

BRUNO GIL ALDENUCCI

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES DE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES DE
RATOS COM HIPOTIREOIDISMO**

CURITIBA

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ – UFPR
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR – FISILOGIA DA
CONTRAÇÃO MUSCULAR

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES DE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES DE
RATOS COM HIPOTIREOIDISMO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular – Fisiologia da Universidade Federal do Paraná, Departamento de Biologia Celular.

Mestrando: Bruno Gil Aldenucci
Orientador: Prof.Dr. Rosalvo Tadeu H. Fogaça

CURITIBA

2010

Dedico este trabalho aos meus pais
que sempre me deram todo apoio e
incentivo necessário.

AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente meus pais Mario Sérgio Aldenucci e Márcia Suely Gil Aldenucci, pelo incentivo e apoio durante toda construção desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça, pela paciência, colaboração, orientação e auxílio na condução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Estevan Nolf Damiani, pelo auxílio fundamental no início do projeto.

Ao Prof. Nelson Itiro Miyague, disponibilizando seu tempo e conhecimento para realização dos exames ecocardiográficos.

Aos meus colegas de laboratório Robson Olivoto, Ariani Cavassin e Melanie Alves Oliveira, pelo auxílio nos experimentos.

A Universidade Federal do Paraná e em especial o Laboratório de Contração Muscular do setor de Ciências Biológicas e da Saúde, por disponibilizar material e equipamentos para a realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho se concretizasse.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 ESTRUTURA E FUNCIONAMENTO DO MÚSCULO CARDÍACO.....	1
1.1.1 <i>Proteína envolvidas</i>	2
1.1.2 <i>Acoplamento Excitação Contração (AEC) e a Contração do Músculo Cardíaco</i>	7
1.1.3 <i>Ciclo Cardíaco</i>	10
1.1.4 <i>Potencial de Ação Cardíaco</i>	14
1.2 HIPOTIREOIDISMO.....	19
1.2.1 <i>Efeitos Genômicos</i>	24
1.2.2 <i>Efeitos não genômicos</i>	27
1.2.3 <i>Influência do sistema simpático-adrenal na função cardíaca</i>	28
2 OBJETIVOS	31
2.1 GERAL.....	31
2.2 ESPECÍFICOS.....	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CARDÍACA POR ECOCARDIOGRAFIA.....	33
3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ELÉTRICA DO CORAÇÃO MEDIANTE ELETROCARDIOGRAFIA.....	37
3.3 EXPERIMENTOS DE MENSURAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL (<i>IN VIVO</i>).....	38
3.4 DOSAGEM HORMONAL.....	39
3.5 EXPERIMENTOS COM MÚSCULO PAPILAR ISOLADO INTACTO.....	39
3.5.1 <i>Protocolos experimentais</i>	41
3.6 EXPERIMENTOS COM FIBRAS PERMEABILIZADAS COM SAPONINA.....	46
3.6.1 <i>Soluções</i>	47
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
4 RESULTADOS	50
4.1 ECOCARDIOGRAMA.....	50
4.2 ELETROCARDIOGRAMA.....	54
4.3 PRESSÃO ARTERIAL.....	57
4.4 DOSAGEM HORMONAL.....	59
4.5 FORÇA ISOMÉTRICA.....	60
4.6 POTENCIAÇÕES PÓS-PAUSAS.....	61
4.7 VELOCIDADES DE CONTRAÇÃO E DE RELAXAMENTO (DF/DT).....	65

4.8	TEMPO NECESSÁRIO PARA PRODUÇÃO DE 50% DA FORÇA MÁXIMA E PARA 50% DO RELAXAMENTO	68
4.9	AVALIAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO DO TROCADOR Na^+/Ca^{2+} NO TEMPO DE RELAXAMENTO DE MÚSCULOS PAPILARES QUIESCENTES.....	70
4.10	TRABÉCULAS DE PAPILARES PERMEABILIZADOS COM O USO DE SAPONINA.....	76
5	DISCUSSÃO	78
6	CONCLUSÕES	88
7	REFERÊNCIAS.....	89

