, um médico britânico, C. Parry, descreveu oito casos, todas mulheres, com um aumento da tireóide, aumento da frequência cardíaca, palpitações e quatro foram consideradas com hipertrofia cardíaca (Kahaly & Dillmann, 2005).

Atualmente é reconhecido que o hormônio tireoidiano afeta o sistema cardiovascular e que mudança nos níveis circulantes desse hormônio influencia a contratilidade e a função eletrofisiológica do coração (Klein, 1990). Aumento nos níveis de hormônio tireoidiano (hipertireoidismo) resultam no aumento da contratilidade cardíaca, incluindo maior velocidade de contração e relaxamento, aumento do débito cardíaco e frequência cardíaca aumentada (Carr & Kranias, 2002). Pacientes com hipertireoidismo geralmente apresentam sinais e sintomas relacionados ao sistema cardiovascular que incluem palpitações, taquicardia sinusal, fibrilação atrial, hipertensão sistólica, pressão de pulso aumentada, intolerância ao exercício e dispnéia (Rhee & Pearce, 2011; Kahaly & Dillmann, 2005).

O hipertireoidismo está entre os distúrbios endócrinos mais comuns. O hipertireoidismo está presente em 1,3% da população dos Estados Unidos. O hipertireoidismo é definido pela elevação dos níveis de hormônio da tireóide (T3 e/ou T4) e uma diminuída ou ausência de TSH (Rhee & Pearce, 2011).

O hipertireoidismo pode resultar de doenças auto-imune, nódulo na tireóide ou ingestão exógena de hormônio da tireóide (Rhee & Pearce, 2011), ocasionando aumento da taxa metabólica, aumento da temperatura, sudorese e sintomas como tremor, taquicardia, aumento do apetite, fadiga, intolerância ao calor, diarreia e perda de peso (Rhee & Pearce, 2011; Klein & Ojamaa, 2001; Boelaert & Franklyn, 2005).

1.1 Aspectos Estruturais e Moleculares da Célula Muscular Cardíaca

A contratilidade é uma das propriedades do músculo cardíaco (miocárdio), que apresentam células (cardiomiócito) com um aspecto estriado devido à disposição organizada do material contrátil em seu interior, formando sarcômeros com bandas claras e escuras (Aires, 2008; Van De Graaff, 2003).

O músculo cardíaco é formado de tecido conjuntivo e células musculares estriadas ramificadas, mas que se comunicam umas com as outras pelos discos intercalares. Nas regiões de contato entre as células, existem junções de baixa resistência elétrica, as junções comunicantes ou do tipo “*gap*”. São essas junções que permitem uma rápida transmissão dos impulsos de célula a célula, resultando em uma contração quase que simultânea de todas as células (Mattiuzzi, 2004; Aires, 2008).

A membrana do cardiomiócito apresenta o sistema tubular transversal, ou túbulos T, que são invaginações da membrana que penetram e percorrem transversalmente as células, estando em contato com o meio extracelular (Brette & Orchard, 2003; Brette & Orchard, 2007). Outro sistema tubular, o retículo sarcoplasmático (RS), tem localização estritamente intracelular. É formado por túbulos que correm longitudinalmente entre as miofibrilas e, na linha Z, formam as cisternas terminais que entram em contato com os túbulos T (Franzini-Armstrong, 1999). A função do RS é de armazenar cálcio (Ca^{2+}) para sua liberação no processo de contração, mas também controla ativamente a concentração de Ca^{2+} citosólico durante o relaxamento, fazendo a recaptção de Ca^{2+} para seu interior (Periasamy *et al.*, 2008). A região da cisterna terminal do RS, que entra em contato com os túbulos T é denominada retículo juncional (Figura 1 e 2) (Aires, 2008; Vassallo *et al.*, 1998).

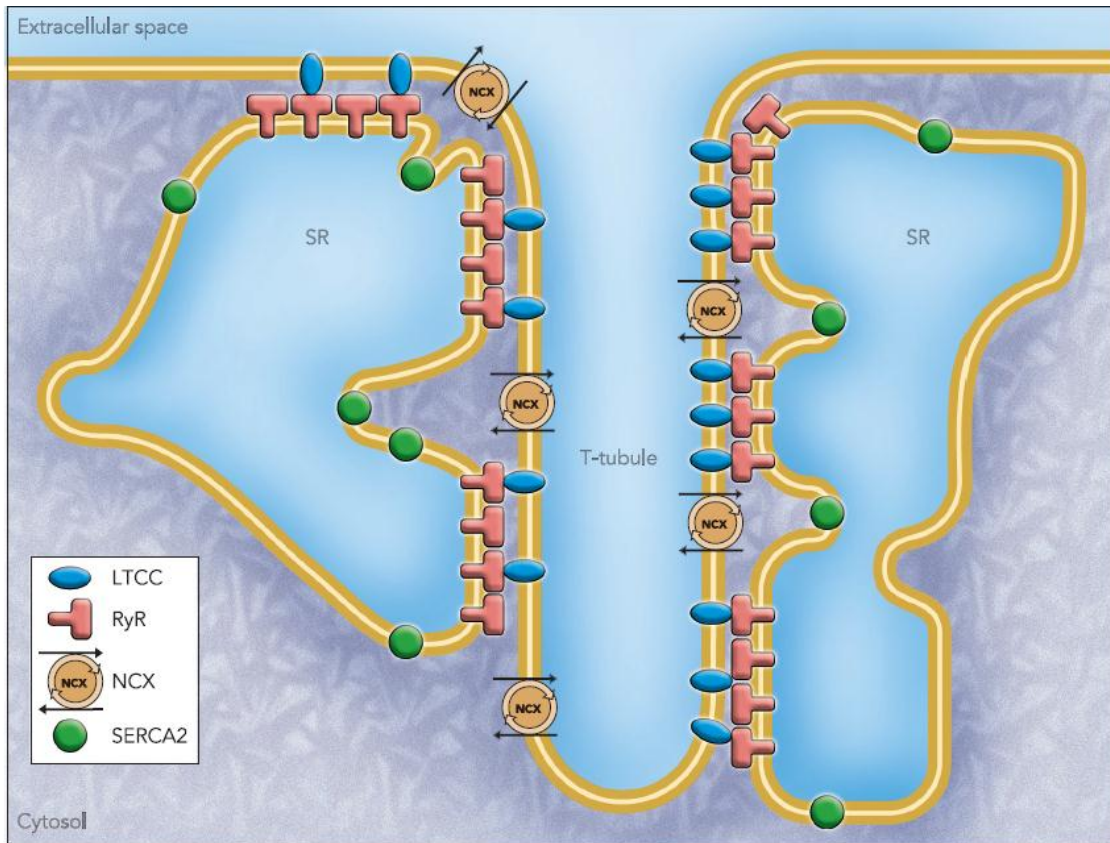


Figura 1 - Proteínas envolvidas na sinalização por cálcio em miócitos ventriculares. Membrana do retículo sarcoplasmático (RS) em estreita proximidade com sarcolema formando díades, que estão presentes principalmente nos túbulos transversais (túbulo-T), mas também na membrana de superfície. Díades compreendem um conjunto de receptores de rianodina (RyR) adjacentes a, e sob o controle funcional de, canais de Ca^{2+} do tipo-L (LTCC), o que constitui uma unidade de liberação de Ca^{2+} . Proteínas envolvidas na recaptção Ca^{2+} para o RS (Ca^{2+} - ATPase do RS, SERCA2) e extrusão de Ca^{2+} (Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX)). Fonte: Brette & Orchard, 2007.

Dentro das células musculares, encontramos o material contrátil. Este se encontra organizado formando uma estrutura repetitiva, o sarcômero, que é a unidade contrátil básica do músculo. O sarcômero é limitado por duas linhas ou discos Z adjacentes, o qual apresenta regiões claras e escuras denominadas, respectivamente, banda I e A. A banda I é formada por filamentos finos (actina, tropomiosina e troponina) que se ligam a linha Z. A banda A é formada principalmente por filamentos grossos (miosina). Nas porções laterais da banda A encontramos uma região de superposição entre os filamentos finos e grossos e entre estas, no meio da banda A, tem uma região onde só se encontram filamentos grossos, denominada de banda H. E na região mediana da banda A, os filamentos grossos apresentam um espessamento que gera a linha M (Figura 2) (Aires, 2008).

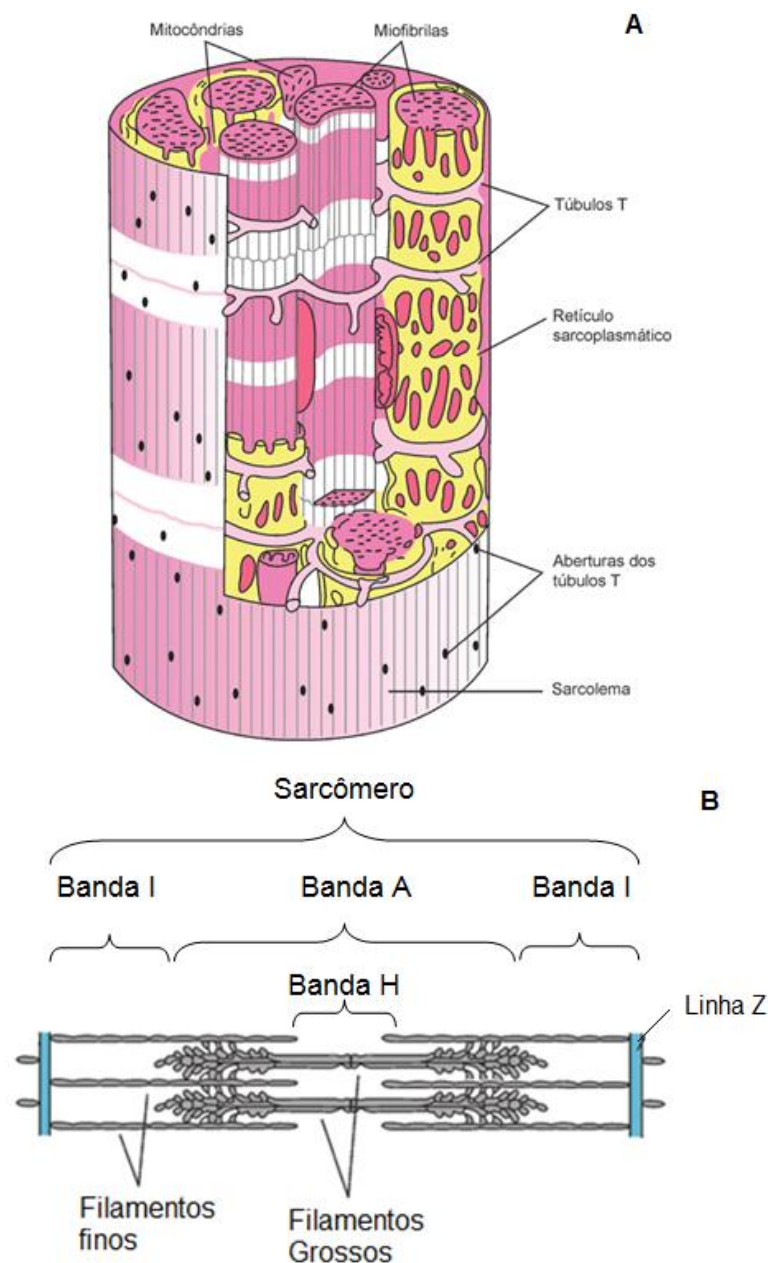


Figura 2 - Organização do músculo estriado. Na figura superior (A), se observa a fibra muscular envolvida superficialmente pela membrana plasmática (sarcolema). Projeções da membrana que penetram transversalmente no interior da célula formam os túbulos-T. No interior da célula, estruturas repetidas, denominadas de sarcômero, correm longitudinalmente a célula. E envolvendo as proteínas contráteis temos o retículo sarcoplasmático (representado em amarelo). Na figura inferior (B), observamos os detalhes do sarcômero, estrutura que se encontra entre duas linhas Z, que é formado por filamentos finos e grossos. Fonte: Aires, 2008.

A função primária dos cardiomiócitos consiste na transdução de energia química em energia mecânica. O processo cíclico de contração e relaxamento muscular está baseado na regulação e interação complexa entre as proteínas contráteis, processo que requer a participação do Ca^{2+} . As proteínas responsáveis

pelo mecanismo contrátil incluem a actina, miosina, tropomiosina e troponina (Gordon *et al.*, 2000).

1.1.1 Filamentos Finos

A actina tem como unidade básica a actina globular (G-actina) que, em presença de ATP, se polimeriza formando cadeias fibrilares (F-actina). Duas cadeias fibrilares de F-actina, entrelaçadas de forma helicoidal, formam o filamento de actina presente no sarcômero. A actina apresenta sítios ativos capazes de interagir com a miosina e durante essa interação a ATPase miosínica é ativada, hidrolisando ATP, com conseqüente liberação de energia necessária à contração (Aires, 2008; Calaghan *et al.*, 2004).

A tropomiosina é uma proteína alongada filamentosa composta por duas cadeias peptídicas helicoidais, que se estende sobre sete moléculas de actina. Durante o relaxamento muscular, quando os níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} estão baixos (de 10^{-7} a 10^{-8} M), a tropomiosina bloqueia o sítio de ligação da actina para miosina, impedindo a ligação entre essas duas moléculas. Em cardiomiócitos, durante a fase 2 do potencial de ação, o Ca^{2+} é liberado do retículo sarcoplasmático (RS) e, ligando-se à troponina C, causa a mudança conformacional na posição da tropomiosina no filamento fino expondo o sítio de ligação da actina à miosina (Gordon *et al.*, 2000).

O complexo troponina é composto por três subunidades protéicas, troponina-T (TnT), troponina-C (TnC) e troponina-I (TnI). A TnT é a subunidade ligante a tropomiosina quando o Ca^{2+} se liga a troponina (Perry, 1999). A troponina C tem grande afinidade pelo íon Ca^{2+} . A troponina I quando interage com a tropomiosina, provoca a inibição do sítio ativo da actina (Figura 3) (Mittmann *et al.*, 1990). A ligação do Ca^{2+} na TnC aumenta a interação entre TnC-TnI, enfraquecendo a ligação da TnI na actina, aumentando o movimento da tropomiosina sobre a superfície da actina. Esse movimento acaba expondo o sítio de ligação para miosina na actina que estava previamente ocupado pela tropomiosina, aumentando a probabilidade da ligação da miosina na actina, o que leva a contração muscular (Figura 3) (Gordon *et al.*, 2000).

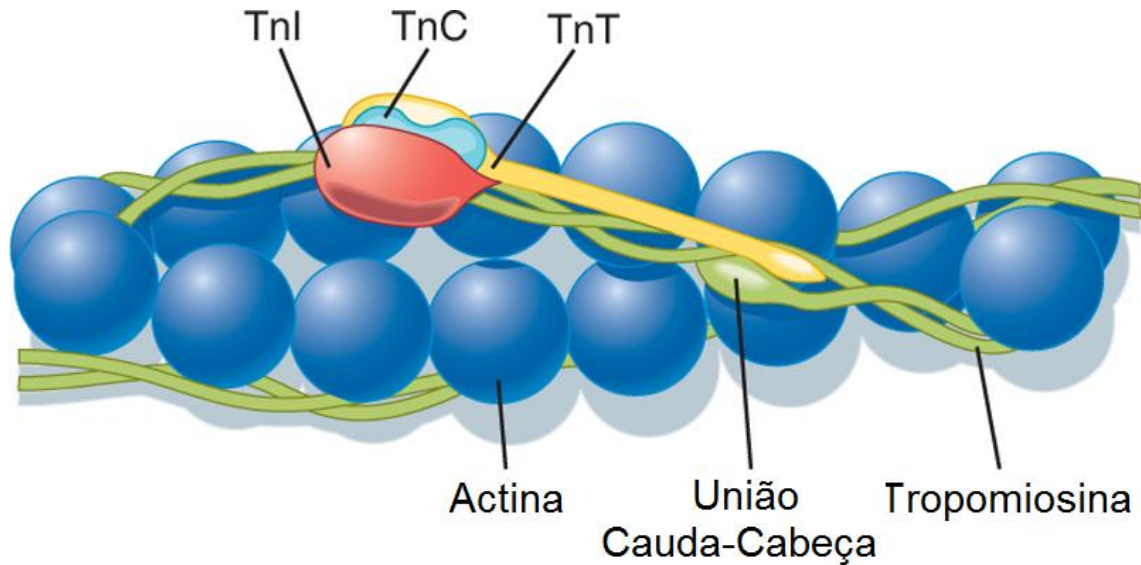


Figura 3 – Estrutura esquemática do filamento fino. Como ilustrado na figura, o filamento fino é formado pelas duas cadeias fibrilares de F-actina entrelaçadas, por duas moléculas de tropomiosina, que no estado de repouso ocupam o sulco do filamento de actina, e por três moléculas de troponina; troponina I (TnI), troponina C (TnC) e troponina T (TnT). Fonte: Koeppen & Stanton, (2009).

1.1.2 Filamento Grosso

O filamento grosso é formado pela união de moléculas de miosina. A miosina é formada por duas cadeias entrelaçadas que terminam numa estrutura globular. A hidrólise enzimática da miosina com tripsina a divide em uma porção leve, que forma grande parte da sua cauda, denominada meromiosina leve (MML), e uma porção pesada, que contém a região globular, denominada meromiosina pesada (MMP). Continuando com a hidólise a MMP se divide em duas subunidades, S1 e S2. A subunidade S1 corresponde à região globular. Essa subunidade é formada por um par de estruturas globulares, cada uma contendo uma cadeia pesada (MHC) e duas cadeias leves (MLC). A cadeia pesada tem atividade ATPásica (ATPase miosínica) e as cadeias leves regulam sua atividade. A cabeça globular é uma estrutura complexa, possuindo um sítio de ligação para actina e apresenta atividade ATPásica (Figura 4) (Rayment *et al.*, 1993; Aires, 2008).

Átrios e ventrículos contém duas isoformas de MHC que diferem na atividade ATPásica. A α -MHC, também chamada de V1, tem alta atividade ATPásica e promove uma rápida velocidade de contração das fibras musculares cardíacas (LeWinter & VanBuren, 2002). A β -MHC também chamada de V3 possui uma baixa

atividade ATPásica, levando a uma redução na velocidade de contração. Em humanos a β -MHC é a isoforma ventricular predominante durante toda vida adulta, entretanto pequenos níveis de α -MHC podem ser detectados no miocárdio humano (Sucharov *et al.*, 2003; LeWinter & VanBuren, 2002; Reiser *et al.*, 2001; Schaub *et al.*, 1997).

Com relação a MLC, uma é essencial (MLC1) e a outra é denominada cadeia leve 2 ou reguladora (MLC2 ou RLC). MLC1 tem como função manter a integridade da proteína. A MLC2 pode ser fosforilada, aumentando a sensibilidade do sistema contrátil ao Ca^{2+} , modulando a contração (Aires, 2008; Gordon *et al.*, 2000).