LISTA DE FIGURAS

<i>FIGURA 1 – Representação do filamento fino.</i>	7
<i>FIGURA 2 - Representação esquemática dos mecanismos celulares envolvidos na contração muscular cardíaca.</i>	10
<i>FIGURA 3 - Representação gráfica do ciclo cardíaco (pressão – volume). 1 = contração isovolumétrica, 2 = ejeção, 3 = relaxamento isovolumétrico, 4 = enchimento diastólico.</i>	12
<i>FIGURA 4 - Registro original de um experimento típico de ecocardiografia com rato do grupo controle, demonstrando as fases do ciclo cardíaco. ER = fase de enchimento rápida, EL = fase de enchimento lento, TC = tempo de contração isovolumétrica, TR = tempo de relaxamento isovolumétrico, FE = fase de ejeção.</i>	13
<i>FIGURA 5 – Representação esquemática do potencial de ação cardíaco.</i>	16
<i>FIGURA 6 - Representação e localização da glândula tireóide.</i>	17
<i>FIGURA 7 - Representação esquemática do mecanismo de ação do T3.</i>	24
<i>FIGURA 8 - Mecanismos celulares de ação genômica do T3.</i>	26
<i>FIGURA 9 – Via de sinalização β-adrenérgica.</i>	30
<i>FIGURA 10 – Imagem ecocardiográfica de um rato hipotireoideu, demonstrando o procedimento para obtenção do volume diastólico final.</i>	34
<i>FIGURA 11 - Imagem ecocardiográfica do coração de um rato, demonstrando as ondas E e A.</i>	35
<i>FIGURA 12 – Imagem representativa dos intervalos e segmentos de um eletrocardiograma.</i>	37
<i>FIGURA 13 - Imagem demonstrativa dos músculos papilares de ratos.</i>	40
<i>FIGURA 14 - Representação do registro experimental através do labtech.</i>	43
<i>FIGURA 15 - Representação do método de análise da velocidade de contração e de relaxamento.</i>	43
<i>FIGURA 16 - Representação do método de análise do t_{50}.</i>	44
<i>FIGURA 19 – Registro original de um experimento típico de ecocardiografia de rato do grupo controle.</i>	53
<i>FIGURA 20 – Registro original de um experimento típico de ecocardiografia de rato com hipotireoidismo.</i>	53
<i>FIGURA 17 – Registro típico de um eletrocardiograma de rato (grupo controle).</i>	55
<i>FIGURA 18 – Registro típico de um eletrocardiograma de rato (grupo hipotireoidismo).</i>	56
<i>FIGURA 21 – Registro original de um experimento típico de mensuração da pressão arterial de rato.</i>	57
<i>FIGURA 22 – Representação gráfica dos dados de pressão sistólica e diastólica dos grupos controle e hipotireoidismo.</i>	58
<i>FIGURA 23 - Representação gráfica da força máxima produzida em papilares isolados nas concentrações de cálcio de 0,5; 1; 2; 3; 5; 10 mm nos grupos controle e hipotireoidismo.</i>	60
<i>FIGURA 24 – Registro original de um experimento típico de potenciações pós-pausas de 1, 3, 5, 10 e 20 segundos (controle).</i>	62

<i>FIGURA 25 – Registro original de um experimento típico de potenciações pós-pausas de 1, 3, 5, 10 e 20 segundos de rato com hipotireoidismo.....</i>	<i>62</i>
<i>FIGURA 26 - Representação gráfica dos dados de contração isométrica de papilares obtidos após pausas de 1, 3, 5, 10 e 20 segundos do grupo controle. ...</i>	<i>63</i>
<i>FIGURA 27 - Representação gráfica dos dados de contração isométrica de papilares obtidos após potenciações pós-pausas (1, 3, 5, 10 e 20 segundos) - grupo hipotireoidismo.</i>	<i>64</i>
<i>FIGURA 28 - Representação gráfica da velocidade de contração de músculo papilar dos grupos controle e hipotireoidismo (+df/dt). *= apresenta diferença estatística significativa.....</i>	<i>66</i>
<i>FIGURA 29 - Representação gráfica da velocidade de relaxamento de músculo papilar dos grupos controle e hipotireoidismo (-df/dt). *= apresenta diferença estatística significativa.....</i>	<i>67</i>
<i>FIGURA 30 - Representação gráfica dos resultados de t_{50} dos grupos controle e hipotireoidismo.</i>	<i>69</i>
<i>FIGURA 31 – Exemplo de um registro de relaxamento de músculos papilares do grupo controle utilizando soluções de ringer normal (rn) e ringer zero sódio e zero cálcio (0na 0ca) após contração induzida por cafeína.</i>	<i>71</i>
<i>FIGURA 32 – Registro original de um experimento típico do protocolo de avaliação da contribuição do trocador NCX e da SERCA no relaxamento de músculo papilar isolado de rato hipotireoideu.</i>	<i>72</i>
<i>FIGURA 33 – Representação gráfica do tempo necessário para obtenção de 50 e 100 % de relaxamento de papilares isolados em Ringer normal.....</i>	<i>73</i>
<i>FIGURA 34 - Representação gráfica do tempo necessário para obtenção de 50 e 100 % de relaxamento de papilares isolados.</i>	<i>74</i>
<i>FIGURA 35 – Representação gráfica dos resultados da contribuição do ncx para obtenção de 50 e 100 % de relaxamento de papilares isolados de rato. *=Diferença estatisticamente significativa do tempo para obtenção de 100 % de relaxamento do grupo experimental em relação ao controle.....</i>	<i>75</i>
<i>FIGURA 36 – Produção de força induzida pela liberação de íons cálcio após carregamento do RS em tempos de 5, 30, 60 e 120 segundos. *= apresenta diferença estatística significativa.</i>	<i>77</i>