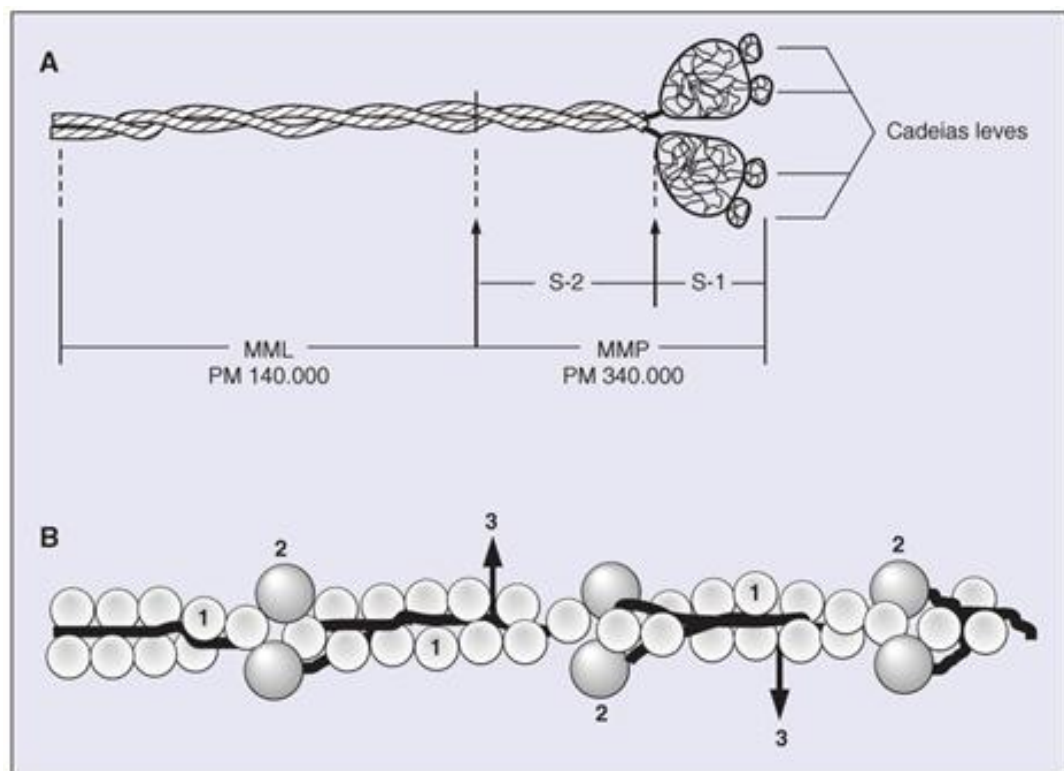


Figura 4 – Estrutura dos filamentos contráteis. **A.** esquema da estrutura da molécula de miosina. **MML** – meromiosina leve; **MMP** – meromiosina pesada. **S-1**, subfragmento da **MMP** que contém a cabeça da miosina. **S-2**, subfragmento da **MMP** que contém parte da cauda. **B.** Estrutura esquemática do filamento fino. **1** – monômeros de G-actina que se polimerizam formando F-actina. **2** – molécula de troponina. **3** – molécula de tropomiosina. Fonte: Aires, 2008.

1.1.3 Ca^{2+} - ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2)

A Ca^{2+} - ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2) é uma bomba de cálcio localizada na membrana do retículo sarcoplasmático (RS) e sua atividade

depende da presença de ATP. A SERCA2a, que é a isoforma mais abundante no tecido cardíaco, tem com função transportar o cálcio citoplasmático para o interior do RS, resultando no relaxamento muscular. Assim, a taxa de recaptção de cálcio pela SERCA2 é o principal determinante da velocidade de relaxamento cardíaco. A atividade da SERCA2 também pode influenciar indiretamente a velocidade e a força de contração por alteração no conteúdo de cálcio do RS (Bluhm *et al.*, 1999; Periasamy *et al.*, 2008; Kiriakis & Kranias, 2000).

No músculo cardíaco a atividade da SERCA2 é regulada por duas proteínas: fosfolambano (PLB) e sarcolipina (SLN). O Fosfolambano (PLB) é uma fosfoproteína composta por 52 aminoácidos e altamente expressa no músculo cardíaco, principalmente nos ventrículos. A PLB no seu estado não fosforilado, inibe a atividade da SERCA2. A fosforilação da PLB na serina 16 e da treonina 17 pela PKA ou pela CaMKII, respectivamente, aumenta a atividade da SERCA2, aumentando a recaptção de cálcio para o RS (Periasamy *et al.*, 2008). A Sarcolipina é uma proteína de baixo peso molecular, composta por 31 aminoácidos. No coração é expressa predominantemente nos átrios, sendo pouco expressa nos ventrículos. Seu efeito inibitório sobre a SERCA2 é similar ao efeito do PLB (Bhupathy *et al.*, 2007).

Condições patológicas (p. ex. insuficiência cardíaca) e mudanças nos níveis hormonais podem modificar a quantidade de SERCA2, influenciando no transporte de cálcio. É bem documentado que o hormônio da tireóide é um potente regulador da expressão de SERCA2 e da contratilidade do músculo cardíaco. No hipertireoidismo os níveis de SERCA2 se encontram aumentados, enquanto que ocorre uma diminuição do PLB. Essas modificações são consistentes com o aumento da velocidade de recaptção de cálcio pelo RS e aumento na função cardíaca observado em corações com hipertireoidismo (Periasamy *et al.*, 2008; Bhupathy *et al.*, 2007; Reed *et al.*, 2000).

1.1.4 Receptor de Rianodina (RyR)

Os receptores de rianodina (RyR), também chamados de canais liberadores de cálcio, estão localizados na membrana do retículo sarcoplasmático (RS). Quando ativados permitem a saída do Ca^{2+} que estava armazenado no RS para o citoplasma

do cardiomiócito, condição essencial para contração do músculo esquelético e cardíaco. A projeção citoplasmática desse receptor está voltada para a membrana dos túbulos-T, justapostos com os canais de cálcio do tipo-L (Laver, 2006; Zalk *et al.*, 2007).

No músculo cardíaco, o principal ativador do receptor de rianodina é o cálcio. Ele é proveniente da abertura dos canais de Ca^{2+} do tipo-L, durante a despolarização. Esse fenômeno no qual o cálcio, do meio extracelular, entra na célula e dispara a liberação de mais cálcio do RS é chamado de liberação de cálcio induzida por cálcio (CICR “*Calcium-Induced Calcium Release*”) (Fabiato, 1983).

Os receptores de rianodina são modulados por uma série de proteínas, que atuam aumentando ou diminuindo a probabilidade de sua abertura. A calstabinina, ou também chamada FKBP12.6 ou FK506, é essencial para manter o receptor no estado fechado. Já proteína quinase A (PKA) e CaMKII, que atuam fosforilando o receptor, aumentam sua probabilidade de abertura (Wehrens *et al.*, 2005; Zalk *et al.*, 2007).

1.1.5 Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX)

O trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) é uma proteína que se encontra na membrana celular e tem como função principal remover o cálcio da célula, ajudando no relaxamento do cardiomiócito. O NCX utiliza a energia armazenada do gradiente eletroquímico do sódio, permitindo o influxo de íons sódio a favor do seu gradiente eletroquímico, assim permitindo a extrusão do íon cálcio para fora da célula. O NCX funciona com uma estequiometria de 3 Na^+ :1 Ca^{2+} , removendo um íon cálcio em troca da entrada de três íons sódio, gerando uma corrente despolarizante (Reed *et al.*, 2000; Philipson & Nicoll, 2000).

Uma vez que o transporte é eletrogênico (altera o potencial de membrana), a despolarização da membrana pode inverter a direção do trocador, o que contribui para elevação do cálcio intracelular na fase inicial do platô, que em seguida, com a repolarização o cálcio passa a ser retirado da célula. Desta forma o NCX poderia contribuir para o processo contrátil e, logo em seguida, auxiliar no relaxamento. Além disso, como outras proteínas de transporte, a quantidade e a direção de transporte depende do gradiente iônico transmembrana. Isso significa que, quando

os níveis intracelulares de Na^+ estão aumentados, ou o nível extracelular está diminuído, o NCX começar a importar Ca^{2+} , funcionando no modo inverso (Diedrichs *et al.*, 2007; Philipson & Nicoll, 2000; Bassani & Bers, 1994).

Nos corações de animais com hipertireoidismo, os níveis de RNAm e proteína para NCX se encontravam diminuídas, enquanto que RNAm e proteínas para SERCA2 tiveram seus níveis aumentados. Nos corações dos animais com hipotireoidismo, no entanto, uma resposta oposta foi identificada. Estas descobertas são importantes e salientam que a expressão do NCX é regulada em sentido oposto ao da SERCA2, em resposta a alterações nos níveis de hormônio da tiróide (Reed *et al.*, 2000; Shenoy *et al.*, 2001).

1.1.6 Canal de Cálcio do Tipo-L

O canal de Ca^{2+} do tipo-L, também chamado de receptor diidropiridínico (DHPR), é um canal de Ca^{2+} sensível às alterações de voltagem. No ventrículo e átrio, esse canal tem uma grande concentração na membrana dos túbulos-T (Bers, 2002). O canal de Ca^{2+} do tipo-L participa da fase de platô no potencial de ação e exerce uma função primordial no acoplamento excitação-contração (AEC). Ao ser gerado um potencial de ação no cardiomiócito, uma onda de despolarização se propaga por toda membrana plasmática e túbulos-T e ao atingir os canais de Ca^{2+} do tipo-L vai ocorrer sua abertura e permitir a entrada de Ca^{2+} para o interior da célula. O influxo de Ca^{2+} através desses canais dispara a liberação de mais Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático para o citoplasma, culminando com a contração muscular (Bers, 2008).

1.2 Acoplamento Excitação-Contração (AEC) do Músculo Cardíaco

Os eventos que transcorrem da despolarização do sarcolema e a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático são definidos como processo de acoplamento excitação-contração (AEC) (Dulhunty, 2006). O processo de acoplamento excitação-contração do músculo cardíaco inicia-se por tanto, com a propagação do potencial de ação pelo sarcolema e ao longo do túbulo-transverso e termina com a liberação de

cálcio do RS (Bers, 2002). Porém nas décadas de 50 e 60, não se conheciam os eventos moleculares que ocorriam no intervalo de tempo entre o instante da aplicação de um estímulo na fibra muscular e no instante que se inicia a contração (Winegrad, 1965 Sandow, 1952).

A membrana da cisterna terminal do RS possui um canal de cálcio denominado receptor de rianodina (RyR), através do qual ocorre a liberação de Ca^{2+} do RS para o citosol (Ogawa, 1994; FranziniArmstrong & Protasi, 1997). No músculo cardíaco essa liberação é induzida pelo Ca^{2+} . Os canais de Ca^{2+} do tipo-L, localizados no sarcolema e principalmente nos túbulos-T, são canais iônicos sensíveis a voltagem, ou seja, sua conformação protéica se altera, abrindo em resposta à despolarização, permitindo assim o influxo de Ca^{2+} a favor de seu gradiente eletroquímico. O resultado do influxo de Ca^{2+} é a liberação de Ca^{2+} induzida pela ligação do Ca^{2+} ao RyR, levando a um fenômeno denominado de liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (Fabiato, 1983). Este mecanismo constitui-se num sistema de amplificação de sinal, pois uma pequena quantidade de cálcio proveniente do meio extracelular desencadeia uma liberação maciça deste íon do RS para o citosol, causando a contração do músculo cardíaco.

O mecanismo da liberação de cálcio induzida por íons cálcio (CICR) pode também envolver a participação do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, presente no sarcolema (Bridge *et al.*, 1990). Nesse trocador, o transporte de Ca^{2+} através do sarcolema esta acoplado ao movimento recíproco de Na^+ , com uma estequiometria de $3\text{Na}^+:1\text{Ca}^{2+}$ (Brenner & Yu, 1993). A direção na qual se realiza a troca depende fundamentalmente do gradiente eletroquímico para o Na^+ e o Ca^{2+} . Em repouso, ou diástole, o trocador utiliza o gradiente eletroquímico do sódio o qual favorece a entrada deste na célula e remove o Ca^{2+} para o meio extracelular (modo direto). Entretanto, durante a despolarização o gradiente eletroquímico para sódio é reduzido e quando o potencial transmembrana alcança valores inferiores a -20 mV (potencial de reversão), o trocador passa a trabalhar no modo inverso, ou seja, ocorre o influxo de Ca^{2+} e efluxo de Na^+ (modo reverso). No modo reverso o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ atua auxiliando o processo de liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} . No modo direto este sistema de troca atua induzindo o relaxamento muscular por meio da remoção do cálcio intracelular (Brenner & Yu, 1993; Sham *et al.*, 1992).

Na membrana do RS existe uma Ca^{2+} -ATPase denominada SERCA2, que transporta o cálcio para dentro do retículo sarcoplasmático, tendo papel principal no

processo de relaxamento muscular (Meyer *et al.*, 1999). O relaxamento do miócito cardíaco ocorre como consequência da diminuição da concentração de Ca^{2+} citosólico. A maior contribuição para diminuição da concentração de Ca^{2+} citosólico decorre da recaptação de Ca^{2+} para o interior do RS pela SERCA2. Menor contribuição é dada pela a extrusão de Ca^{2+} para o meio extracelular pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) e uma quantidade menor ainda é realizada pela Ca^{2+} -ATPase sarcolemal e uniporte de Ca^{2+} mitocondrial (Bers, 2002; Reed *et al.*, 2000).

A atividade da SERCA2 é regulada por uma fosfoproteína denominada fosfolambano (PLB). A fosforilação do PLB pela proteína quinase A (PKA) ou pela CaMKII e a redução da expressão de PLB acarreta a ativação da SERCA2, levando a recaptação de Ca^{2+} pelo RS, que promove o aumento na força de contração e na velocidade de relaxamento (Figura 5) (Ojamaa *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 1999).

O Ca^{2+} liberado liga-se ao seu sítio presente na subunidade da troponina C (TnC), a qual ativa a contração (Bers, 2002). Uma vez o Ca^{2+} ligado a TnC esta induz o movimento da molécula de tropomiosina em direção a ranhura do filamento fino resultando na exposição do sítio de ligação para miosina. O resultado desta desinibição estérica do filamento fino é o da formação e ciclização das pontes cruzadas ocasionando a geração de tensão e/ou encurtamento do sarcômero. Existem quatro sítios de ligação do Ca^{2+} na TnC. Dois desses sítios têm alta afinidade por Ca^{2+} , mas também ligam Mg^{2+} no repouso. Esses sítios parecem estar envolvidos no controle e aumento da interação entre as subunidades de troponina I e de troponina T. Os outros dois sítios têm baixa afinidade ao Ca^{2+} sendo por tanto ocupados, quando a concentração intracelular desse íon se elevar como consequência de sua liberação pelo RS (Bers, 2002).

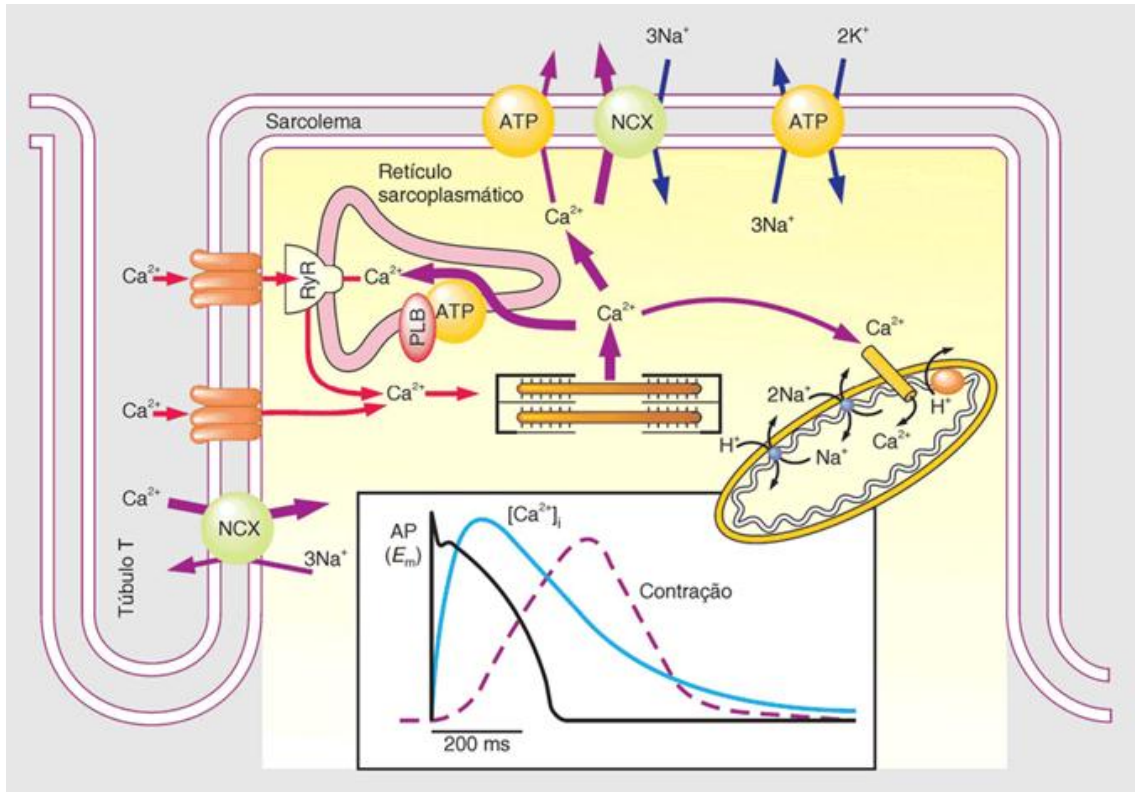


Figura 5 – Acoplamento excitação-contrção no miócito cardíaco. Representação esquemática do transporte de cálcio no miócito ventricular. A propagação do potencial de ação (PA) pelo sarcolema e túbulos – T acarreta a abertura dos canais de cálcio do tipo-L (representado na cor laranja) o que permite um pequeno influxo de íons Ca^{2+} para dentro da célula. Por meio do mecanismo de “liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} ”, os íons Ca^{2+} provenientes do líquido extracelular (LEC) induzem a liberação de íons Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) através dos receptores de rianodina (RyR) presentes nas membranas das cisternas terminais do RS. A ligação dos íons Ca^{2+} às TnC ativa o ciclo de pontes cruzadas, ocorrendo a sístole. A seguir, os íons Ca^{2+} são recaptados para o RS por meio de bombas de Ca^{2+} denominadas SERCA2, as quais estão sob regulação da proteína fosfolambano (PLB), e removidos para o LEC através de trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, ocorrendo a diástole. Bombas de Ca^{2+} presentes no sarcolema e uniporters para Ca^{2+} presentes na membrana mitocondrial completam a remoção de íons Ca^{2+} do sarcoplasma. Na^+/K^+ ATPases presentes no sarcolema asseguram a manutenção dos gradientes iônicos para Na^+ e K^+ . O quadro abaixo mostra as relações entre o PA, a concentração intracelular de íons Ca^{2+} e a contração muscular. **NCX**, trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; **RyR**, receptor de rianodina; **PLB**, fosfolambano; **ATP**, ATPase. Fonte: Modificada de Bers, 2002.

1.3 Glândula Tireóide

A glândula tireóide está localizada na parte anterior do pescoço e possui dois lobos, um direito e um esquerdo, unidos por uma banda central de tecido glandular denominado istmo (Figura 4) (Van De Graaff, 2003). Essa glândula secreta três hormônios: tiroxina (T4), triiodotironina (T3) e calcitonina. A calcitonina é um hormônio importante para o metabolismo do cálcio. O T3 e T4 têm importância

crítica para o crescimento e desenvolvimentos normais e para o metabolismo energético (Guyton & Hall, 1998; Rang & Dale, 2007).

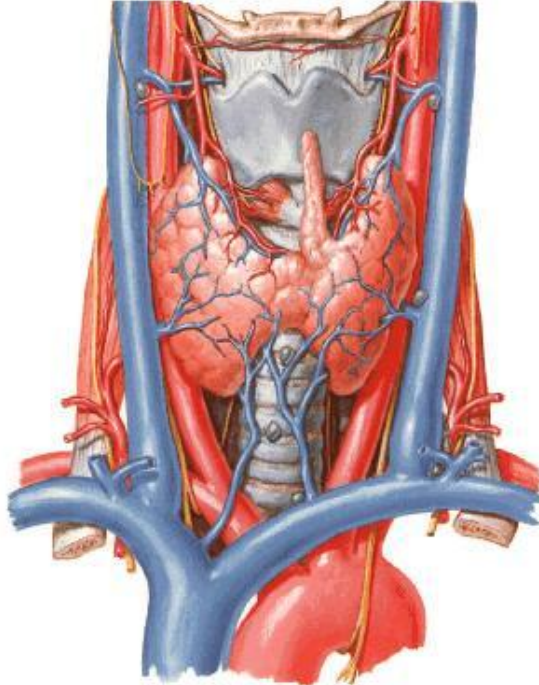


Figura 6 – Representação e localização da glândula tireóide. A glândula tireóide se localiza anteriormente a traquéia e apresenta dois lobos laterais e uma parte central que une os dois lobos, denominada istmo. Fonte: Netter, 1997.

Da produção de hormônio da tireóide no corpo, 85% é sintetizado e liberado da tireóide glândula como T4. Porém, o T3 é a forma celular ativa do hormônio da tireóide e é predominantemente obtido a partir da conversão periférica do T4 para T3 pela enzima 5' monodeiodinase do tipo-1 principalmente no fígado e rim (Danzi & Klein, 2002).

A produção e secreção hormonal são estimuladas pelo hormônio estimulante da tireóide (TSH), proveniente da hipófise anterior. Este, por sua vez, é estimulado pelo hormônio liberador de tireotrofina (TRH), proveniente do hipotálamo. Cada um desses hormônios está sob controle de retroalimentação negativa (*feedback* negativo), através da alça hipotálamo-hipófise-tireóide (Franklyn *et al.*, 1991).

As ações dos hormônios tireoidianos são classificadas em duas categorias: as que afetam o metabolismo e as que afetam o crescimento e o desenvolvimento (Rang & Dale, 2007).

Os efeitos sobre o metabolismo são os seguintes:

- Produzem aumento geral do metabolismo dos carboidratos, gorduras e proteínas;
- Ocorre aumento do consumo de oxigênio e na produção de calor;
- O excesso de hormônio tireoidiano resulta no aumento da frequência e do débito cardíaco e em maior tendência a arritmias.

Os efeitos sobre o crescimento e desenvolvimento são em partes, devido a ação direta nas células, e também indiretamente, por influenciar a produção de hormônio do crescimento e potencializar seus efeitos. O hormônio tireoidiano é importante para o desenvolvimento do esqueleto, do sistema nervoso central (Rang & Dale, 2007) e do sistema cardiovascular (Klein & Danzi, 2007).

As ações dos hormônios da tireóide resultam principalmente da interação do hormônio com receptores nucleares que interagem com sítios reguladores de genes, modificando sua expressão. Porém, efeitos chamados extranucleares, estimulando a atividade de proteínas específicas, independentemente da ligação com receptores nucleares tem sido descritos (Ojamaa *et al.*, 1996).

Alterações nos níveis de hormônio da tireóide têm um profundo impacto na contratilidade miocárdica, na velocidade de relaxamento, no débito cardíaco e frequência cardíaca. Seus efeitos são mediados em parte por sua capacidade de regular a expressão de várias proteínas chave, envolvidos na regulação da homeostase do cálcio intracelular, bem como proteínas miofibrilares específicas (Klein & Danzi, 2007; Carr & Kranias, 2002).

Aumento nos níveis de hormônio tireoidiano (hipertireoidismo) resultam no aumento da contratilidade cardíaca, incluindo maior velocidade de contração e relaxamento, aumento do débito cardíaco e frequência cardíaca aumentada, enquanto os efeitos opostos são observadas no hipotireoidismo (Carr & Kranias, 2002).

1.3.1 Hipertireoidismo e suas implicações no sistema cardiovascular.

As doenças da tireóide são bastante comuns. As estimativas atuais sugerem que afeta aproximadamente 9% a 15% da população adulta do sexo feminino e um percentual menor entre o sexo masculino. No entanto, com o avançar da idade, especialmente para além da oitava década de vida, a incidência das doenças no sexo masculino se torna igual à do sexo feminino (Klein & Danzi, 2007).

Das alterações da tireóide, o hipertireoidismo está entre os distúrbios endócrinos mais comuns. O Hipertireoidismo está presente em 1,3% da população dos Estados Unidos. O hipertireoidismo é definido pela elevação dos níveis de hormônio da tireóide (T3 e/ou T4) e uma diminuída ou ausência de TSH (Rhee & Pearce, 2011).

O hipertireoidismo pode resultar de doenças auto-imune, nódulo na tireóide ou ingestão exógena de hormônio da tireóide (Rhee & Pearce, 2011), ocasionando aumento da taxa metabólica, aumento da temperatura, sudorese e sintomas como tremor, taquicardia, aumento do apetite, fadiga, intolerância ao calor, diarreia e perda de peso (Rhee & Pearce, 2011; Klein & Ojamaa, 2001; Boelaert & Franklyn, 2005).

É reconhecido que o hormônio tireoidiano afeta o sistema cardiovascular e que mudança nos níveis circulantes desse hormônio influencia a contratilidade e a atividade elétrica do coração (Klein, 1990). Aumento nos níveis de hormônio tireoidiano (hipertireoidismo) resultam no aumento da contratilidade cardíaca, incluindo maior velocidade de contração e relaxamento, aumento do débito cardíaco e frequência cardíaca aumentada (Carr & Kranias, 2002). Pacientes com hipertireoidismo geralmente apresentam sinais e sintomas relacionados ao sistema cardiovascular que incluem palpitações, taquicardia sinusal, fibrilação atrial, hipertensão sistólica, pressão de pulso aumentada, intolerância ao exercício e dispnéia (Rhee & Pearce, 2011; Kahaly & Dillmann, 2005).

No hipertireoidismo as alterações hemodinâmicas mais evidentes incluem diminuição da resistência vascular sistêmica (RVS), aumento da frequência cardíaca, o aumento da pré-carga cardíaca, e aumentou o débito cardíaco. Redução da RVS é devido ao relaxamento do músculo liso vascular, mediado pelo hormônio da tireóide e aumento da produção de óxido nítrico (NO) endotelial. A diminuição na RVS ativa o sistema renina-angiotensina-aldosterona levando ao aumento do

volume plasmático e um aumento da pré-carga cardíaca. A combinação da pré-carga aumentada e diminuição da RVS leva o aumento do débito cardíaco. Aumentos na contratilidade e na frequência cardíaca em repouso podem contribuir para o aumento no débito cardíaco, que pode ser de 50% - 300% maior em pacientes com hipertireoidismo (Rhee & Pearce, 2011; Kahaly & Dillmann, 2005, Dillmann, 2002).

Hipertensão arterial sistólica pode resultar do efeito combinado do aumento da pré-carga e débito cardíaco e diminuição da complacência arterial. Hipertrofia ventricular esquerda (HVE) tem sido associada com o hipertireoidismo. As mudanças hemodinâmicas resultantes do hipertireoidismo aumentam o trabalho cardíaco e induz uma hipertrofia cardíaca compensatória ao longo do tempo. Hipertireoidismo também está associada ao aumento da velocidade de relaxamento diastólico. A curto prazo, o hipertireoidismo pode estar associada com a melhor função diastólica. No entanto, a longo prazo, o hipertireoidismo crônico pode induzir disfunção diastólica e HVE (Rhee & Pearce, 2011).

Intolerância ao exercício e dispnéia de esforço no hipertireoidismo pode resultar de uma incapacidade para aumentar ainda mais frequência cardíaca e fração de ejeção, ou para diminuir ainda mais no RVS no exercício. Pacientes com hipertireoidismo também pode ter fraqueza nos músculos esquelético e/ou da musculatura respiratória que reduz ainda mais a capacidade de exercício (Rhee & Pearce, 2011).

Taquicardia sinusal ocorre em aproximadamente 40% dos pacientes com hipertireoidismo e geralmente desaparece após a restauração dos níveis normais do hormônio tireoidiano. A fibrilação atrial é a segunda arritmia mais comum no hipertireoidismo, e ocorre em 10% - 15% dos pacientes, a sua prevalência aumenta com a idade (Rhee & Pearce, 2011; Kahaly & Dillmann, 2005; Dillmann, 2002).

Há evidências de que a expressão gênica e mudanças fenotípicas do coração são extremamente sensíveis ao hormônio da tireóide. Numerosos estudos, *in vivo* e *in vitro*, sugerem que as alterações nos níveis do hormônio tireoidiano podem afetar a expressão gênica dos miócitos cardíacos e, conseqüentemente, alterar a função cardíaca (Morkin, 1993).

De forma geral, as ações dos hormônios da tireóide (especialmente o T3) sobre o coração, resultam de efeitos que ocorrem através de três vias: ligação a receptores intracelulares específicos (efeitos genômicos), alteração da atividade do

sistema nervoso autônomo simpático e modificações hemodinâmicas periféricas, além dos efeitos extracelulares (efeitos não genômicos) que são menos entendidos (Kahaly & Dillmann, 2005).

1.3.2 Efeitos Genômicos

No interior do miócito, os efeitos nucleares do hormônio da tireóide são mediados pela interação do T3 com seu receptor (TRs). Existem quatro importantes isoformas de TRs (TR α 1, TR α 2, TR β 1, TR β 2) caracterizadas em humanos (Harvey & Williams, 2002). Estas proteínas receptoras estão ligadas a regiões promotoras de genes responsivos ao T3. O complexo T3-TRs se liga a elementos de resposta a hormônio tireoidiano (TREs) o qual são seqüências específicas de DNA. Essa interação T3-TRs-TREs ativa a transcrição de genes regulados positivamente pelo T3, recrutando complexos co-ativadores e reprimem sua transcrição na ausência de T3 através do recrutamento de complexos co-repressores (Kahaly & Dillmann, 2005; Danzi & Klein, 2002; Boelaert & Franklyn, 2005).

Os níveis de T3 regulam tanto a transcrição como a pós-transcrição de diversas proteínas regulatórias da função cardíaca. Desencadeia regulação nuclear positiva da cadeia pesada de miosina alfa (α -MHC), Ca²⁺ - ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2), receptores β_1 – adrenérgicos, Na⁺/K⁺ - ATPase, canais de potássio voltagem dependente (Kv1.5, Kv4.2, Kv4.3); e regulação negativa da cadeia pesada de miosina β (β -MHC), fosfolambano, adenilil ciclases tipos V e VI, receptor nuclear de triiodotironina α 1 e do trocador Na⁺/Ca²⁺ (Danzi & Klein, 2012; Ojamaa *et al.*, 1999). e as alterações nessas proteínas contribuem para as alterações na função sistólica e diastólica (Kiss *et al.*, 1994; Ojamaa *et al.*, 2000) (Tabela 1).

Tabela 1 – Efeitos do hormônio da tireóide na regulação gênica**GENES REGULADOS POSITIVAMENTE**

α-MHC
SERCA2
Receptor β₁ – adrenérgicos
Canais de K⁺
Na⁺/K⁺ ATPase

GENES REGULADOS NEGATIVAMENTE

β-MHC
Fosfolambano
Trocador Na⁺/Ca²⁺
Receptor nuclear α1
Adenilil ciclase

1.3.3 Efeitos Extranucleares

As ações extranucleares, ou não genômicas, do hormônio da tireóide não requerem a formação de um complexo nuclear com o hormônio. Quando comparadas às ações nucleares, os efeitos extranucleares ocorrem muito rapidamente, em até alguns minutos (Kahaly & Dillmann, 2005).

Entre as ações não-genômicas do T3 e que são relevantes para o coração estão as que ocorrem nas membranas, afetando canais iônicos ou bombas. Por exemplo, tem sido relatado que o hormônio da tireóide prolonga a abertura dos canais de sódio e cálcio, ativa a proteína quinase C (PKC), aumenta a atividade da Na⁺/K⁺ ATPase e da Ca²⁺-ATPase do sarcolema e aumenta a densidade dos receptores β₁ – adrenérgicos na membrana celular (Davis & Davis, 2002; Incerpi, 2005; Kahaly & Dillmann, 2005).

1.4 Justificativa

As doenças cardiovasculares são as principais causas de mortalidade e morbidade em todo o mundo. Distúrbios da função tireoidiana provocam alterações do débito cardíaco e da pressão arterial por alterarem a contratilidade miocárdica, a velocidade de relaxamento diastólico, a frequência cardíaca, o retorno venoso e a resistência vascular periférica (Klein & Ojamaa, 2001).

O hormônio da tireóide provoca hipertrofia cardíaca e tem sido demonstrado que uma variedade de proteínas nos miócitos cardíacos, incluindo as cadeias pesadas da miosina α e β , receptores β -adrenérgicos, SERCA2 e fosfolambano são regulados pelo hormônio tireoideano (Dillmann, 2010; Ojamaa *et al.*, 2000; Reed *et al.*, 2000).

Alguns dos efeitos mais marcantes do hormônio da tireóide no músculo cardíaco envolvem modificações no controle de cálcio celular. Essas alterações influenciam principalmente a recaptação de Ca^{2+} citosólico para o RS, velocidade de relaxamento, força de contração e conteúdo de Ca^{2+} do RS. As modificações no controle do cálcio celular que são observadas no hipertireoidismo são causadas, em partes, pelo aumento na expressão da SERCA2 (Reed *et al.*, 2000) e diminuição do fosfolambano, que inibe a SERCA2 (Dillmann, 2010; Ojamaa *et al.*, 2000).

Devido a grande importância do Ca^{2+} com uma via de sinalização para a geração da despolarização, indução da liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático e na ativação da maquinaria contrátil, condições fisiopatológicas que alterem o controle de Ca^{2+} pelos miócitos é uma das causas centrais de disfunções contráteis e arritmias no músculo cardíaco (Bers, 2002).

No entanto, relativamente pouco se sabe sobre a influência do hormônio da tireóide sobre os eventos celulares associados com o aumento e a diminuição do Ca^{2+} citoplasmático no processo de acoplamento excitação-contração do músculo cardíaco (Jiang *et al.*, 2000).

Apesar da grande quantidade de informações sobre as modificações na expressão gênica de proteínas envolvidas no acoplamento excitação-contração, pouco se sabe a respeito como essas modificações afetam o controle de Ca^{2+} celular e quais seriam as repercussões funcionais no hipertireoidismo.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os efeitos funcionais do hipertireodismo em músculos papilares isolados de ratos.

2.2 Específicos

Empregando-se animais eutireóides e hipertireóides os objetivos do nosso trabalho foram:

- Avaliar, em músculos papilares isolados estimulados eletricamente e em condições isométricas, parâmetros de contratilidade (força absoluta, velocidade máxima de produção de força ($+df/dt$) e relaxamento ($-df/dt$), potenciação pós-pausa (PPP), força absoluta em diferentes concentrações de sódio extracelular e tempo de contração e relaxamento).
- Avaliar, em músculos papilares isolados e quiescentes, a força de contração induzida por cafeína.
- E com bases nesses dados de contratilidade, avaliaremos as possíveis mudanças no conteúdo de cálcio do RS e as possíveis modificações nas estruturas moleculares responsáveis pelo acoplamento excitação-contração no músculo cardíaco com hipertireoidismo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo experimental foram utilizados 36 (n=36) ratos machos Wistar, pesando entre 250-300g, fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram mantidos em gaiolas sob condições de controle de temperatura e um ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à ração e água. Todos os procedimentos realizados nesse trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciência Biológicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR; certificado nº 582.

Os animais foram divididos de forma aleatória em dois grupos, sendo um grupo controle (n=18) e um grupo hipertireoideo (n=18). No grupo hipertireoideo (GH), a indução do hipertireoidismo foi feita com injeções diárias, intraperitoneal, de hormônio tireoidiano (T3 – 15µg/100g) durante dez dias. Os animais do grupo controle (GC) receberam injeções diárias de solução salina pelo mesmo período (Wolska *et al.*, 1997).

Para realização dos experimentos, os animais eram submetidos à anestesia com cloridrato de ketamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilazina (20 mg/kg). Após a verificação de falta de resposta a estímulos dolorosos na raiz da cauda, nas orelhas e no tendão calcâneo, o animal era sacrificado através da secção medular na região cervical e logo em seguida era realizado a exsanguinação. Após todos esses procedimentos, iniciava-se a retirada cirúrgica do coração.

Inicialmente, o animal era preso pelas quatro patas em decúbito dorsal e era feito a toracotomia, sendo removido o coração. Após sua retirada, ele era colocado em um Becker de 5 mL contendo solução de “Ringer” com a seguinte composição (em mM): NaCl=110; KCl=4,0; CaCl₂=2,0; MgCl₂=2,0; TRIS=10 e glicose=11, com pH=7,4. Na seqüência, o coração era pesado e depois colocado e fixado em uma placa de Petri, contendo solução de Ringer previamente oxigenada, para ser feito a abertura do ventrículo esquerdo e com o uso de um estéreo microscópio, era realizada a dissecação dos músculos papilares.

O músculo papilar removido era então fixado em uma de suas extremidades a um micromanipulador e a outra, a um transdutor de força (WPI-Fort 10, *Transuction Laboratories Co.*) que é ligado a um sistema de aquisição de dados (*LabChart - ADInstruments*) conectado a um computador. Mediante o emprego do

micromanipulador, o músculo era estirado até o L_{max} (comprimento do músculo no qual a tensão ativa é máxima). A preparação era sempre mantida em uma câmara com solução fisiológica, com capacidade para 3 ml, continuamente oxigenada e mantida a 32° Celsius.

Antes de cada experimento, realizava-se a curva de calibração do transdutor de força obtida com massas conhecidas. Também era mensurado o comprimento do músculo papilar, com o uso de uma gráticula posicionada na ocular do estéreo microscópio. No final de cada experimento, os músculos papilares eram pesados. A área de secção transversa das preparações foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Área} = \text{massa} / (\text{comprimento} \times \text{densidade})$$

Assumindo densidade como 1,0.

Assim, a força produzida pelos músculos papilares está normalizada pela sua área de secção transversa. A partir daí era iniciado os protocolos experimentais. Em nosso trabalho não foram mensuradas as dosagem dos hormônios tireoidianos, pois esse protocolo de indução do hipertireoidismo já foi realizado em nosso laboratório em trabalhos anteriores e foi observado mudanças nos níveis hormonais condizentes com uma situação de hipertireoidismo (Szkudlarek, 2011).

3.1 Protocolos experimentais

Com a finalidade de avaliar o efeito do hormônio tireoidiano, os animais dos dois grupos foram submetidos a dois protocolos experimentais. No primeiro protocolo foram feitas várias mensurações de contratilidade dos músculos papilares isolados e estimulados eletricamente. No segundo protocolo foi avaliada a força de contração, induzida por cafeína, dos músculos papilares quiescentes (não estimulados eletricamente).

3.2 Experimentos com músculo papilar estimulado eletricamente

Após o músculo papilar ser isolado e fixado ao transdutor de força, conforme descrito anteriormente, os músculos foram estimulados eletricamente com pulsos supralimiares de voltagem (10 a 15 V), duração no máximo de 5 milissegundos (ms), através de um par de eletrodos de platina posicionados ao longo de toda a extensão do músculo. Mediante o emprego do micromanipulador, procedeu-se com o estiramento do músculo até L_{max} (comprimento do músculo no qual a tensão ativa é máxima). A frequência de estimulação padrão foi de 0,5 Hz (condição estabilizada). Nestas condições, as preparações foram mantidas por um período de estabilização de 20 a 30 minutos e, em seguida, foram realizados os protocolos experimentais. A força desenvolvida foi digitalizada e registrada por um sistema de aquisição de dados (*LabChart - ADInstruments*) conectado a um computador.

Em nosso trabalho foram analisados os seguintes parâmetros contráteis: máxima força isométrica desenvolvida (F); potenciação pós pausa (PPP), que é o aumento da força de contração isométrica obtida após pausas na estimulação elétrica de 1, 3, 5, 10 e 20 segundos; velocidade máxima de contração ($+df/dt$) e de relaxamento ($-df/dt$); tempo para se atingir o pico de contração, intervalo de tempo do pico de contração até o relaxamento máximo e tempo total da contração; e força de contração máxima em diferentes concentrações de sódio extracelular.

3.2.1 Potenciação Pós Pausa

Após a estabilização da preparação, foi interrompida a estimulação elétrica dos papilares por um período de 1, 3, 5, 10 e 20 segundos. A amplitude da primeira contração após a pausa foi comparada à amplitude da força obtida anteriormente ao período de pausa. Estes valores foram analisados e expressos em valores percentuais, aos valores de força obtidos no estado estacionário, anterior ao período de pausa (Figura 7).