LISTA DE TABELAS

<i>TABELA 1 - Composição das soluções usadas nos experimentos com fibras permeabilizadas por saponina. NaCP, Na₂phosphocreatine; BES, N,N-Bis (2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid; pCa = -log[Ca²⁺]₀; e pH = -log [H⁺]......</i>	<i>48</i>
<i>TABELA 2 - Valores de performance cardíaca de animais controle e hipotireóideos obtidos por ecocardiografia. VS=volume sistólico, VDF=volume diastólico final, TRIV=tempo de relaxamento isovolumétrico, TCIV=tempo de contração isovolumétrica, TE=tempo de ejeção, TDT=tempo diastólico total, FC=frequência cardíaca, AD=área diastólica; AS=área sistólica; FE=fração de ejeção; T desac. onda e=tempo de desaceleração da onda e, Var. A=variável A (tempo sistólico + TRIV), DS=débito sistólico; DC=débito cardíaco; Tei=índice de TEI; E/A=taxa onda E por onda A. * representa diferença estatisticamente significativa dos valores do grupo experimental em relação ao grupo controle.</i>	<i>52</i>
<i>TABELA 3 - Valores de parâmetros eletrocardiográficos de animais controle e hipotireoideos. Inter PR= intervalo PR; Seg PR= segmento PR; Dur QRS= duração do complexo QRS; Seg ST= segmento ST; Inter QT= intervalo QT; EEM= eixo elétrico médio. Os valores estão expressos em milisegundos; * diferença estatísticamente significativa (P<0,05).</i>	<i>57</i>
<i>TABELA 4 – Valores de T3 e T4 nos grupos controle e hipotireoidismo.</i>	<i>59</i>
<i>TABELA 5 – Valores da média do t₅₀ dos grupos controle e hipotireoidismo (segundos).</i>	<i>68</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

+df/dt	-	Primeira derivada da produção de força no tempo
-df/dt	-	Primeira derivada de decréscimo de força no tempo
+dP/dt	-	Primeira derivada da produção de pressão no tempo
-dP/dT	-	Primeira derivada de decréscimo de pressão no tempo
ACTH	-	Hormônio adrenocorticotrófico
Akt	-	Proteína quinase
AMPc	-	Monofosfato cíclico de adenosina
ATP	-	Adenosina trifosfato
ADP	-	Adenosina difosfato
D1	-	Desiodase do tipo 1
D2	-	Desiodase do tipo 2
D3	-	Desiodase do tipo 3
DHP	-	Canais diidropirimidínicos
DNA	-	Ácido desoxirribonucléico
DS	-	Débito sistólico
DC	-	Débito cardíaco
EPO	-	Eritropoietina
FC	-	Frequência cardíaca
FE	-	Fração de ejeção
FEVE	-	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
GDP	-	Guanosina difosfato
GMPc	-	Monofosfato cíclico de guanosina
GTP	-	Guanosina trifosfato
HIF	-	Fator induzido por hipóxia
HCN2	-	Gene codificado canais rápidos
HCN4	-	Gene codificado componente lento
I_k	-	Slowly inactivating current (corrente de K^+ de inativação lenta)
I_{to}	-	Transient outward current (corrente transitória independente)
MAPK	-	quinase ativada por mitógeno