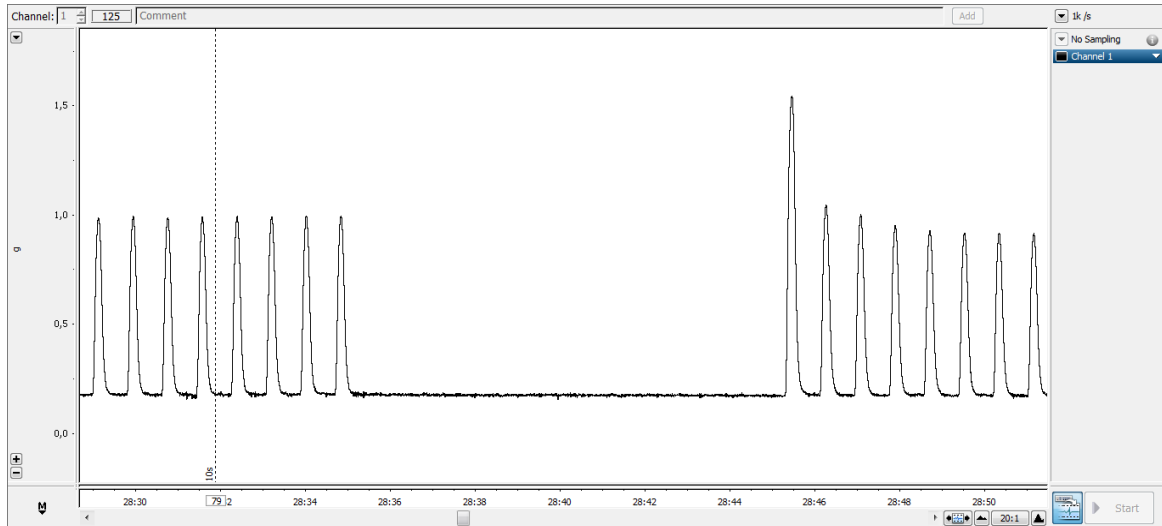


Figura 7 – Representação da potenciação pós-pausa. Essa figura demonstra como uma pausa de 10 segundos na estimulação elétrica acarreta o aumento da força na primeira contração após a pausa.

3.3.2 Produção de Força em Diferentes Concentrações de Sódio Extracelular

Após a estabilização da preparação em Ringer com uma concentração de 110mM de NaCl (descrita anteriormente), a preparação passou para uma câmara com solução Ringer com 90mM de NaCl. Após a estabilização da contração, esse procedimento também foi repetido com soluções de 70 e 50mM de NaCl. Para manter a osmolaridade e a força iônica igual da solução Ringer com 110mM de NaCl, as outras soluções foram completadas com cloreto de lítio (LiCl) até se chegar a concentração de 110mM. A amplitude da contração após a mudança da concentração de sódio foi comparada à amplitude da contração obtida anteriormente ao período da mudança. Os valores foram analisados e expressos em valores percentuais, tomando como referência os valores de força obtidos no estado estacionário, anterior a mudança da concentração de sódio (Figura 8).

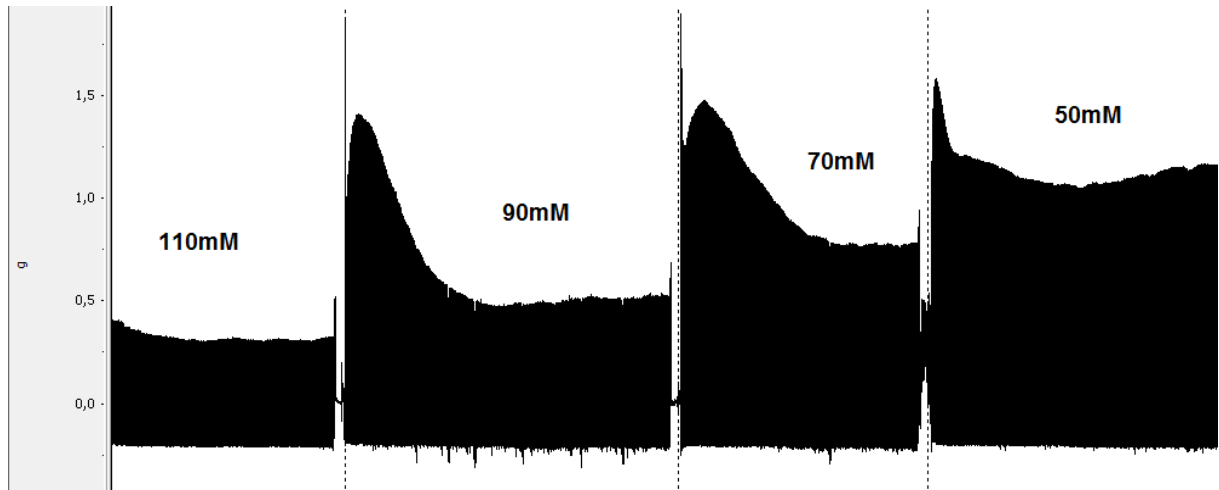


Figura 8 – Efeitos da diminuição na concentração de sódio extracelular na força de contração. A diminuição na concentração de sódio extracelular acarreta o aumento na força de contração muscular. Nessa figura esta demonstrada a geração de força na soluções de 110, 90, 70 e 50mM de NaCl. As soluções de 90, 70 e 50mM eram completadas com cloreto de lítio (LiCl) até atingir a concentração de 110mM.

3.3.3 Velocidade Máxima de Contração e Relaxamento

A velocidade máxima de contração ($+df/dt$) e a velocidade máxima de relaxamento ($-df/dt$), serão calculadas em tempo real empregando o programa de computador LabChart, o qual será utilizado para processamento, aquisição e análise dos dados. Mensuram-se as velocidades máximas de contração ou de relaxamento, tomando-se o intervalo de tempo onde foi obtida a maior variação de força. Os dados foram expressos em força produzida por área de secção transversa do músculo por segundo ($mN/mm^2/seg$).

3.3.4 Tempo para Contração Máxima, Relaxamento Máximo e Tempo Total de Contração

O tempo necessário para se atingir 100% da força máxima, para atingir 100% do relaxamento a partir do pico de contração e o tempo total de contração foi analisado e expresso em segundos (s) (Figura 9).

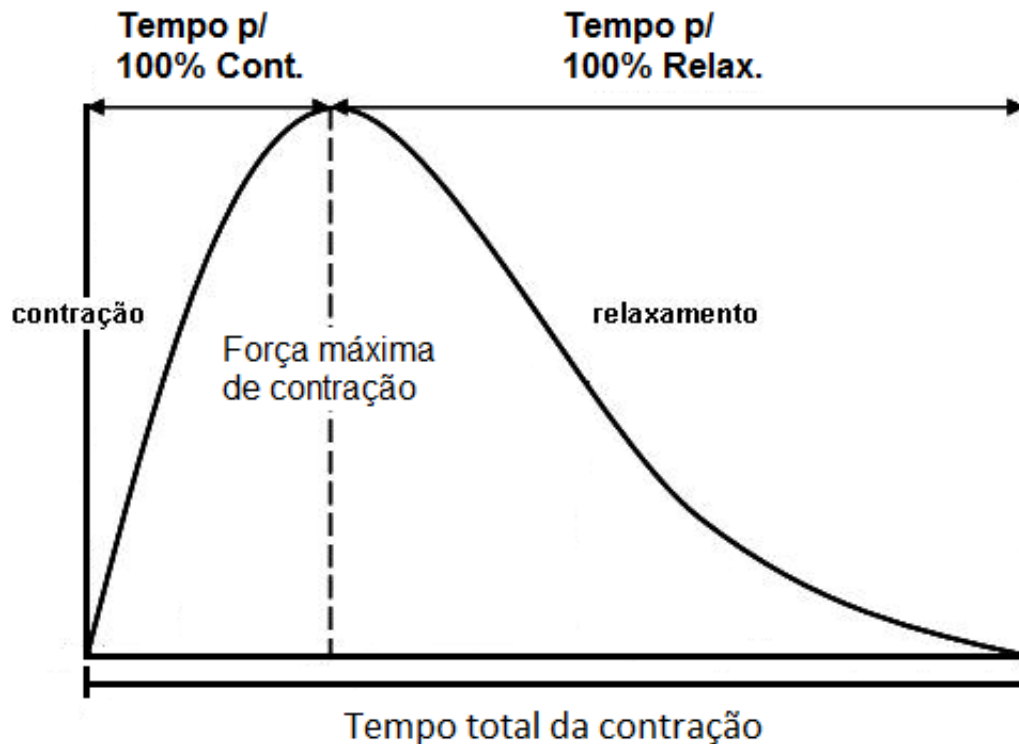


Figura 9 – Representação esquemática da contração muscular cardíaca. A contração do músculo cardíaco é representada por uma fase ascendente, também chamada de contração, e uma fase descendente ou relaxamento. Pode ser observado que o relaxamento é mais lento que a contração. Do relaxamento máximo, no início da contração, até o ponto mais alto da contração, representa a força máxima de contração.

3.3 Avaliação da contração em papilares quiescentes

Para dissecação e montagem dos papilares na câmara foram utilizados os mesmos procedimentos descritos anteriormente. Porém nesse protocolo os papilares não eram estimulados eletricamente.

Para a realização deste protocolo foram utilizadas três câmaras contendo diferentes soluções. Na primeira foi utilizada solução de Ringer a qual já foi descrita anteriormente. Na segunda câmara utilizaremos a solução de Ringer sem sódio e cálcio (Ringer $0\text{Na}^+ - 0\text{Ca}^{2+}$). Esta solução foi preparada substituindo o íon sódio e o íon cálcio por cloreto de lítio, com o objetivo de manter-se a osmolaridade e a força iônica igual a solução de Ringer. A última câmara era preenchida com solução de Ringer $0\text{Na}^+ - 0\text{Ca}^{2+}$ acrescida de 30mM de cafeína. É descrito na literatura que a cafeína, um conhecido agonista de RyRs, na concentração de 30 mM, é capaz de induzir a liberação total dos estoques de Ca^{2+} do RS (Sekiguchi & Shimizu, 1987).

A preparação foi inicialmente mergulhada em solução de Ringer por no mínimo 30 minutos. A seguir, a preparação era transferida para solução de Ringer $0\text{Na}^+ 0\text{Ca}^{2+}$ e mantida por um tempo suficiente para obter o estado estacionário de força. Este intervalo de tempo normalmente ocorre entre 5 a 10 minutos. Em seguida o músculo papilar foi transferido para a câmara contendo Ringer $0\text{Na}^+ - 0\text{Ca}^{2+}$ acrescida de 30 mM de cafeína. A força de contração induzida por cafeína era então comparada entre os grupos (Figura 10).

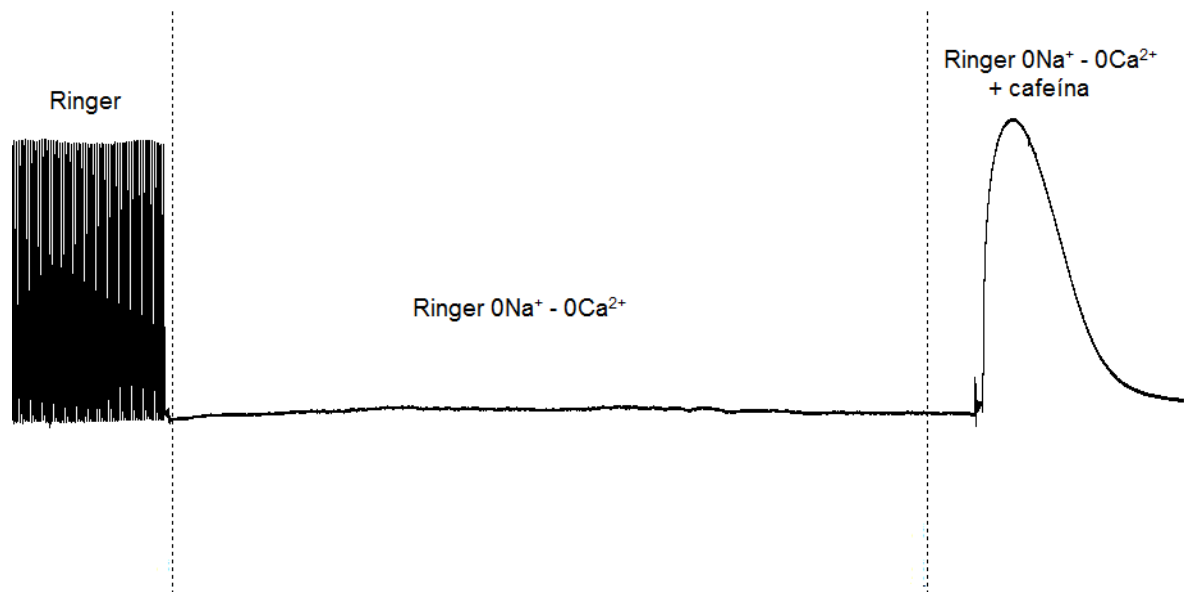


Figura 10 – Representação da contração muscular induzida por cafeína. Nesse experimento a contração foi induzida com cafeína, ao contrário dos experimentos anteriores na qual a contração era induzida por estimulação elétrica. No início dos experimentos o músculo era colocado em solução Ringer e estimulado eletricamente, até se atingir o equilíbrio. Depois o músculo era transferido para outra câmara com solução Ringer com $0\text{Na}^+ - 0\text{Ca}^{2+}$, onde não ocorria a estimulação elétrica e se esperava um período de 5 a 10 minutos. Após esse período o músculo era transferido para outra câmara com solução Ringer com $0\text{Na}^+ - 0\text{Ca}^{2+}$ mais 30mM de cafeína. A cafeína induz a contração muscular e pode ser avaliada a força máxima de contração.

3.4 Análise estatística

Os resultados estão representados pela média \pm erro padrão da média obtido em pelo menos seis observações experimentais. Os dados foram considerados significativos quando a probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade foi menor ou igual a 0,5% ($p \leq 0,05$) pelo uso do teste t de Student. Para análise dos dados foi utilizado o programa SigmaPlot versão 11.0.

4 RESULTADOS

4.1 Peso dos animais

Os valores de peso corporal no primeiro dia e no décimo de tratamento estão expressos na tabela 2. Após dez dias de tratamento com o hormônio da tireóide, os animais do grupo hipertireoideo apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa no peso corporal ($P = 0,034$).

Tabela 2 – Peso dos animais no 1º e 10º dia.

Grupo	Peso dos animais (g) no 1º dia	Peso dos animais (g) 10º dia
Controle	311 ± 10,94	336,2 ± 7,32
Hipertireoideo	310 ± 9,57	309,7 ± 9,51

4.2 Peso dos corações

Após os dez dias de tratamento, o peso dos corações foi avaliado e comparado entre os grupos e estão expressos na tabela 3. Após dez dias de tratamento com o hormônio da tireóide, os animais do grupo hipertireoideo apresentaram um aumento estatisticamente significativo no peso dos corações ($P < 0,001$).

Tabela 3 – Peso dos corações após os 10 dias de tratamento.

Grupo	Peso dos corações (g)
Controle	2,153 ± 0,074
Hipertireoideo	1,528 ± 0,036

4.3 Força máxima de contração

Em relação à força máxima de contração isométrica dos músculos papilares estimulados eletricamente (mN/mm^2), não foram encontradas diferenças

estatisticamente significativas ($P = 0,973$) entre o grupo controle (GC: $4,903 \pm 0,13$) e grupo hipertireoideo (GH: $4,917 \pm 0,35$) (Tabela 4 e Figura 11).

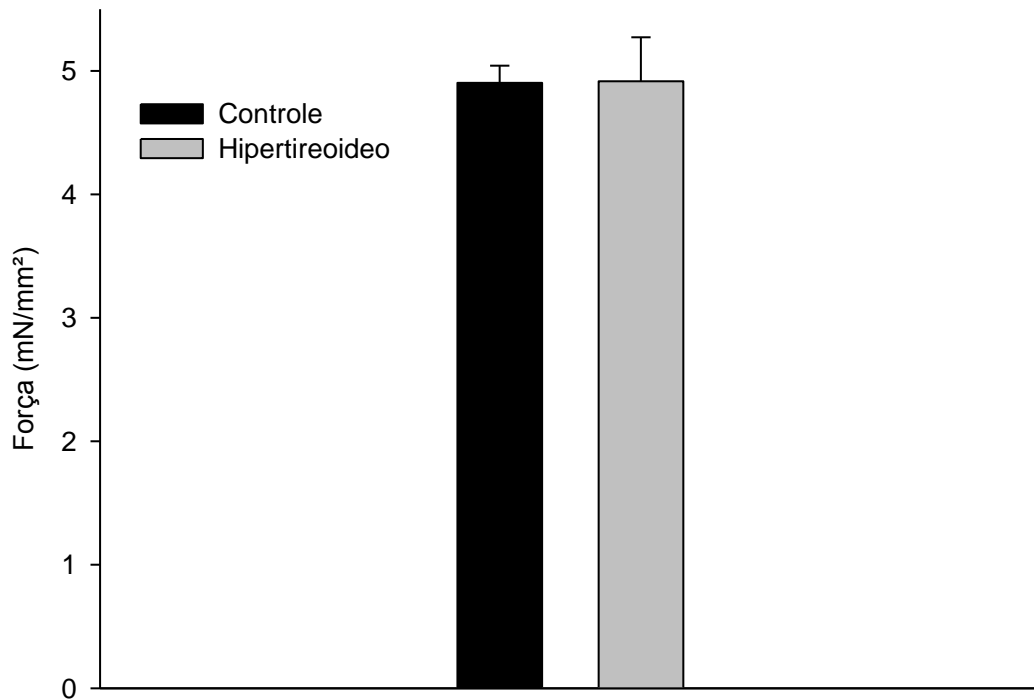


Figura 11 – Força máxima de contração (mN/mm²). Os valores de força máxima não apresentaram diferença significativa entre os grupos ($P = 0,973$).

4.4 Velocidade de máxima de contração (+df/dt) e de relaxamento (-df/dt)

A velocidade máxima de contração, que é representada pela +df/dt, foi estatisticamente ($P < 0,001$) maior no grupo hipertireoideo (GH: $105,90 \pm 7,31$) em comparação ao grupo controle (GC: $69,88 \pm 2,77$) (Tabela 5 e Figura 12).

A velocidade máxima de relaxamento, que é representada pela -df/dt, foi estatisticamente ($P < 0,001$) maior no grupo hipertireoideo (GH: $67,32 \pm 3,59$) em comparação ao grupo controle (GC: $51,92 \pm 2,04$) (Tabela 5 e Figura 13)

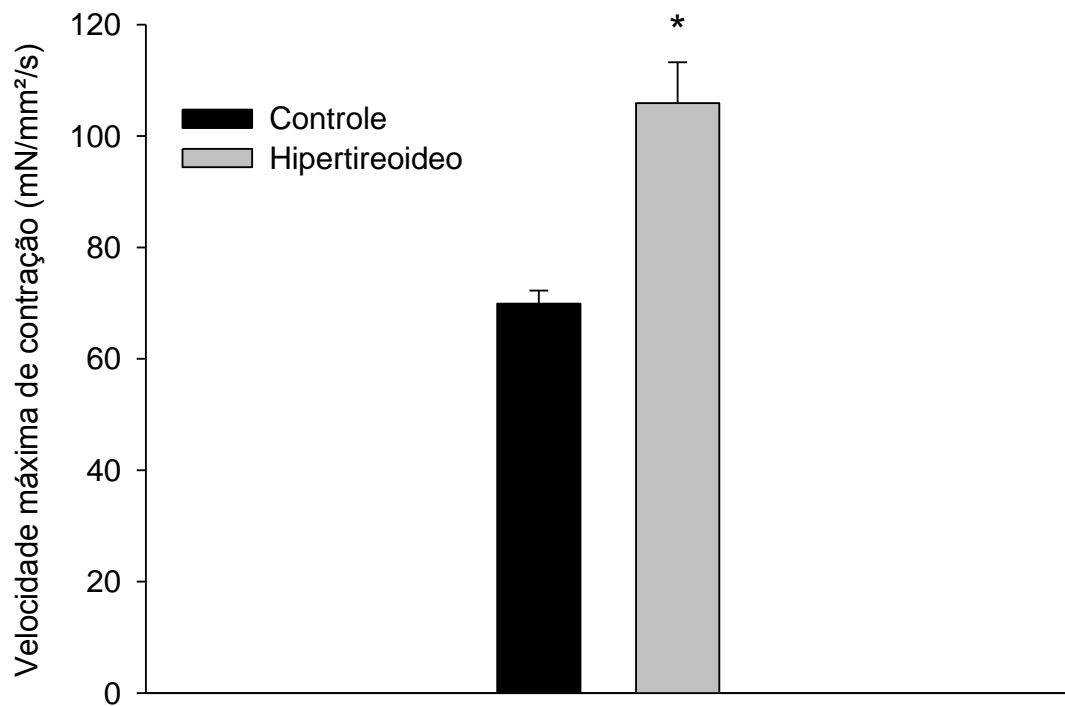


Figura 12 – Velocidade máxima de contração. A derivada da força no tempo que informa o valor máximo de velocidade durante a contração representa a $+df/dt$. Os valores de $+df/dt$ se encontram significativamente maiores no grupo hipertireoideo, comparado com o grupo controle, indicando que a velocidade de contração no grupo hipertireoideo é maior que no grupo controle (* $P < 0,001$).

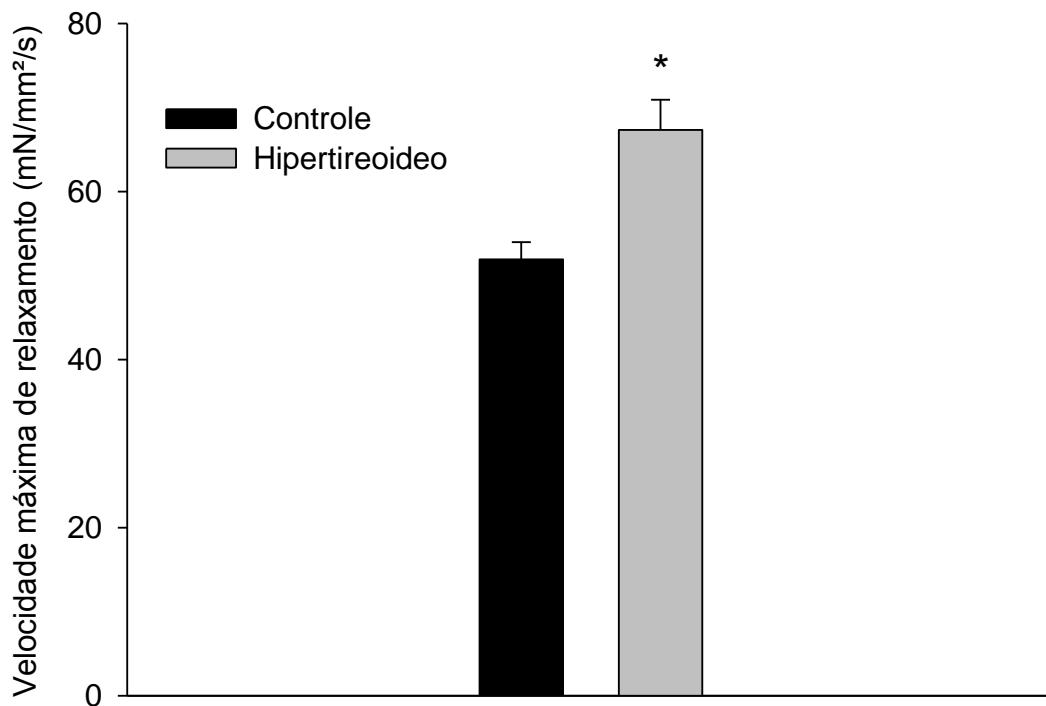


Figura 13 – Velocidade máxima de relaxamento. A derivada da força no tempo que informa o valor máximo de velocidade durante o relaxamento representa a $-df/dt$. Os valores de $-df/dt$ se encontram significativamente maiores no grupo hipertireoideo, comparado com o grupo controle, indicando que a velocidade de relaxamento no grupo hipertireoideo é maior que no grupo controle (* $P < 0,001$).

4.5 Tempo para contração máxima

O intervalo de tempo do início da contração até se atingir o pico máximo de contração apresenta uma diferença estatisticamente significativa ($P < 0,001$) entre os grupos. Sendo o tempo menor no grupo hipertireoideo (GH: $0,108 \pm 0,00$) comparado ao grupo controle (GC: $0,138 \pm 0,00$) (Tabela 6 e Figura 14).

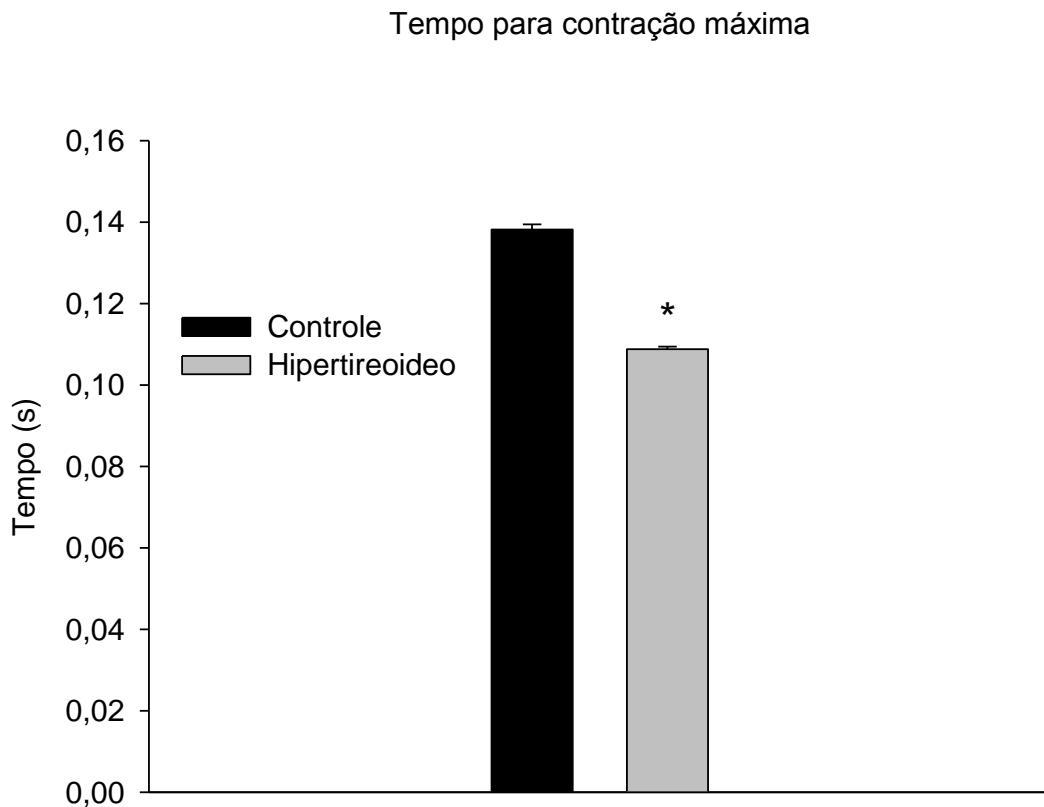


Figura 14 – Tempo para se atingir a contração máxima. O intervalo de tempo do início da contração até se atingir o valor máximo de contração foi avaliado. O tempo para se atingir a contração máxima foi menor no grupo hipertireoideo comparado ao grupo controle (* $P < 0,001$).

4.6 Tempo para relaxamento máximo

O intervalo de tempo do pico de contração até se atingir o relaxamento máximo apresenta uma diferença estatisticamente significativa ($P < 0,001$) entre os grupos. Sendo o tempo menor no grupo hipertireoideo (GH: $0,241 \pm 0,00$) comparado ao grupo controle (GC: $0,303 \pm 0,00$) (Tabela 7 e Figura 15).

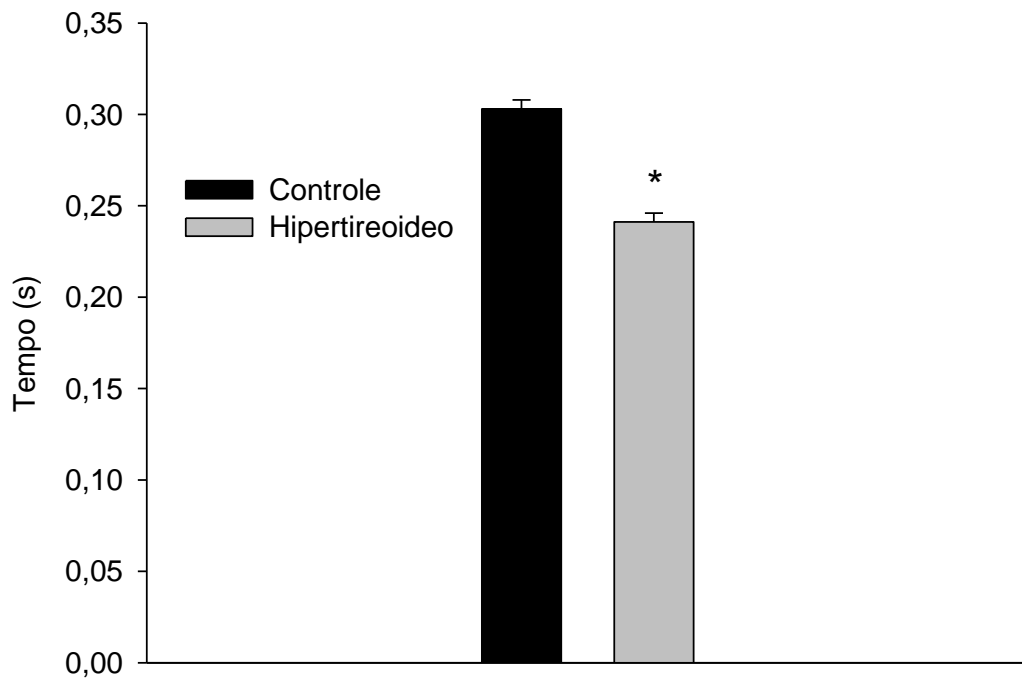


Figura 15 – Tempo para se atingir o relaxamento máximo. O intervalo de tempo da contração máxima até se atingir o relaxamento máximo foi avaliado. O tempo para se chegar ao relaxamento máximo foi menor no grupo hipertireoideo comparado ao grupo controle (* $P < 0,001$).

4.7 Tempo Total de Contração

O tempo total de contração apresenta uma diferença estatisticamente significativa ($P < 0,001$) entre os grupos. Sendo o tempo menor no grupo hipertireoideo (GH: $0,350 \pm 0,00$) comparado ao grupo controle (GC: $0,441 \pm 0,00$) (Tabela 8 e Figura 16).

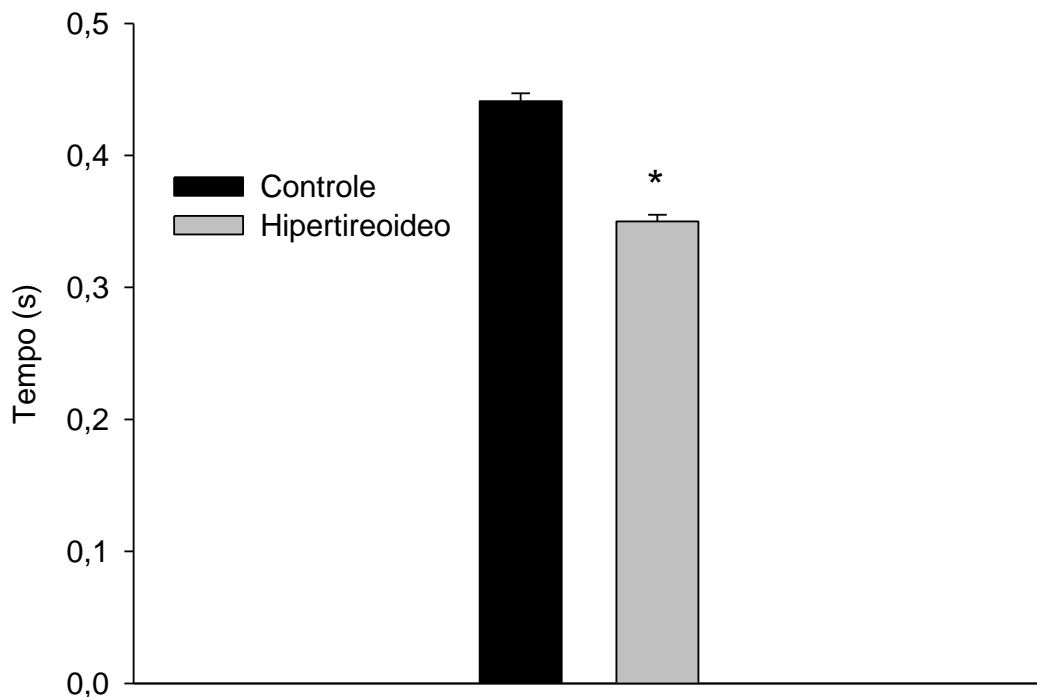


Figura 16 – Tempo total de contração. O intervalo de tempo do início da contração até o valor máximo de relaxamento foi avaliado. O tempo total de contração foi menor no grupo hipertireoideo comparado ao grupo controle (* $P < 0,001$).

4.8 Potenciação Pós-Pausa (PPP)

No músculo cardíaco de ratos é observado que após uma pausa na estimulação elétrica, há um aumento na força da primeira contração, comparada com a última contração antes da pausa, fenômeno esse denominado de potenciação pós-pausa (PPP) (Bassani & Bers, 1994).

A diferença na PPP foi estatisticamente significativa para todos os tempos de pausa (1s: $P = 0,004$, 3s: $P = 0,001$, 5s: $P = 0,004$, 10s: $P = 0,016$, 20s: $P = 0,022$) entre os dois grupos (Tabela 3). Sendo que a PPP teve uma redução no percentual de ganho força em todos os tempos de pausa no grupo hipertireoideo em relação ao grupo controle (Tabela 9 e Figura 17).

Tabela 9 – Percentual de força após a pausa.

Grupo	1s	3s	5s	10s	20s
Controle	43,41 ±	66,36 ±	74,70 ±	97,83 ±	116,05 ±
	6,83	9,26	11,77	21,01	24,58
Hipertireoideo	15,36 ±	23,23 ±	27,96 ±	36,06 ±	43,54 ±
	4,15	4,64	6,51	9,01	14,06

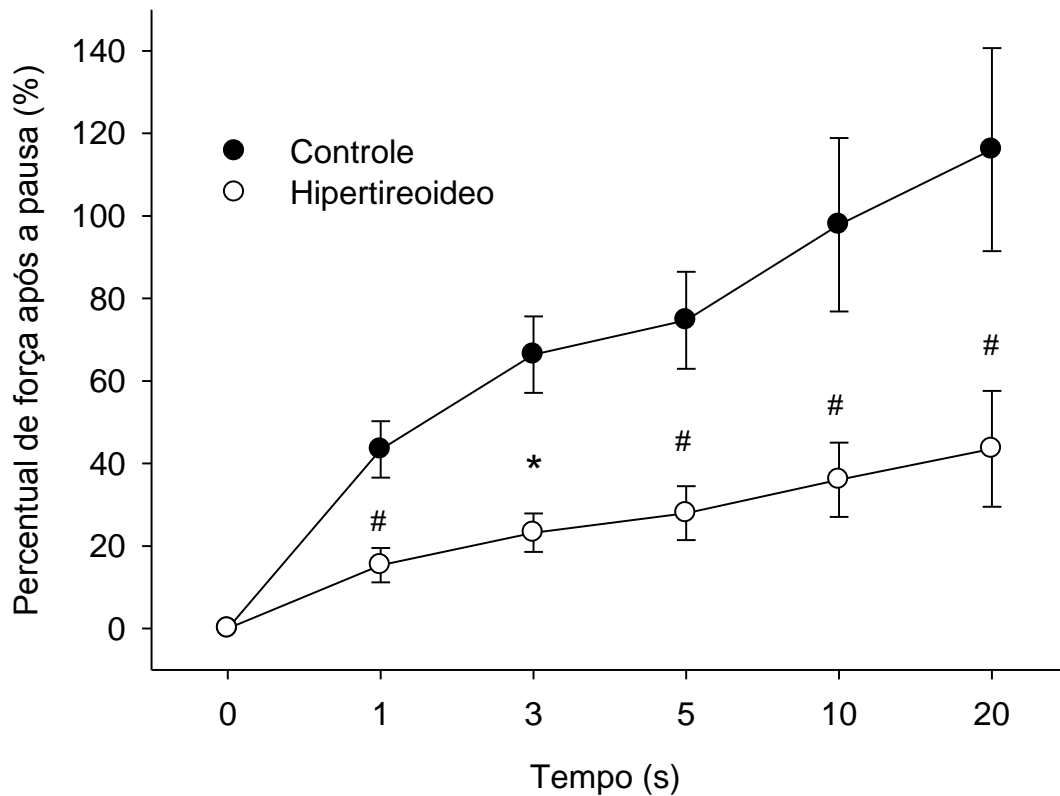


Figura 17 – Percentual de força após a pausa. Nessa figura demonstramos a PPP em valores percentuais, tomando como valor de base a última contração antes da pausa. Observa-se que o ganho de força, em todos os tempos de pausa, foi significativamente menor no grupo hipertireoideo comparado ao grupo controle (1s: $P = 0,004$, 3s: $P = 0,001$, 5s: $P = 0,004$, 10s: $P = 0,016$, 20s: $P = 0,022$) (* $P < 0,001$; # $P < 0,05$).

4.9 +df/dt da primeira contração após a pausa

A velocidade máxima de contração, representada pela +df/dt, na primeira contração após a pausa não foi estatisticamente significativa entre os grupos (1s: $P = 0,613$, 3s: $P = 0,991$, 5s: $P = 0,902$, 10s: $P = 0,603$, 20s: $P = 0,499$) em todos os tempos de pausa (Figura 18). Porém quando avaliamos o percentual de aumento na +df/dt da primeira contração após a pausa, comparado com a +df/dt da última contração após a pausa, observamos que os animais hipertireoideos tem um percentual de aumento significativamente menor que os animais controle em todos os tempos de pausa (20s: $P = 0,043$; 10s: $P = 0,002$; 5s: $P = 0,005$; 3s: $P = 0,006$; 1s: $P = 0,002$) (Figura 19).

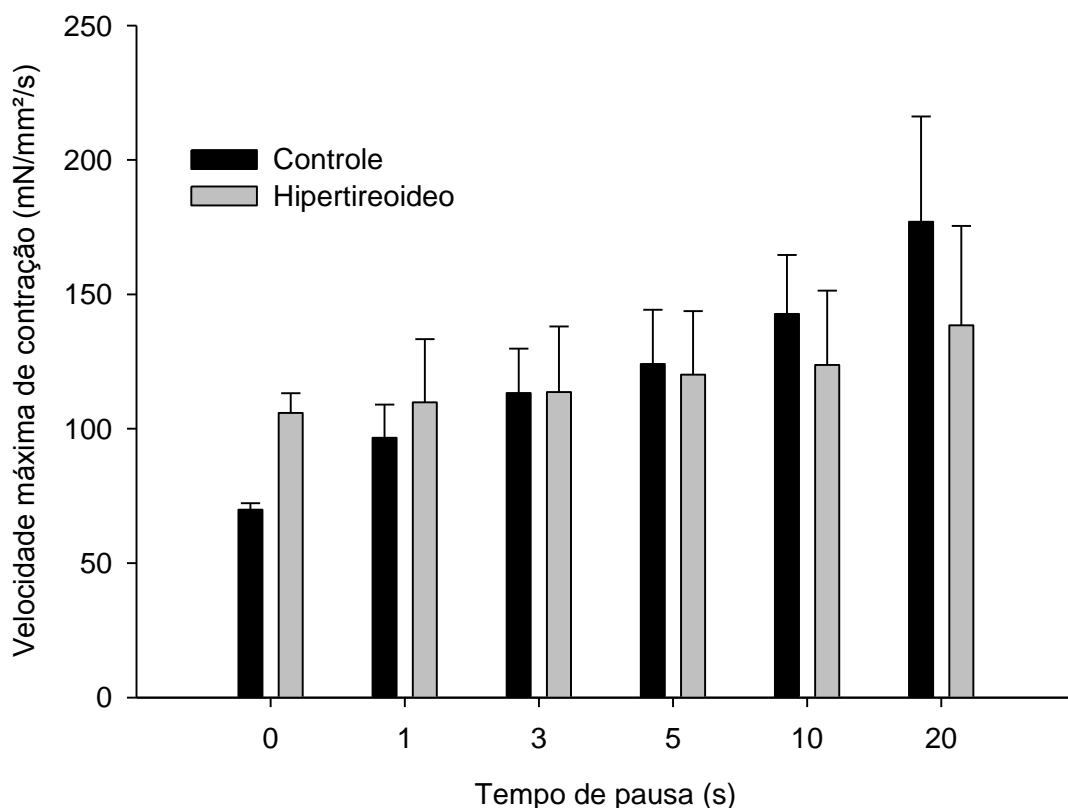


Figura 18 – Velocidade máxima de contração (+df/dt) na primeira contração após a pausa. Após um período de pausa da estimulação elétrica, foi avaliada a velocidade máxima de contração, representada pela +df/dt, da primeira contração muscular quando se reinicia a estimulação elétrica. Para todos os valores de pausa a +df/dt não apresentou diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$).