MHC	-	Cadeia pesada de miosina
MLC	-	Cadeia leve de miosina
MLCK	-	Cinase da cadeia leve de miosina
NCX	-	Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
NOS	-	Óxido nítrico sintetase
eNOS	-	Óxido nítrico sintetase endotelial
PKA	-	Proteína quinase A
PKC	-	Proteína quinase C
PLB	-	Fosfolambano
PPP	-	Potenciação pós-pausa
PR	-	Potenciação relativa
RNAm	-	Ácido ribonucléico mensageiro
RS	-	Retículo sarcoplasmático
RVP	-	Resistência vascular periférica
RyR	-	Receptor de rianodina
SERCA2	-	Bomba de Ca^{2+} do RS
SLN	-	Sarcolipina
T3	-	Triiodotironina
T4	-	Tiroxina
TBG	-	Globulina ligadora de tiroxina
TBPA	-	Pré-albumina ligadora da tiroxina
TDT	-	Tempo diastólico total
TnC	-	Troponina C
TnI	-	Troponina I
TnT	-	Troponina T
TR	-	Receptor de hormônio tireoidiano
TREs	-	Elementos responsivos aos hormônios tireoidianos
TRH	-	Hormônio liberador da tireotropina
TRIV	-	Tempo de relaxamento isovolumétrico
TSH	-	Hormônio estimulante da tireóide

RESUMO

Os hormônios da tireóide exercem efeitos profundos no sistema cardiovascular. No hipotireoidismo, tem sido descrito redução do desempenho cardíaco e aumento da resistência vascular periférica. Nesse estudo investigamos as conseqüências no sistema cardiovascular, do hipotireoidismo induzido por metimazol em ratos. Avaliamos o desempenho cardíaco através do emprego de ecocardiografia, eletrocardiografia e mensuração da pressão arterial. Em papilares intactos isolados, avaliamos velocidade de contração ($+dF/dT$) e a velocidade de relaxamento ($-dF/dT$), potenciações pós pausas e a contribuição do NCX para atingir 50 e 100% do relaxamento. Em experimentos com papilares saponificados, mensuramos a capacidade de recaptação de cálcio do RS após tempos de carregamento de 5, 30, 60 e 120 segundos. Em nossos achados, o hipotireoidismo induz aumento do tempo de ejeção (TE), do tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), do tempo diastólico total (TDT), com redução da fração de ejeção, débito sistólico e débito cardíaco. O índice de TEI e a pressão arterial não foram diferentes estatisticamente significativos em relação ao grupo controle. Em músculos papilares isolados, a força máxima produzida, a relação entre produção de força em diferentes concentrações de cálcio extracelular, as potenciações pós pausas e $+dF/dT$ e $-dF/dT$ não foram afetados. Em papilares intactos e papilares saponificados, respectivamente, a capacidade de recaptação de cálcio pelo RS no grupo experimental foi menor e a contribuição para o relaxamento do NCX é maior nos hipotireoideus do que nos controles. Esses dados sugerem que disfunções sistólicas e diastólicas decorrente do hipotireoidismo, são provavelmente devido a diminuição da atividade da SERCA2 e essas disfunções são minimizadas pelo aumento da contribuição do NCX para o relaxamento do miocárdio.

Palavras-chave: Hipotireoidismo, desempenho cardíaco, ecocardiografia, contração isométrica.

ABSTRACT

Thyroid hormones have a profound effects in the cardiovascular system. In hypothyroidism, have been described reduction in cardiac performance and increase in vascular resistance. In this study we investigated the consequences of hypothyroidism induced by methimazole in rats. We evaluate the cardiac performance by echocardiography, eletrocardiography and measured arterial blood pressure. In intact isolated papillary muscle we evaluate the rate of force development during contraction ($+dF/dT$) and the maximum rate of force decay during relaxation ($-dF/dT$), post rest potentiation and the contribution of NCX to reach 50 and 100 % of relaxation. In saponin skinned fiber experiments we measured the SR calcium uptake capacity after loading time of 5, 30, 60 and 120 seconds. We found that hypothyroidism induces increase in ejection time (ET), isovolumic relaxation time (IVRT), total diastolic time (TDT) with reduction in the ejection fraction, systolic and cardiac output. Tei index and arterial blood pressure were not statistically different from the control. In isolated papillary muscle, the maximal force produced, the force versus extracellular calcium concentration relationship, pos rest potentiation, $+dF/dT$ and $-dF/dT$ were unaffected. In intact and skinned fiber, respectively, the SR calcium loading capacity was smaller and the contribution for relaxation of NCX was larger in hypothyroid than in control. These data suggest that diastolic and systolic dysfunction in hypothyroidism is due to a reduced in SERCA2 activity and such dysfunctions are minimized by the increase of the contribution of NCX for myocardial relaxation.