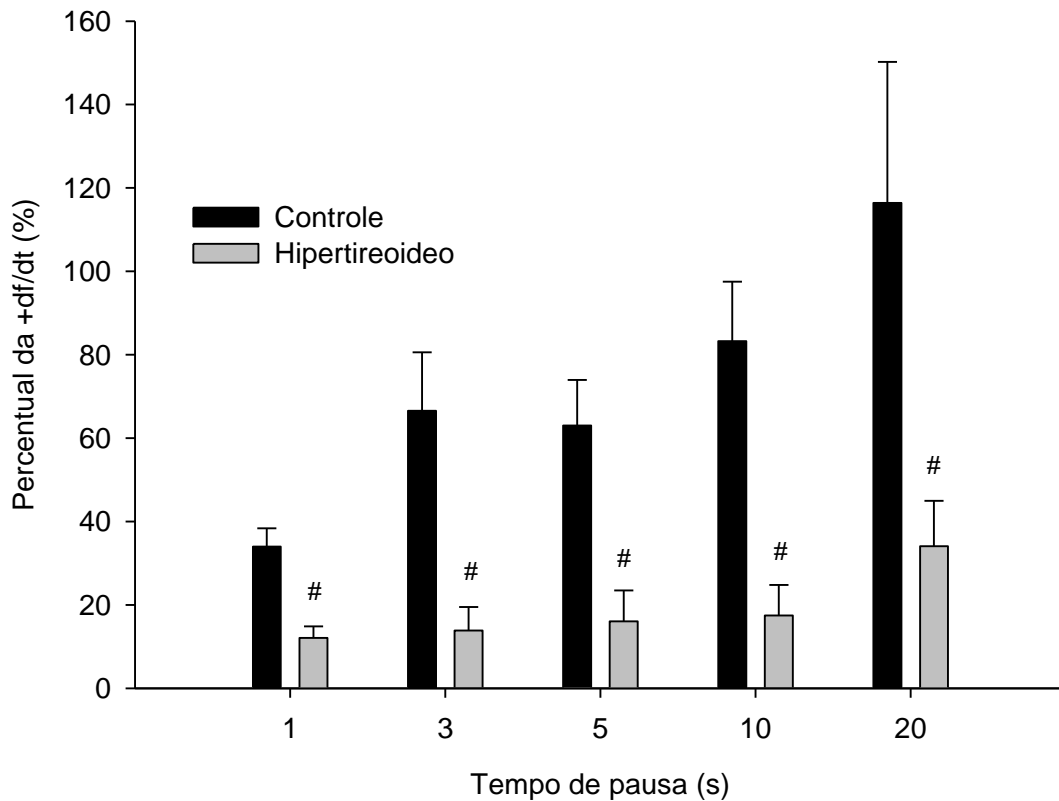


Figura 19 – Percentual de aumento na +df/dt da primeira contração após a pausa. A partir dos dados de PPP, analisamos a +df/dt da primeira contração após a pausa e a comparamos com a +df/dt da última contração antes da pausa. Essa comparação foi feita em valores percentuais. Os dados dessa figura nada mais representa que o aumento na +df/dt da primeira contração após a pausa, comparada com a +df/dt da última contração antes da pausa, representado em valores percentuais. Pode ser observado que para todos os valores de pausa o aumento na +df/dt foi menor nos animais do grupo hipertireoideo (20s: $P = 0,043$; 10s: $P = 0,002$; 5s: $P = 0,005$; 3s: $P = 0,006$; 1s: $P = 0,002$) ($\#P < 0,05$).

4.10 -df/dt da primeira contração após a pausa

A velocidade máxima de relaxamento, representada pela -df/dt, na primeira contração após a pausa não foi estatisticamente significativa (1s: $P = 0,858$, 3s: $P = 0,613$, 5s: $P = 0,384$, 10s: $P = 0,232$, 20s: $P = 0,201$) entre os grupos em todos os tempos de pausa (Figura 20). Porém quando avaliamos o percentual de aumento na -df/dt da primeira contração após a pausa, comparado com a -df/dt da última contração após a pausa, observamos que os animais hipertireoideos tem um percentual de aumento significativamente menor que os animais controle em todos

os tempos de pausa (20s: $P = 0,012$; 10s: $P = 0,020$; 5s: $P < 0,001$; 3s: $P = 0,021$; 1s: $P = 0,033$) (Figura 21).

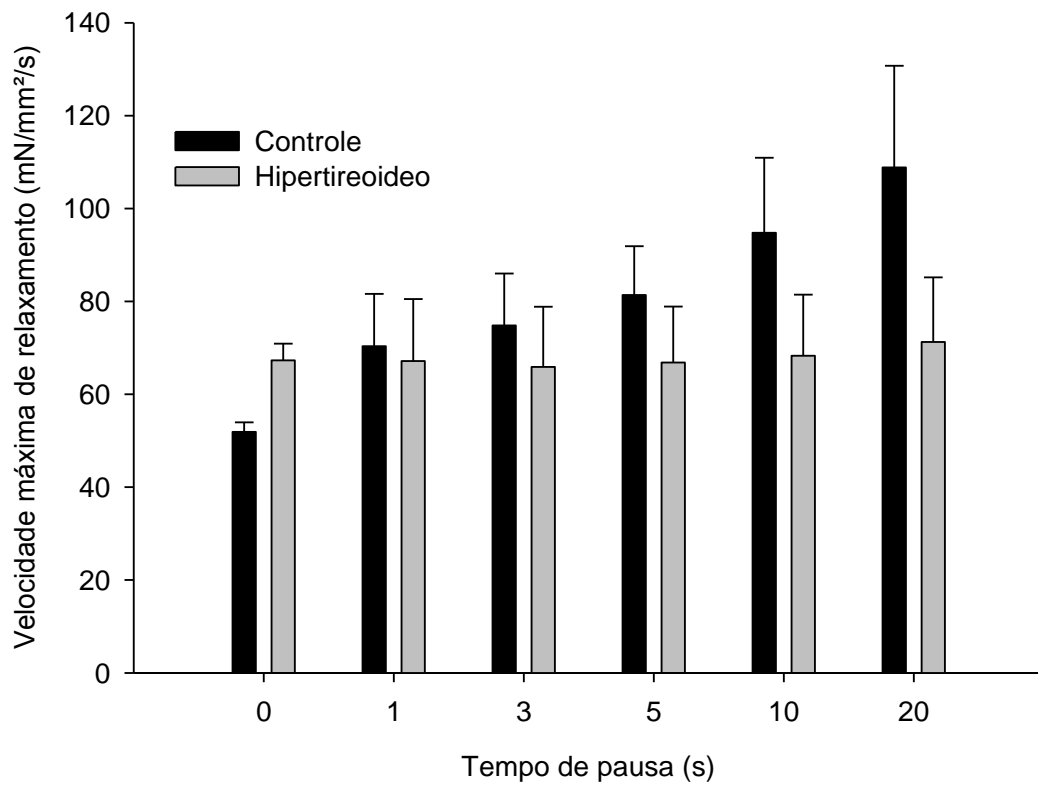


Figura 20 – Velocidade máxima de relaxamento (-df/dt) na primeira contração após a pausa. Após um período de pausa da estimulação elétrica, foi avaliada a velocidade máxima de relaxamento, representada pela -df/dt, da primeira contração muscular quando se reinicia a estimulação elétrica. Para todos os valores de pausa a +df/dt não apresentou diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$).

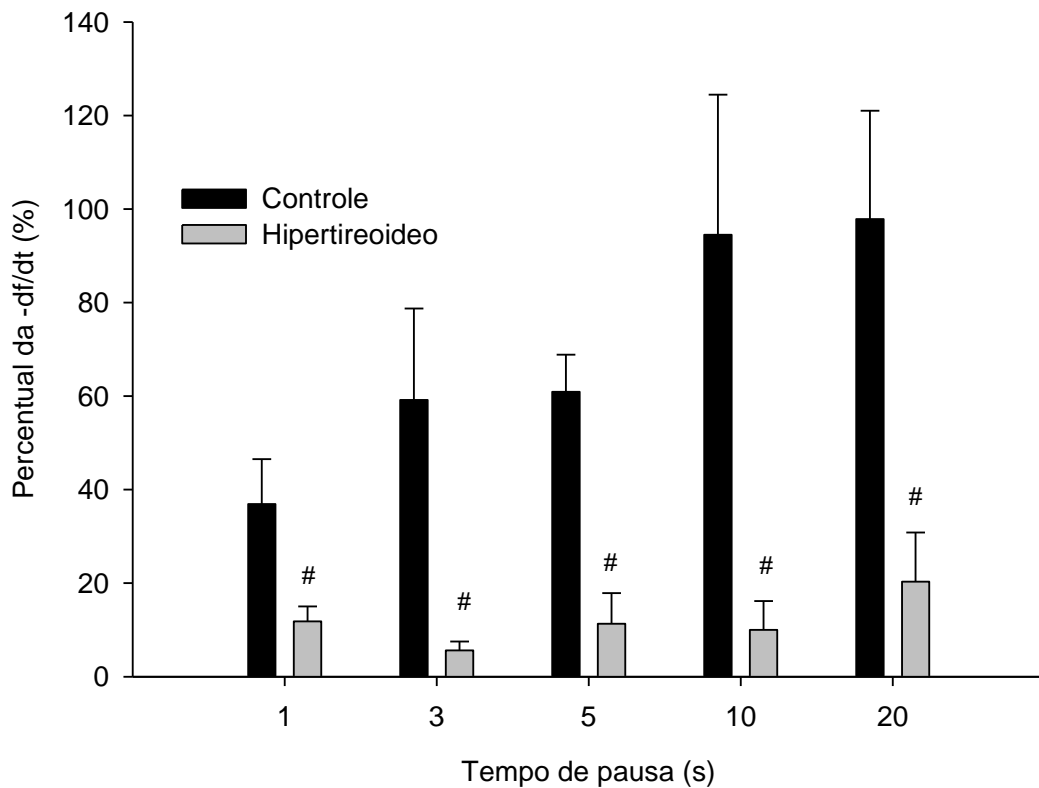


Figura 21 – Percentual de aumento na $-df/dt$ da primeira contração após a pausa. A partir dos dados de PPP, analisamos a $-df/dt$ da primeira contração após a pausa e a comparamos com a $-df/dt$ da última contração antes da pausa. Essa comparação foi feita em valores percentuais. Os dados dessa figura nada mais representa que o aumento na $-df/dt$ da primeira contração após a pausa, comparada com a $-df/dt$ da última contração antes da pausa, representado em valores percentuais. Pode ser observado que para todos os valores de pausa o aumento na $-df/dt$ foi menor nos animais do grupo hipertireoideo (20s: $P = 0,012$; 10s: $P = 0,020$; 5s: $P < 0,001$; 3s: $P = 0,021$; 1s: $P = 0,033$) (# $P < 0,05$).

4.11 Produção de força em diferentes concentrações de sódio extracelular

Uma resposta normal do músculo cardíaco é o aumento da força de contração com a redução da concentração extracelular de sódio. Isto se deve a diminuição do gradiente eletroquímico do sódio, que interfere diminuindo, ou até invertendo, o funcionamento do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Assim a função da bomba, que é promover a extrusão de cálcio para o meio extracelular, é afetada. Isso eleva a concentração intracelular de cálcio, aumentando a força de contração (Diedrichs *et al.*, 2007).

As mudanças na produção de força são expressas em porcentagem tomando como referência a força produzida em solução com 110 mM de sódio extracelular. Comparando a força produzida em diferentes concentrações de sódio extracelular, se observa uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos somente a partir de 70 mM de sódio extracelular ($P < 0,001$) e 50 mM de sódio extracelular ($P < 0,001$). Nos valores de 70 e 50 mM de sódio extracelular, se observa que o percentual de ganho força do grupo hipertireoideo é menor que do grupo controle (Tabela 10 e Figura 22).

Tabela 10 – Percentual de força em diferentes concentrações de sódio extracelular.

Grupo	90mM	70mM	50mM
Controle	27,52 ± 1,33	52,92 ± 2,58	81,95 ± 5,45
Hipertireoideo	23,59 ± 1,89	37,41 ± 1,42	44,50 ± 3,47

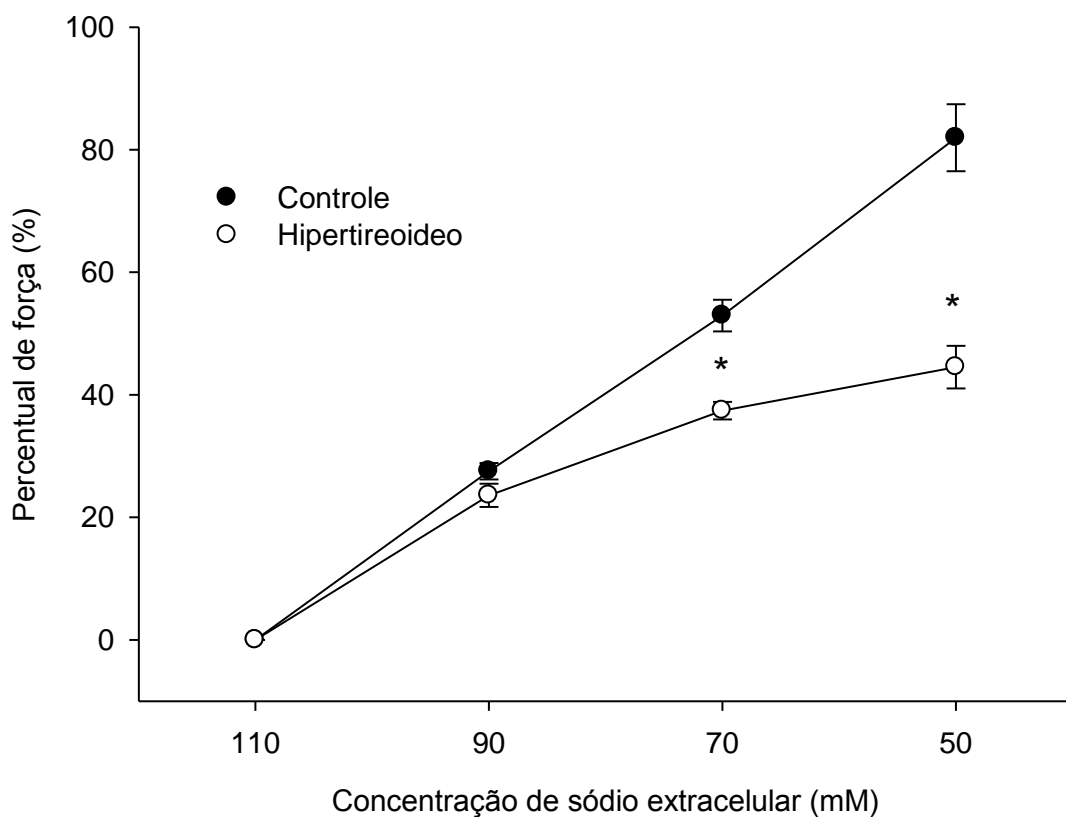


Figura 22 – Percentual de força em diferentes concentrações de sódio extracelular. Tomando como referência o valor de força produzida em solução com 110mM de sódio extracelular, observa-se no gráfico que ao percentual de força aumenta, com a diminuição da concentração de sódio extracelular. Nossos resultados demonstraram que o ganho de força em diferentes concentrações de

sódio extracelular foi significativamente menor no grupo hipertireoideo, comparado ao grupo controle, somente nos valores de 70 e 90 mM de sódio extracelular (*P < 0,001).

4.12 Avaliação da contração induzida por cafeína em músculos papilares quiescentes

Em relação à força máxima de contração (mN/mm^2) induzida por cafeína em papilares quiescentes, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,001$). Nesses experimentos a força de contração do grupo hipertireoideo foi menor (GH: $3,26 \pm 0,88$) que no grupo controle (GC: $8,13 \pm 1,07$) (Tabela 11 e Figura 23).

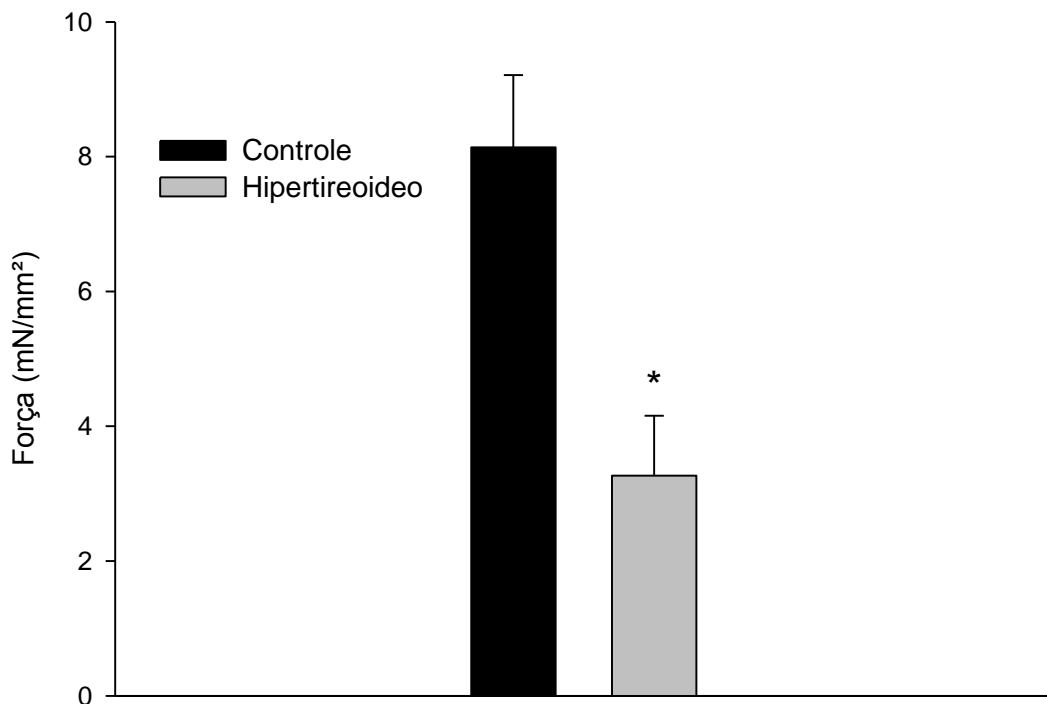


Figura 23 – Força máxima de contração induzida por cafeína. A força máxima de contração induzida por cafeína dos músculos papilares quiescentes foi significativamente maior no grupo hipertireoideo (*P < 0,001).

5 DISCUSSÃO

O termo acoplamento excitação-contração se refere aos processos entre a despolarização da membrana celular (sarcolema) e túbulo-T e a liberação de cálcio para o citosol a partir dos estoques intracelular de cálcio, o retículo sarcoplasmático (RS), que leva a contração do miócito cardíaco (Dulhunty, 2006; Bers, 2002).

No coração, o potencial de ação é iniciado nas células marcapasso, que possuem uma capacidade intrínseca para gerar uma despolarização até o limiar de ativação, levando a geração de um novo potencial de ação. A partir daí o potencial de ação segue pelas vias de condução que irá se propagar por todo o miocárdio pela transmissão de energia elétrica através de junções comunicantes (tipo *gap*) (Dulhunty, 2006).

O Ca^{2+} é essencial para a atividade elétrica cardíaca e é o ativador direto dos miofilamentos, que provocam a contração. Durante a despolarização do miócito cardíaco, ocorre o influxo de Ca^{2+} na célula através de canais de Ca^{2+} do tipo-L, que são dependentes de voltagem, gerando uma corrente de entrada de Ca^{2+} (I_{Ca}), o que contribui para o platô do potencial de ação. O influxo de Ca^{2+} desencadeia liberação de Ca^{2+} a partir do retículo sarcoplasmático (RS). A combinação do influxo de Ca^{2+} e sua liberação pelo RS aumenta a concentração intracelular de Ca^{2+} livre (Ca^{2+}_i), permitindo o Ca^{2+} se ligar a troponina C, que em seguida leva a ativação da maquinaria contrátil (Bers, 2002; Reed *et al.*, 2000; Shenoy *et al.*, 2001).