Key-words: hypothyroidism, cardiac performance, echocardiography, isometric contraction.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estrutura e Funcionamento do Músculo Cardíaco

O músculo cardíaco é composto principalmente por tecido contrátil (miócitos) e tecido conjuntivo. Este tem como principal função, a contração e relaxamento do coração. Os miócitos cardíacos possuem todos os elementos comuns a qualquer célula e, além disso, possuem diferenciações citoplasmáticas denominadas miofibrilas. As miofibrilas formam os sarcômeros que são estruturas responsáveis pela contração. A contração é dependente de cálcio que é liberado pelo retículo sarcoplasmático. O cálcio armazenado no retículo está ligado a uma proteína denominada calsequestrina, e quando liberado para o ambiente citosólico, se liga aos miofilamentos para desenvolver a contração. (Mohrman e Heller, 2007).

A membrana dos miócitos cardíacos invagina-se formando os túbulos “T”. Estes parecem estar em justaposição com a membrana das cisternas terminais do RS. A junção da membrana do sistema tubular transversal com a membrana da cisterna terminal do RS forma a díade, e a junção da membrana do sistema tubular transversal com as membranas das cisternas terminais de dois RS formam as tríades (Vassallo et al., 1998).

Outra característica importante da célula cardíaca é o grande número de mitocôndrias que asseguram o imediato suprimento de adenosina trifosfato (ATP), para atender às altas necessidades metabólicas do músculo cardíaco (Mohrman e Heller, 2007).

Os miócitos cardíacos são células cardíacas cilíndricas com ramificações ou elipsóides. São conectadas entre si por discos intercalares, um segmento destes discos – a junção comunicante – constitui uma união de baixa resistência elétrica, formada por conexinas que dão origem a um canal (*conexon*), o que permite uma rápida transmissão dos impulsos de célula a célula, resultando em uma contração quase que simultânea de todas as células (Mattiuzzi, 2004).

A função primária dos miócitos cardíacos consiste na transdução de energia química em energia mecânica. O processo cíclico de contração e relaxamento está baseada 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, Homsher e Regnier, 2000).

1.1.1 Proteína envolvidas

➤ Actina

A actina é uma proteína globular que forma duas cadeias helicoidais do filamento fino (FIGURA 1). Possui dois importantes papéis biológicos: interação com a miosina, reconstituindo o complexo actomiosina, qual libera energia química proveniente do ATP para produzir mudanças químicas e mecânicas nas pontes cruzadas de miosina (encurtamento do sarcômero); e é componente do citoesqueleto onde possui papel importante na modulação da atividade elétrica do coração afetando diversos canais iônicos (Calaghan et al. 2004).

➤ Miosina

A miosina é uma molécula com caudas rígidas a qual confere estrutura rígida para o filamento grosso. A cabeça globular é uma estrutura complexa que contém ambas as cadeias pesadas e leves de miosina, possuindo um sítio de ligação para actina e apresenta atividade ATPásica. (Brenner and Yu 1993; Rayment, 1993; Dantzig et al, 1992).

Estruturalmente a miosina é constituída por duas cadeias polipeptídicas, denominadas cadeias pesadas de miosina (MHC) e quatro cadeias denominadas cadeias leves de miosina (MLC). Estas apresentam diferentes pesos moleculares, MHC 200 kDa e MLC de 16 a 25 kDa. MHCs são estruturas moleculares que interagem com a actina, formando pontes cruzadas e são responsáveis pela

conversão de energia química em mecânica (Spudich, 1994). A região N-terminal da cadeia pesada forma uma porção globular que contém os sítios para ligação do ATP e da actina. As porções C-terminais das duas cadeias pesadas se associam para formar o domínio cauda. A molécula de miosina contém regiões suscetíveis a clivagem proteolítica. Através de digestão enzimática pode-se obter os fragmentos de meromiosina pesada (HMM) e meromiosina leve (LMM). A HMM pode ainda ser digerida em quatro subfragmentos, dois de subfragmento 1 (S1) e dois de subfragmentos 2 (S2) (Pinto, Sousa e Cameron, 2004).

Átrios e ventrículos contêm diversas isoformas de MHC que diferem em sua estrutura e na atividade ATPásica. A α -MHC, também chamada de V1, tem alta atividade ATPásica e promove uma rápida velocidade de encurtamento das fibras musculares cardíacas. (Lewinter e VanBuren, 1995). A β -MHC também chamada de V3 trabalha mais economicamente, esta possui uma baixa atividade ATPásica. Aumento na expressão de genes que codificam para a isoforma lenta (β -MHC), tem um papel importante na adaptação da performance cardíaca. Em humanos a β -MHC é a isoforma ventricular predominante durante toda vida adulta, entretanto pequenos níveis de α -MHC podem ser detectadas no miocárdio humano. (Sucharov et al, 2003; Lewinter e Vanburen, 2002; Reiser et al, 2001; Schaub et al, 1997).

A MLC é distinguida em essencial (MLC1) e cadeia leve 2 ou reguladora (MLC2 ou RLC). MLC1 é parte integral da cabeça de miosina e tem como função manter a estrutura, a integridade da proteína. A MLC2 pode ser fosforilada pela cinase da cadeia leve de miosina (MLCK), aumentando a sensibilidade do sistema contrátil ao Ca^{2+} . As duas cadeias leves de miosina se ligam a cada cadeia pesada na base do domínio S1 ou na região do “pescoço”. Ambas as cadeias leves conferem estabilidade física ao filamento grosso (Pinto, Sousa e Cameron, 2004).

➤ **Bomba de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (SERCA)**

A SERCA é uma bomba de cálcio localizada na membrana do retículo sarcoplasmático, sua atividade depende da presença de ATP. A SERCA possui uma seqüência similar a subunidade α da bomba de sódio e potássio (Cingolani e Houssay, 2004).

A bomba de Ca^{2+} do retículo tem papel importante no relaxamento muscular, através do transporte do cálcio citosólico para o interior do retículo. A velocidade de relaxamento muscular é determinada pela velocidade de recaptação de cálcio para o lúmen do retículo (Schmidt et al., 2000).

No músculo cardíaco a atividade da SERCA é regulada por duas proteínas: fosfolambano (PLB) e sarcolipina (SLN) (Periasamy, Bhupathy e Babu, 2008). A SERCA2a é a isoforma mais abundante no tecido cardíaco estando presente durante o desenvolvimento embrionário e na fase adulta de mamíferos. Porém a isoforma 2b também é expressa. A isoforma SERCA1a encontrada no músculo esquelético de contração rápida, não é expressa no músculo cardíaco. No tecido cardíaco adulto a SERCA2a é a forma predominante e representa a proteína mais abundante da membrana no retículo. Em modelos animais foi identificado diminuição da expressão, da quantidade e funcionamento da SERCA2a decorrente do envelhecimento. Esse decréscimo causa prolongamento do tempo de contração e diminuição da função miocárdica. Este decréscimo também foi observado em situações acentuadas de hipoxia. (Cain et al., 1998). O hipotireoidismo causa diminuição da expressão na SERCA2a e aumento na PLB (Reed et al., 2000).

A atividade da SERCA consome uma grande quantidade de ATP. Portanto sua atividade pode ser afetada por mudanças no suprimento energético (Maack e O'Rourke, 2007).

➤ **Fosfolambano**

O Fosfolambano é o principal substrato da proteína cinase dependente de AMP cíclico (PKA) e é regulador da atividade da SERCA. É uma fosfoproteína composta por 52 aminoácidos e altamente expressa em músculo cardíaco. É o

principal mediador da resposta β -adrenérgica no coração. A fosforilação da PLB na serina 16 e da treonina 17 pela PKA ou pela CaMKII, respectivamente, pode aumentar a atividade da SERCA. A PLB defosforilada inibe a atividade de bomba da SERCA. A regulação da atividade da SERCA pelo fosfolambano é considerada o primeiro mecanismo de resposta a estimulação β -adrenérgica do coração (Sande et al., 2002).

➤ **Sarcolipina**

Sarcolipina é uma proteína de baixa massa molecular, composta por 31 aminoácidos. No coração é expressa predominantemente nos átrios, sendo pouco expressa nos ventrículos (Babu et al., 2007; Minamisawa et al., 2003).

O aumento na expressão de sarcolipina em ventrículos promoveu um decréscimo da afinidade da SERCA2a por cálcio. Seu efeito inibitório sobre a função contrátil é revertida por tratamento com isoproterenol, sugerindo que similarmente a PLB a SLN possui papel importante no mecanismo da resposta β -adrenérgica em átrios (Babu et al., 2006).

➤ **Tropomiosina**

A tropomiosina é uma molécula filamentososa composta por duas cadeias α peptídicas helicoidais. Cada dímero de tropomiosina se estende por sobre sete moléculas de actina (FIGURA 1), com os dímeros seqüenciais da tropomiosina arranjados em uma configuração cabeça-cauda. Um complexo de troponina o qual consiste de três subunidades (troponina T, troponina I e troponina C) está presente sobre cada dímero de tropomiosina. O complexo troponina influencia a posição da molécula de tropomiosina no filamento de actina e, portanto, regula a interação entre a actina e miosina. Durante o relaxamento muscular, quando os níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} estão baixos, a tropomiosina bloqueia o sítio de ligação da cabeça da miosina na actina. 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, Homsher e