Um aspecto central do acoplamento excitação-contração é a propagação dos receptores de rianodina, onde propagação se refere à abertura (ou ativação) desses receptores localizados nas cisternas terminais do RS. A propagação dos receptores de rianodina é controlada principalmente pela elevação da concentração de Ca^{2+} no espaço subsarcolemal entre a membrana do túbulo-T do sarcolema e as cisternas terminais do RS, que ocorre após a abertura dos canais de Ca^{2+} do tipo-L do sarcolema em resposta a despolarização da membrana (Lopezlopez *et al.*, 1994; Lopezlopez *et al.*, 1995). Esse processo de amplificação, no qual a elevação de Ca^{2+} subsarcolemal, advinda dos canais de Ca^{2+} de tipo-L, dispara a liberação de mais Ca^{2+} do RS, pelos canais de rianodina, é chamado de liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (Fabiato, 1983).

O relaxamento da contração do miócito cardíaco ocorre como consequência da diminuição da concentração de Ca^{2+} citosólico. A maior contribuição para diminuição da concentração de Ca^{2+} citosólico decorre da recaptação de Ca^{2+} para o interior do RS pela SERCA2. Menor contribuição é dada pela a extrusão de Ca^{2+} para o meio extracelular pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) e uma quantidade menor ainda é realizada pela Ca^{2+} -ATPase sarcolemal e uniporte de Ca^{2+} mitocondrial (Bers, 2002; Reed *et al.*, 2000). A importância quantitativa de cada uma dessas vias varia entre as espécies. Em miócitos ventriculares de coelhos, a SERCA2 contribui com cerca de 70% da remoção total de Ca^{2+} citosólico, enquanto que e o NCX contribui com 28%. Os 2% restantes são removidos pelo Ca^{2+} -ATPase sarcolemal e uniporte de Ca^{2+} mitocondrial. Em miócitos ventriculares de ratos, a SERCA2 e o NCX contribuem, respectivamente com 92% e 7% da remoção do Ca^{2+} citosólico. E as outras duas vias contribuem com aproximadamente 1% da remoção de Ca^{2+} (Bers, 2002; Bassani & Bers, 1994).

No músculo cardíaco a SERCA2 é regulada por uma fosfoproteína de pequeno peso molecular denominada fosfolambano (PLB). No estado não fosforilado o PLB é um inibidor da SERCA2, impedindo a recaptação do Ca^{2+} pela SERCA2. A fosforilação do PLB por proteínas quinases diminui sua inibição, aumentando a afinidade da SERCA2 pelo Ca^{2+} , levando ao aumento na recaptação de Ca^{2+} pelo RS (Reed *et al.*, 2000; Shenoy *et al.*, 2001).

Devido a grande importância do Ca^{2+} com uma via de sinalização para a geração da despolarização, indução da liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático e na ativação da maquinaria contrátil, condições fisiopatológicas que alterem o controle de Ca^{2+} pelos miócitos é uma das causas centrais de disfunções contráteis e arritmias no músculo cardíaco (Bers, 2002).

O aumento nos níveis de hormônio tireoideano aumenta a contratilidade do miocárdio, a velocidade de contração sistólica e do relaxamento diastólico, o débito cardíaco e a frequência cardíaca. Diminuição nesses parâmetros são observados no hipotireoidismo. Os efeitos inotrópicos desse hormônio são mediados, em parte, pela sua capacidade de regular a transcrição de genes que codificam proteínas transportadoras de cálcio do sarcolema e do retículo sarcoplasmático (RS) bem como proteínas miofibrilares específicas (Shenoy *et al.*, 2001; Dillmann, 2010; Ojamaa *et al.*, 2000). Além das propriedades dos miofilamentos contráteis e a taxa de recaptação do Ca^{2+} pelo RS, a velocidade e a quantidade de Ca^{2+} liberados aos

miofilamentos são determinantes importantes na força e na duração da contração cardíaca (Jiang *et al.*, 2000).

O hormônio da tireóide provoca hipertrofia cardíaca e tem sido demonstrado que uma variedade de proteínas nos miócitos cardíacos, incluindo as cadeias pesadas da miosina α e β , receptores β -adrenérgicos, SERCA2 e fosfolambano são regulados pelo hormônio tireoideano (Dillmann, 2010; Ojamaa *et al.*, 2000; Reed *et al.*, 2000).

O número de pontes cruzadas formada entre a cabeça globular da miosina e as moléculas de actina determina em grande parte a velocidade e a força de contração cardíaca. A interação entre o cabeça globular da miosina e o filamento de actina só pode ocorrer se a proteína inibidora troponina I (TnI) se mover para fora do canal, permitindo a interação entre miosina e actina quando o cálcio se liga à troponina C. Além disso, a atividade da miosina ATPase determina a velocidade com que ocorre esse processo de pontes cruzadas. Portanto, os contribuintes cruciais para a força sistólica e geração de velocidade são, os níveis de cálcio citosólico e a atividade da miosina ATPase. Alterações nos níveis de T3 influenciam esses dois componentes cruciais (Dillmann, 2002).

No coração de roedores, a cadeia pesada de miosina (MHC) V1, também denominada de α -MHC, compõe mais de 70% de miosina total do coração do rato adulto eutireóide. A miosina V1 tem uma maior atividade ATPásica que a cadeia pesada de miosina V3, denominada β -MHC. O hormônio da tireóide aumenta acentuadamente a transcrição do gene que codifica a cadeia pesada de miosina- α e regula negativamente o gene para cadeia pesada de miosina- β . Isoformas da miosina, tais como miosina V1 com uma maior atividade ATPásica contribui para aumentar a velocidade de contração cardíaca (Dillmann, 2002; Korecky *et al.*, 1987; Jiang *et al.*, 2000).

Vários trabalhos têm demonstrado que o hipertireoidismo regula negativamente a transcrição da β -MHC e positivamente da α -MHC. A α -MHC tem alta atividade ATPásica e aumenta a velocidade de contração; a β -MHC por sua vez tem baixa atividade ATPásica diminuindo velocidade de contração. Os autores concluíram que a transcrição aumentada da α -MHC pode explicar as alterações na velocidade máxima de contração (+df/dt) encontradas em seus trabalhos (Machackova *et al.*, 2005; Khoury *et al.*, 1996; Korecky *et al.*, 1987).

Além das propriedades dos miofilamentos, a taxa de recaptação de Ca^{2+} pelo RS, a velocidade e intensidade de liberação de Ca^{2+} aos miofilamentos são determinantes importantes da função sistólica cardíaca, força de contração e a duração contração (Jiang *et al.*, 2000). Então, alterações funcionais nos receptores de rianodina, na SERCA2 e nos canais de Ca^{2+} do tipo-L, podem provocar mudanças na $+\text{df}/\text{dt}$. No trabalho de Jiang *et al.* (2000) foi demonstrado que a indução de hipertireoidismo é acompanhada do aumento na expressão (maior que 50%) e na taxa de liberação de cálcio pelos receptores de rianodina, podendo ser responsável, em parte, pelas alterações na liberação de Ca^{2+} pelo RS e na função sistólica cardíaca associado ao hipertireoidismo. Em um outro trabalho, foi observado que a inibição da SERCA2, por tapsigargina, leva a uma diminuição da velocidade de contração do miocárdio em animais com e sem hipertireoidismo. Porém, nos animais com hipertireoidismo, a inibição da SERCA2 leva a uma diminuição ainda maior na velocidade máxima de contração, comparado ao animais controle (Takeuchi *et al.*, 2003). No trabalho de Watanabe *et al.* (2005) foi demonstrado que no hipertireoidismo a corrente de influxo de Ca^{2+} pelos canais de Ca^{2+} do tipo-L estavam aumentadas.

As mudanças encontradas em nossos experimentos, no qual foi observado que a velocidade máxima de contração ($+\text{df}/\text{dt}$) é maior no grupo hipertireoideo, possivelmente foi determinada pelo aumento da expressão da α -MHC. Apesar de serem encontradas poucas evidências, o aumento na expressão e função dos receptores de rianodina, da SERCA2 e dos canais de Ca^{2+} de tipo-L, poderiam colaborar, em parte, com o aumento na $+\text{df}/\text{dt}$. Essas mudanças que levam ao aumento no influxo de Ca^{2+} , aumento na taxa de liberação de Ca^{2+} pelos receptores de rianodina, aumento na velocidade de recaptação de Ca^{2+} pela SERCA2 e aumento na atividade ATPásica da α -MHC que geram as pontes cruzadas, poderiam explicar essas mudanças na $+\text{df}/\text{dt}$, levando em última instância a diminuição do tempo para se atingir o pico de contração máxima.

O ciclo cardíaco é dividido em contração sistólica e relaxamento diastólico. O hormônio T3 marcadamente encurta o relaxamento diastólico, ou seja, o coração hipertireoideo relaxa com uma velocidade mais elevada. A velocidade com que a concentração de cálcio livre é reduzido no citosol, tornando menos cálcio disponível para a troponina C do filamento fino das miofibrilas, é um dos eventos cruciais que conduzem ao relaxamento diastólico (Kahaly & Dillmann, 2005).

A diminuição dos níveis de cálcio durante a diástole, que inicia relaxamento, é mediado principalmente pela SERCA2, localizada na membrana do RS. Este bomba é fortemente inibida por uma fosfoproteína, o fosfolambano. Fosforilação do fosfolambano remove seu efeito inibidor sobre a SERCA2. O papel do PLB na regulação da função cardíaca foi demonstrado em modelos animais transgênicos com ausência do gene (*knockout*) para PLB. Esses animais mostram aumento na contratilidade miocárdica e na velocidade máxima de relaxamento, iguais aos efeitos produzidos pelo hipertireoidismo (Kiss *et al.*, 1998). O hormônio T3 aumenta acentuadamente os níveis de RNAm e proteínas SERCA2 e, além disso, reduz os níveis de fosfolambano e altera seu estado de fosforilação. Ambos os processos contribuem para aumentar a velocidade de relaxamento diastólico no hipertireoidismo (Dillmann, 2002).

A razão das concentrações celulares das proteínas SERCA2 e PLB é um importante determinante da cinética de recaptção do Ca^{2+} nos miócitos cardíacos, influenciando tanto a velocidade de relaxamento como a produção de força (Kiss *et al.*, 1994). Animais com hipertireoidismo apresentam um aumento na razão da concentração entre SERCA2/PLB, devido à diminuição na quantidade de PLB e aumento na SERCA2 (Kiss *et al.*, 1994; (Kiss *et al.*, 1998). E também foi observado aumento na quantidade de PLB fosforilado em relação ao PLB não fosforilado (Ojamaa *et al.*, 2000). Essas modificações promovem o aumento na taxa de recaptção de cálcio pelo RS, causando o aumento da velocidade de relaxamento do músculo cardíaco (Kiss *et al.*, 1994).

Outro estudo demonstrou que animais hipotireoideos tratados com hormônio T3 tiveram um aumento na expressão e na atividade da SERCA2 e um declínio no conteúdo de PLB concomitante com o aumento na recaptção de cálcio pelo RS (Ojamaa *et al.*, 2000).

Essas modificações promovidas pelo hormônio da tireóide na expressão da SERCA2, fosfolambano e no conteúdo de fosfolambano fosforilado, pode explicar, em parte, o aumento na velocidade máxima de relaxamento ($-\text{df}/\text{dt}$) e a diminuição no tempo de relaxamento nos animais hipertireoideos.

Após um período de pausa na estimulação elétrica a força da primeira contração, ao ser reestabelecida a estimulação elétrica, é aumentada no miocárdio da maioria dos mamíferos. Sugere-se que isso resulte de um aumento no conteúdo de Ca^{2+} armazenado no retículo sarcoplásmico (RS) durante o período de repouso.

E quando se reestabelece a estimulação elétrica, uma quantidade maior de Ca^{2+} é libertada pelo RS. Portanto, a influência do repouso na força da primeira contração é considerado um índice para a quantidade de Ca^{2+} liberado do RS (Pieske *et al.*, 1996; Bassani & Bers, 1994).

Uma perda de cálcio celular e do RS durante a pausa é bem descrita em ventrículo de coelho, gato e cobaia, situação que leva esses animais a não apresentarem potenciação pós-pausa (PPP), principalmente em longos períodos de pausa. No entanto, em ratos é observada uma potenciação pós-pausa, acompanhado do aumento no conteúdo de Ca^{2+} no RS (Bassani & Bers, 1994).

Nas espécies de animal em que a liberação de Ca^{2+} pelo RS é de menor relevância para contração, como o sapo, a potenciação pós pausa (PPP) está ausente. No entanto, quando a função do RS torna-se mais importante para o processo de acoplamento excitação-contração, a potenciação da primeira contração após um período de pausa se torna mais pronunciada. No miocárdio de ratos, tendo um RS altamente desenvolvido, a potenciação pós-pausa é muito pronunciada, mesmo após longos períodos de repouso (Pieske *et al.*, 1996).

Em nossos experimentos, a diminuição da potenciação pós-pausa (PPP) observada nos animais hipertireoideos, nos dá indícios de uma diminuição no conteúdo de Ca^{2+} do RS. Outros resultados que colaboram com essa afirmação é a força máxima de contração induzida por cafeína. Como já foi visto, a cafeína é um agonista de receptores de rianodina e ao expormos o músculo papilar a uma concentração de 30mM de cafeína, isso levaria a liberação dos estoques de Ca^{2+} do RS, informando sobre seu conteúdo. E como foi visto nos resultados, a força de contração induzida por cafeína foi menor nos músculos papilares de animais com hipertireoidismo. Sendo possivelmente resultado de uma diminuição no conteúdo de cálcio.

Esta diminuição no conteúdo de Ca^{2+} pode ser devido a três fatores principais. O primeiro fator seria um aumento da atividade do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) que, no período de pausa da estimulação, levaria a extrusão de cálcio para fora da célula, diminuindo a quantidade de cálcio disponível para recaptação pelo RS. Outro fator seria a diminuição da função da SERCA2 que levaria a uma diminuição do conteúdo de Ca^{2+} no RS. E um outro fator, que possivelmente estaria causando essa diminuição na PPP, é o aumento do vazamento de cálcio (*leak calcium*) do RS pelos

receptores de rianodina (Ai *et al.*, 2005). Parece que esse último fator seja o que apresenta maior influência sobre a diminuição da PPP.

Nossos resultados de contratilidade, visto anteriormente, e dados da literatura nos levam a pensar na possibilidade da função da SERCA2 estar aumentada e do NCX estar diminuída. E como essas duas alterações não poderiam levar a diminuição na PPP, acreditamos que essa modificação seja decorrente do vazamento de Ca^{2+} do RS pelos receptores de rianodina.

Condições experimentais que induzem hipertrofia ou insuficiência cardíaca aumentam a quantidade de proteína quinase II dependente de Ca^{2+} /Calmodulina (CaMKII) (Bers & Despa, 2006).

No trabalho de Ai *et al.* (2005) foi encontrado níveis mais elevados de CaMKII e aumento na fosforilação dos receptores de rianodina (RyR). A fosforilação dos RyR pela CaMKII pode aumentar sua propabilidade de abertura, o vazamento diastólico de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) e a liberação fracional de cálcio pelo RS no processo de contração. Assim a fosforilação dos receptores de rianodina dependente de CaMKII poderia contribuir para a diminuição do conteúdo de cálcio do RS na hipertrofia e na insuficiência cardíaca.

No trabalho de Song *et al.* (2008) em que eles induziram hipertrofia cardíaca com hormônio tireoidiano, eles observaram uma diminuição no conteúdo de cálcio no RS, devido ao aumento no vazamento de cálcio pelos receptores de rianodina. Em seus experimentos eles observaram, por técnicas de microscopia confocal, que a quantidade de cálcio liberada pelo RS (transiente de cálcio) dos animais com hipertrofia teve uma amplitude menor comparada ao controle, e que no repouso, as liberações espontâneas de cálcio teve uma frequência maior nos animais com hipertrofia induzida por hormônio tireoidiano.

A diminuição do conteúdo de Ca^{2+} no RS em modelos de insuficiência cardíaca é devido ao aumento da expressão do NCX e diminuição na função da SERCA2. Outro fator que contribui para diminuir o conteúdo de Ca^{2+} do RS é o aumento no vazamento diastólico de Ca^{2+} pelo RS. A expressão e atividade da CaMKII e sua associação com os receptores de rianodina (RyR) estão aumentados na hipertrofia e insuficiência cardíaca. E a fosforilação do RyR dependente de CaMKII aumenta a liberação diastólica espontânea de Ca^{2+} do RS, podendo contribuir para diminuição do conteúdo de Ca^{2+} do RS (Bers & Despa, 2006).

Porém nas situações de hipertireoidismo as modificações que ocorrem no trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e na SERCA2 são opostas as modificações que ocorrem na insuficiência cardíaca. Isso aumenta as evidências do possível papel do vazamento de cálcio pelos RyR, decorrente do aumento a expressão da CaMKII, na diminuição do conteúdo de cálcio no RS observado na potenciação pós-pausa e na contração induzida por cafeína.

Quando analisamos o percentual de ganho na $+df/dt$ e $-df/dt$ da primeira contração após a pausa, comparado com a última contração antes da pausa, observamos que os animais hipertireoideos tem um menor aumento na velocidade máxima de contração e relaxamento da primeira contração após a pausa. Também pode ser observado que os valores percentuais de $+df/dt$ e $-df/dt$ nos animais controle tem um aumento progressivo com o aumento do tempo de pausa, situação que não foi observada nos animais hipertireoideos, que apresentam valores estatisticamente iguais em todos os tempos de pausa.

Apesar de não encontrarmos nenhum trabalho relatando esses achados no hipertireoidismo, acreditamos que no hipertireoidismo essas modificações resultem na incapacidade da SERCA2 de aumentar o conteúdo de cálcio no RS e diminuir o Ca^{2+} citosólico com o aumento nos tempos de pausa. Nos animais hipertireoideos possivelmente esse sistema de recaptção de cálcio estaria trabalhando em sua capacidade máxima no repouso, sem uma capacidade extra de reserva, não podendo mais aumentar sua atividade nas situações que requerem um aumento na liberação e recaptção de cálcio, como no caso da PPP. O aumento no vazamento de cálcio do RS, nos animais hipertireoideos, possivelmente também colabora para o menor ganho percentual na $+df/dt$ da primeira contração após a pausa. Essa perda da capacidade extra de reserva do sistema de recaptção de cálcio, poderia explicar, em parte, a intolerância a atividade física e o maior taxa de arritmas nas situações de esforço, em pessoas com hipertireoidismo.

Alterações nos níveis de Ca^{2+} citosólico dão uma contribuição fundamental para o estado contrátil do coração. A atividade contrátil em miócitos cardíacos é desencadeada pela liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (Fabiato, 1983). O influxo de Ca^{2+} através do canal de Ca^{2+} do tipo-L e a saída de Ca^{2+} do RS através do canal de rianodina são ambos aumentados pelo T3 (Watanabe *et al.*, 2005; Kreuzberg *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2000). Tanto o gene para o canal de cálcio do tipo-L (Watanabe *et al.*, 2005; Kreuzberg *et al.*, 2000) e o gene para canal de rianodina (Jiang *et al.*,

2000) são marcadamente responsivos ao T3. O processo cíclico que aumenta e diminui os níveis de cálcio citosólico é o principal determinante da magnitude da contração cardíaca durante a sístole e a taxa de relaxamento durante a diástole (Dillmann, 2002).

Essas modificações nos levaram a pensar que os animais hipertireoideos teriam uma força de contração maior que o grupo controle. No entanto, a força foi estatisticamente igual entre os dois grupos. Apesar do aumento na recaptação de Ca^{2+} para o RS, a maior atividade ATPásica da α -MHC e o aumento na liberação de Ca^{2+} pelo RS, possivelmente o aumento no vazamento de Ca^{2+} pelo RS leva a uma diminuição no seu conteúdo, levando a diminuição da quantidade de Ca^{2+} liberada durante a sístole.