Regnier, 2000). Existem duas formas predominantes de TM: α -TM e β -TM. A taxa de expressão destas é um determinante crítico para o tempo total de relaxamento do miocárdio e para a velocidade máxima de relaxamento do mesmo (Muthuchamy et al. 1995; Gaffin et al, 2004)

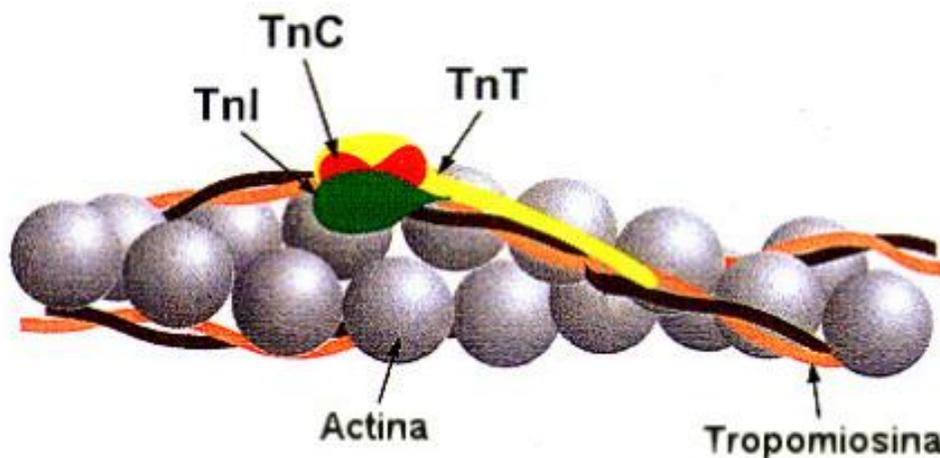
➤ **Troponina**

Conforme descrito acima, o complexo troponina é composto por três subunidades protéicas, troponina T, troponina C e troponina I. A TnT é a subunidade ligante a tropomiosina e regula a sensibilidade ao Ca^{2+} para desenvolvimento de tensão via mecanismo alostérico. (Perry, 1999). A troponina C pertence à família das proteínas ligadoras de Ca^{2+} . A troponina I é a troponina inibitória, possui uma seqüência de 30 aminoácidos na região N-terminal onde existem dois sítios de fosforilação dependente de PKA (Mittmann et al, 1990). Mudanças nos níveis de fosforilação possibilitam a TnI a induzir mudanças conformacionais no complexo troponina, levando a alteração na afinidade da TnC ao Ca^{2+} desenvolvendo relaxamento (Zhang et al 1995). A TnI é também um potente alvo da PKC, a qual provavelmente exerce um efeito “inibitório” na atividade miofibrilar (Noland e Kuo, 1991).

Mudanças nos níveis de fosforilação da cTnI observada no hipotireoidismo está correlacionada com alterações na velocidade de desenvolvimento de pressão (+dP/dT) e na velocidade de relaxamento do miocárdio (-df/dt) (Jakab et al 1994).

➤ **Titina**

A titina é uma proteína estrutural gigante, localizada entre a linha Z e a linha M. Esta proteína faz parte de um sistema filamentar responsável por organizar o complexo protéico miofibrilar e contribuir para a tensão passiva. A titina é a terceira proteína mais abundante depois da miosina e da actina (Machackova et al., 2005).



Fonte: Gordon et al., 2000.

FIGURA 1 – Representação do filamento fino.

1.1.2 Acoplamento Excitação Contração (AEC) e a Contração 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 (Costanzo, 2004).

O processo de acoplamento excitação contração do músculo cardíaco inicia-se portanto, com a propagação do potencial de ação pelo sarcolema e ao longo do túbulo-transverso (Winegrad, 1965).

A membrana da cisterna terminal do RS possui um canal de cálcio denominado receptor de rianodina (RyR) através do qual ocorre a liberação do Ca^{2+} do RS (Ogawa, 1994; Franzini-Armstrong e Protasi, 1997). No músculo