Com a diminuição da concentração extracelular de sódio, ocorre uma diminuição gradual da função do NCX ou até mesmo sua reversão, aumentando a concentração intracelular de cálcio, levando a um inotropismo positivo (Aires, 2008).

O NCX pode operar tanto no modo de efluxo de Ca^{2+} quanto no influxo (modo reverso), dependendo da concentração interna e externa de Na^+ e Ca^{2+} , bem como do potencial de membrana. Em outras palavras, alta concentração intracelular de Ca^{2+} favorece seu efluxo, enquanto o potencial de membrana positivo e alta concentração intracelular de Na^+ favorece o influxo de Ca^{2+} . Em condições fisiológicas o NCX trabalha quase que exclusivamente no modo de extrusão de Ca^{2+} , impulsionado principalmente pelo alto transiente de Ca^{2+} subsarcolemal. No entanto, quando Na^+_i é elevado, a quantidade de influxo de Ca^{2+} através do NCX pode aumentar muito. Isso vai elevar o conteúdo de Ca^{2+} celular e do RS, resultando em maiores transientes de Ca^{2+} e, portanto, um aumento da contratilidade (Philipson & Nicoll, 2000; Bers & Despa, 2006; Diedrichs *et al.*, 2007).

Redução da concentração extracelular de Na^+ tem sido previamente associado ao aumento da força de contração do miocárdio em várias espécies. Este efeito é mediado pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, uma vez que a redução do gradiente de concentração do Na^+ através da membrana plasmática conduz a uma extrusão reduzida de Ca^{2+} e um aumento no influxo de Ca^{2+} mediada pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Diedrichs *et al.*, 2007).

No trabalho de Diedrichs *et al.* (2007) foram realizados experimentos com músculos papilares de ventrículo esquerdo de humanos. Seus resultados mostraram que o músculo cardíaco de pacientes com insuficiência cardíaca é mais sensível à

redução extracelular de Na^+ , que apresentaram um maior aumento na força de contração, comparado aos músculos de pacientes normais. Segundo os autores, isso é devido ao acúmulo de Ca^{2+} intracelular através do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que tem sua expressão e função aumentada na insuficiência cardíaca.

Com relação aos nossos dados, pode ser observado que a força de contração nos animais hipertireoideos tem uma menor amplitude de aumento, comparada aos animais controle. Isso pode ser justificado pela menor capacidade de funcionamento do NCX no hipertireoidismo. É bem descrito na literatura que animais hipertireoideos têm a expressão desse trocador diminuída (Reed *et al.*, 2000; Shenoy *et al.*, 2001).

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados em nosso trabalho, concluímos que os animais expostos a uma situação experimental de hipertireoidismo apresentam uma série de modificações funcionais na contração do músculo cardíaco. As principais alterações encontradas nos animais hipertireoideos, comparado ao animal controle, foi uma diminuição da potenciação pós-pausa (PPP); aumento na velocidade máxima de contração ($+df/dt$) e de relaxamento ($-df/dt$); diminuição no percentual de ganho de força com a diminuição da concentração de sódio extracelular; diminuição da produção de força máxima na contração induzida por cafeína; e diminuição no tempo para se atingir o pico de contração, diminuição no intervalo de tempo do pico de contração até o relaxamento máximo e diminuição no intervalo de tempo entre o início da contração até o relaxamento máximo. O valor de força máxima na contração de músculos papilares estimulados eletricamente não apresentou diferença estatística entre os grupos.

Essas modificações funcionais encontradas em nosso trabalho nos levam a especulações sobre como as estruturas moleculares, responsáveis pelo AEC, e o cálcio celular estão sendo alterados nos animais com hipertireoidismo. Nossa primeira proposta é que o conteúdo de cálcio do RS se encontra diminuída, provavelmente devido um vazamento de Ca^{2+} pelo RS, levando à diminuição na PPP e na força máxima de contração induzida por cafeína. Também especulamos que o NCX apresenta uma expressão diminuída, devido à diminuição no percentual de ganho de força com a diminuição da concentração de sódio extracelular. E com base em trabalhos de outros autores e em nossos resultados, também concluímos que possivelmente a expressão da SERCA2 e α -MHC estão aumentadas e de PLB está diminuída, devido o aumento na velocidade máxima de contração e relaxamento.

Devido o pequeno número de trabalhos sobre das modificações nos parâmetros de contratilidade no hipertireoidismo e associando essas mudanças com as alterações moleculares, estudos mais aprofundados, com técnicas mais sensíveis para cada uma dessas hipóteses precisam ser realizados, para aumentar as evidências dessas possíveis modificações no AEC e no controle de cálcio pelo músculo cardíaco.

7 REFERÊNCIAS

- Ai, X., Curran, J. W., Shannon, T. R., Bers, D. M., & Pogwizd, S. M. (2005). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in heart failure. *Circulation Research* **97**, 1314-1322.
- Aires, M. M. (2008) Fisiologia. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Bassani, R. A. & Bers, D. M. (1994). Na-Ca Exchange Is Required for Rest-Decay But Not for Rest-Potentiation of Twitches in Rabbit and Rat Ventricular Myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **26**, 1335-1347.
- Bers, D. M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* **415**, 198-205.
- Bers, D. M. (2008). Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annual Review of Physiology* **70**, 23-49.
- Bers, D. M. & Despa, S. (2006). Cardiac myocytes Ca²⁺ and Na⁺ regulation in normal and failing hearts. *Journal of Pharmacological Sciences* **100**, 315-322.
- Bhupathy, P., Babu, G. J., & Periasamy, M. (2007). Sarcolipin and phospholamban as regulators of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **42**, 903-911.
- Bluhm, W. F., Meyer, M., Sayen, M. R., Swanson, E. A., & Dillmann, W. H. (1999). Overexpression of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase improves cardiac contractile function in hypothyroid mice. *Cardiovascular Research* **43**, 382-388.
- Boelaert, K. & Franklyn, J. A. (2005). Thyroid hormone in health and disease. *Journal of Endocrinology* **187**, 1-15.

- Brenner, B. & Yu, L. C. (1993). Structural-Changes in the Actomyosin Cross-Bridges Associated with Force Generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 5252-5256.
- Brette, F. & Orchard, C. (2003). T-tubule function in mammalian cardiac myocytes. *Circulation Research* **92**, 1182-1192.
- Brette, F. & Orchard, C. (2007). Resurgence of cardiac T-tubule research. *Physiology* **22**, 167-173.
- Bridge, J. H. B., Smolley, J. R., & Spitzer, K. W. (1990). The Relationship Between Charge Movements Associated with Ica and Ina-Ca in Cardiac Myocytes. *Science* **248**, 376-378.
- Calaghan, S. C., Le Guennec, J. Y., & White, E. (2004). Cytoskeletal modulation of electrical and mechanical activity in cardiac myocytes. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* **84**, 29-59.
- Carr, A. N. & Kranias, E. G. (2002). Thyroid hormone regulation of calcium cycling proteins. *Thyroid* **12**, 453-457.
- Danzi, S. & Klein, I. (2002). Thyroid hormone-regulated cardiac gene expression and cardiovascular disease. *Thyroid* **12**, 467-472.
- Danzi, S. & Klein, I. (2012). Thyroid Hormone and the Cardiovascular System. *Medical Clinics of North America* **96**, 257-+.
- Davis, P. J. & Davis, F. B. (2002). Nongenomic actions of thyroid hormone on the heart. *Thyroid* **12**, 459-466.
- Diedrichs, H., Frank, K., Schneider, C. A., Burst, V., Hagemeister, J., Zobel, C., & Muller-Ehmsen, J. (2007). Increased functional importance of the Na,Ca-exchanger in contracting failing human myocardium but unchanged activity in isolated vesicles. *International Heart Journal* **48**, 755-766.

Dillmann, W. (2010). Cardiac hypertrophy and thyroid hormone signaling. *Heart Failure Reviews* **15**, 125-132.

Dillmann, W. H. (2002). Cellular action of thyroid hormone on the heart. *Thyroid* **12**, 447-452.

Dulhunty, A. F. (2006). Excitation-contraction coupling from the 1950s into the new millennium. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **33**, 763-772.

Fabiato, A. (1983). Calcium-Induced Release of Calcium from the Cardiac Sarcoplasmic-Reticulum. *American Journal of Physiology* **245**, C1-C14.

Franklyn, J. A., Daykin, J., Drolc, Z., Farmer, M., & Sheppard, M. C. (1991). Long-term follow-up of treatment of thyrotoxicosis by three different methods. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* **34**, 71-76.

Franzini-Armstrong, C. (1999). The sarcoplasmic reticulum and the control of muscle contraction. *FASEB J* **13 Suppl 2**, S266-S270.

Franzini-Armstrong, C. & Protasi, F. (1997). Ryanodine receptors of striated muscles: A complex channel capable of multiple interactions. *Physiological Reviews* **77**, 699-729.

Gordon, A. M., Homsher, E., & Regnier, M. (2000). Regulation of contraction in striated muscle. *Physiological Reviews* **80**, 853-924.

Harvey, C. B. & Williams, G. R. (2002). Mechanism of thyroid hormone action. *Thyroid* **12**, 441-446.

Incerpi, S. (2005). Thyroid hormones: Rapid reply by surface delivery only. *Endocrinology* **146**, 2861-2863.

Jiang, M., Xu, A., Tokmakejian, S., & Narayanan, N. (2000). Thyroid hormone-induced overexpression of functional ryanodine receptors in the rabbit heart. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **278**, H1429-H1438.

Kahaly, G. J. & Dillmann, W. H. (2005). Thyroid hormone action in the heart. *Endocrine Reviews* **26**, 704-728.

Khoury, S. F., Hoit, B. D., Dave, V., Pawloski-Dahm, C. M., Shao, Y., Gabel, M., Periasamy, M., & Walsh, R. A. (1996). Effects of thyroid hormone on left ventricular performance and regulation of contractile and Ca²⁺-cycling proteins in the baboon. Implications for the force-frequency and relaxation-frequency relationships. *Circulation Research* **79**, 727-735.

Kiriazis, H. & Kranias, E. G. (2000). Genetically engineered models with alterations in cardiac membrane calcium-handling proteins. *Annual Review of Physiology* **62**, 321-351.

Kiss, E., Brittsan, A. G., Edes, I., Grupp, I. L., Grupp, G., & Kranias, E. G. (1998). Thyroid hormone-induced alterations in phospholamban-deficient mouse hearts. *Circulation Research* **83**, 608-613.

Kiss, E., Jakab, G., Kranias, E. G., & Edes, I. (1994). Thyroid Hormone-Induced Alterations in Phospholamban Protein Expression - Regulatory Effects on Sarcoplasmic-Reticulum Ca²⁺ Transport and Myocardial Relaxation. *Circulation Research* **75**, 245-251.

Klein, I. (1990). Thyroid-Hormone and the Cardiovascular-System. *American Journal of Medicine* **88**, 631-637.

Klein, I. & Danzi, S. (2007). Thyroid disease and the heart. *Circulation* **116**, 1725-1735.

Klein, I. & Ojamaa, K. (2001). Mechanisms of disease: Thyroid hormone and the cardiovascular system. *New England Journal of Medicine* **344**, 501-509.

Koeppen, B. M., Stanton, B. A. (2009) Berne & Levy: Fisiologia. Rio de Janeiro: Elsevier.

Korecky, B., Zak, R., Schwartz, K., & Aschenbrenner, V. (1987). Role of Thyroid-Hormone in Regulation of Isomyosin Composition, Contractility, and Size of Heterotopically Isotransplanted Rat-Heart. *Circulation Research* **60**, 824-830.

Kreuzberg, U., Theissen, P., Schicha, H., Schroder, F., Mehlhorn, U., De Vivie, E. R., Boknik, P., Neumann, J., Grohe, C., & Herzig, S. (2000). Single-channel activity and expression of atrial L-type Ca²⁺ channels in patients with latent hyperthyroidism. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **278**, H723-H730.

Laver, D. R. (2006). Regulation of ryanodine receptors from skeletal and cardiac muscle during rest and excitation. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **33**, 1107-1113.

LeWinter, M. M. & VanBuren, P. (2002). Myofilament remodeling during the progression of heart failure. *Journal of Cardiac Failure* **8**, S271-S275.

Lopezlopez, J. R., Shacklock, P. S., Balke, C. W., & Wier, W. G. (1994). Local, Stochastic Release of Ca²⁺ in Voltage-Clamped Rat-Heart Cells - Visualization with Confocal Microscopy. *Journal of Physiology-London* **480**, 21-29.

Lopezlopez, J. R., Shacklock, P. S., Balke, C. W., & Wier, W. G. (1995). Local Calcium Transients Triggered by Single L-Type Calcium-Channel Currents in Cardiac-Cells. *Science* **268**, 1042-1045.

Machackova, J., Barta, J., & Dhalla, N. S. (2005). Molecular defects in cardiac myofibrillar proteins due to thyroid hormone imbalance and diabetes. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **83**, 1071-1091.

Mattiazzi A. R. (2004) Músculo esquelético, cardíaco e liso. In *Fisiologia Humana de Houssay*, eds. Cingolani H. E, Houssay A. B. & cols., pp. 78-112. Artmed, 2004.

Meyer, M., Bluhm, W. F., He, H. P., Post, S. R., Giordano, F. J., Lew, W. Y. W., & Dillmann, W. H. (1999). Phospholamban-to-SERCA2 ratio controls the force-frequency relationship. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **276**, H779-H785.

Mittmann, K., Jaquet, K., & Heilmeyer, L. M. G. (1990). A Common Motif of 2 Adjacent Phosphoserines in Bovine, Rabbit and Human Cardiac Troponin-I. *FEBS Letters* **273**, 41-45.

Morkin, E. (1993). Regulation of Myosin Heavy-Chain Genes in the Heart. *Circulation* **87**, 1451-1460.

Netter, F. H. (1999) *Atlas de Anatomia Humana*. Porto Alegre: Artmed.

Ogawa, Y. (1994). Role of Ryanodine Receptors. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **29**, 229-274.

Ojamaa, K., Kenessey, A., & Klein, I. (2000). Thyroid hormone regulation of phospholamban phosphorylation in the rat heart. *Endocrinology* **141**, 2139-2144.

Ojamaa, K., Klemperer, J. D., & Klein, I. (1996). Acute effects of thyroid hormone on vascular smooth muscle. *Thyroid* **6**, 505-512.

Ojamaa, K., Sabet, A., Kenessey, A., Shenoy, R., & Klein, I. (1999). Regulation of rat cardiac Kv1.5 gene expression by thyroid hormone is rapid and chamber specific. *Endocrinology* **140**, 3170-3176.

Periasamy, M., Bhupathy, P., & Babu, G. J. (2008). Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. *Cardiovascular Research* **77**, 265-273.

Perry, S. V. (1999). Troponin i: Inhibitor or facilitator. *Molecular and Cellular Biochemistry* **190**, 9-32.

Philipson, K. D. & Nicoll, D. A. (2000). Sodium-calcium exchange: A molecular perspective. *Annual Review of Physiology* **62**, 111-133.

Pieske, B., Sutterlin, M., SchmidtSchweda, S., Minami, K., Meyer, M., Olschewski, M., Holubarsch, C., Just, H., & Hasenfuss, G. (1996). Diminished post-rest potentiation of contractile force in human dilated cardiomyopathy - Functional evidence for alterations in intracellular Ca²⁺ handling. *Journal of Clinical Investigation* **98**, 764-776.

Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Flower, R. J. (2007) Rang & Dale: Farmacologia. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier.

Rayment, I., Holden, H. M., Whittaker, M., Yohn, C. B., Lorenz, M., Holmes, K. C., & Milligan, R. A. (1993). Structure of the Actin-Myosin Complex and Its Implications for Muscle-Contraction. *Science* **261**, 58-65.

Reed, T. D., Babu, G. J., Ji, Y., Zilberman, A., Heyen, M. V., Wuytack, F., & Periasamy, M. (2000). The expression of SR calcium transport ATPase and the Na⁺/Ca²⁺ exchanger are antithetically regulated during mouse cardiac development and in hypo/hyperthyroidism. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **32**, 453-464.

Reiser, P. J., Portman, M. A., Ning, X. H., & Moravec, C. S. (2001). Human cardiac myosin heavy chain isoforms in fetal and failing adult atria and ventricles. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **280**, H1814-H1820.

Rhee, S. S. & Pearce, E. N. (2011). The Endocrine System and the Heart: A Review. *Revista Espanola de Cardiologia* **64**, 220-231.

Sandow, A. (1952). Excitation-Contraction Coupling in Muscular Response. *Yale Journal of Biology and Medicine* **25**, 176-&.

Schaub, M. C., Hefti, M. A., Harder, B. A., & Eppenberger, H. M. (1997). Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. *Journal of Molecular Medicine-Jmm* **75**, 901-920.

Sekiguchi, T. & Shimizu, H. (1987). Caffeine-Induced Calcium Release from Sarcoplasmic-Reticulum of A Skeletal-Muscle. *Journal of Pharmacobio-Dynamics* **10**, 55-62.

Sham, J. S. K., Cleemann, L., & Morad, M. (1992). Gating of the Cardiac Ca²⁺ Release Channel - the Role of Na⁺ Current and Na⁺-Ca²⁺ Exchange. *Science* **255**, 850-853.

Shenoy, R., Klein, I., & Ojamaa, K. (2001). Differential regulation of SR calcium transporters by thyroid hormone in rat atria and ventricles. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **281**, H1690-H1696.

Sucharov, C. C., Mariner, P., Long, C., Bristow, M., & Leinwand, L. (2003). Yin Yang 1 is increased in human heart failure and represses the activity of the human alpha-myosin heavy chain promoter. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 31233-31239.

Szkudlarek, A. C. (2011) Efeitos do hipertireoidismo no desempenho do músculo cardíaco, na pressão arterial e na concentração de corticosterona fecal de ratos. [tese de doutorado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná.

Takeuchi, K., Minakawa, M., Otaki, M., Odagiri, S., Itoh, K., Murakami, A., Yaku, H., & Kitamura, N. (2003). Hyperthyroidism causes mechanical insufficiency of myocardium with possibly increased SR Ca²⁺-ATPase activity. *Jpn.J Physiol* **53**, 411-416.

Van De Graaff, K. M. (2003) Anatomia humana. 6. ed. Barueri: Manole.

Vassallo, P. F., Stefanon, I., Rossoni, L. V., Tucci, P. J. F., & Vassallo, D. V. (1998). The left ventricular contractility of the rat heart is modulated by changes in flow and

alpha(1)-adrenoceptor stimulation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **31**, 1353-1359.

Watanabe, H., Washizuka, T., Komura, S., Yoshida, T., Hosaka, Y., Hatada, K., Aizawa, Y., Chinushi, M., & Yamamoto, T. (2005). Genomic and non-genomic regulation of L-type calcium channels in rat ventricle by thyroid hormone. *Endocrine Research* **31**, 59-70.

Wehrens, X. H. T., Lehnart, S. E., & Marks, A. R. (2005). Intracellular calcium release and cardiac disease. *Annual Review of Physiology* **67**, 69-98.

Winegrad, S. (1965). Autoradiographic Studies of Intracellular Calcium in Frog Skeletal Muscle. *Journal of General Physiology* **48**, 455-&.

Wolska, B. M., AveryhartFullard, V., Omachi, A., Stojanovic, M. O., Kallen, R. G., & Solaro, R. J. (1997). Changes in thyroid state affect pH(i) and Na-i(+) homeostasis in rat ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **29**, 2653-2663.

Zalk, R., Lehnart, S. E., & Marks, A. R. (2007). Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium. *Annual Review of Biochemistry* **76**, 367-385.

8 APÊNDICE



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 582

CERTIFICADO

O Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO: 23075.098041/2011-11

APROVADO: 28/02/2012 – R.O. 01/2012

TÍTULO: Estudo funcional da contribuição da SERCA2a e do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ para o relaxamento de músculos papilares isolados de animais com hipo e hipertiroidismo

AUTORES: Rosalvo T. H. Fogaça, Fabricio Furtado Vieira, João Victor Capelli Peixoto

DEPARTAMENTO: Fisiologia

Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio
Coordenador do CEUA