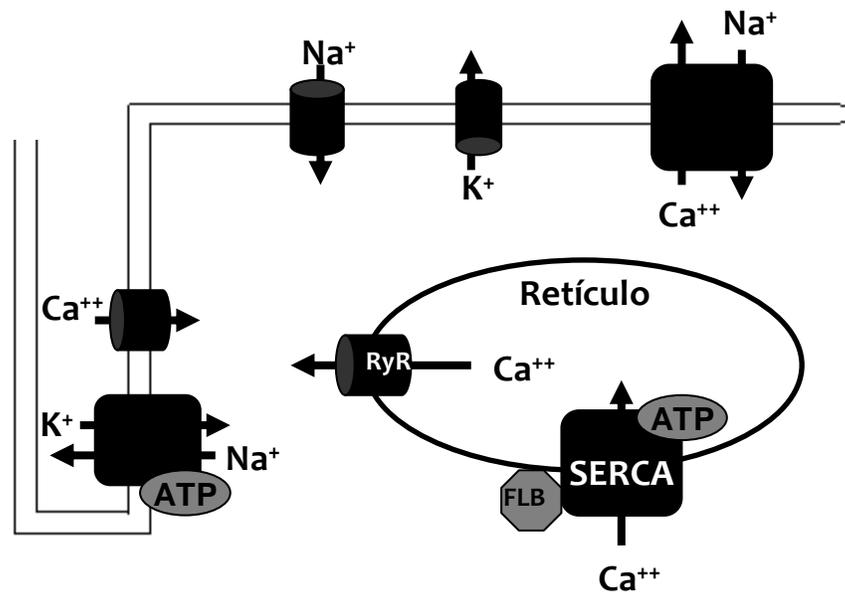
cardíaco acredita-se que essa liberação é induzida pelo Ca^{2+} . Os canais diidropiridínicos (DHP), localizados no sarcolema são canais protéicos sensíveis a voltagem, ou seja, sua conformação protéica se altera, formando um poro em resposta à despolarização, permitindo assim o influxo de Ca^{2+} a favor de seu gradiente eletroquímico. O resultado prático do influxo de Ca^{2+} é a liberação de Ca^{2+} induzida pela ligação do Ca^{2+} ao RyR (CICR) (Mattiuzzi, 2004) (FIGURA 2). Este mecanismo constitui-se num sistema de amplificação de sinal pois uma pequena quantidade de cálcio proveniente do extracelular, desencadeia uma liberação maciça deste íon do retículo sarcoplasmático.

O mecanismo da liberação de cálcio induzida por íons cálcio (CICR) pode também envolver a participação do trocador sódio-cálcio, presente no sarcolema. (Bridge et al., 1990). Graças a este trocador o transporte de Ca^{2+} através do sarcolema estão acoplados a movimentos recíprocos de Na^+ , com uma estequiometria de $3\text{Na}^+ : 1\text{Ca}^{2+}$ (Brenner e Yu, 1993). A direção na qual se realiza a troca depende fundamentalmente do gradiente eletroquímico para o Na^+ e para o Ca^{2+} . Em repouso ou diástole o trocador utiliza o gradiente eletroquímico do sódio o qual favorece a entrada deste na célula para remover o Ca^{2+} desta, (modo direto ou forward). Entretanto, durante a despolarização e o subsequente influxo de Ca^{2+} , 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 inverso ou reverse). No modo reverso o sistema de troca sódio-cálcio atua auxiliando o processo de liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} . No modo direto ou forward este sistema de troca atua induzindo o relaxamento muscular por meio da remoção do cálcio intracelular (Cingolani e Houssay, 2004; Brenner e Yu, 1993; Sham et al., 1992).

Na membrana do RS existe uma Ca^{2+} -ATPase denominada SERCA, que transporta o cálcio para dentro do retículo, tendo papel principal no processo de relaxamento muscular (Meyer et al, 1999). A contração e o relaxamento do músculo cardíaco são regulados pela concentração de Ca^{2+} citoplasmático. A homeostasia do íon cálcio intracelular depende da quantidade de cálcio que

provem dos compartimentos extracelular e intracelular (RS) e dos mecanismos de transporte desse íon do citosol para o compartimento intracelular (RS) e de seu transporte para o meio extracelular (bomba de Cálcio, sistema de troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) (Ojamaa, Kenessey e Klein, 2000). A atividade da SERCA2 é regulada por uma fosfoproteína denominada fosfolambano (PLB) (FIGURA 2). A fosforilação da PLB pela proteína cinase A (PKA), a fosforilação da cálcio-calmodulina e a redução da expressão de PLB levam a inibição da SERCA2 (Ojamaa, Kenessey e Klein, 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; Bers, 2001). 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, portanto ocupados, quando a concentração intracelular desse íon se elevar como consequência de sua liberação pelo RS (Pinto, Sousa e Cameron, 2004; Bers, 2002).



Fonte: adaptados de Knolmann e Roden, 2008

FIGURA 2 - Representação esquemática dos mecanismos celulares envolvidos na contração muscular cardíaca.

1.1.3 Ciclo Cardíaco

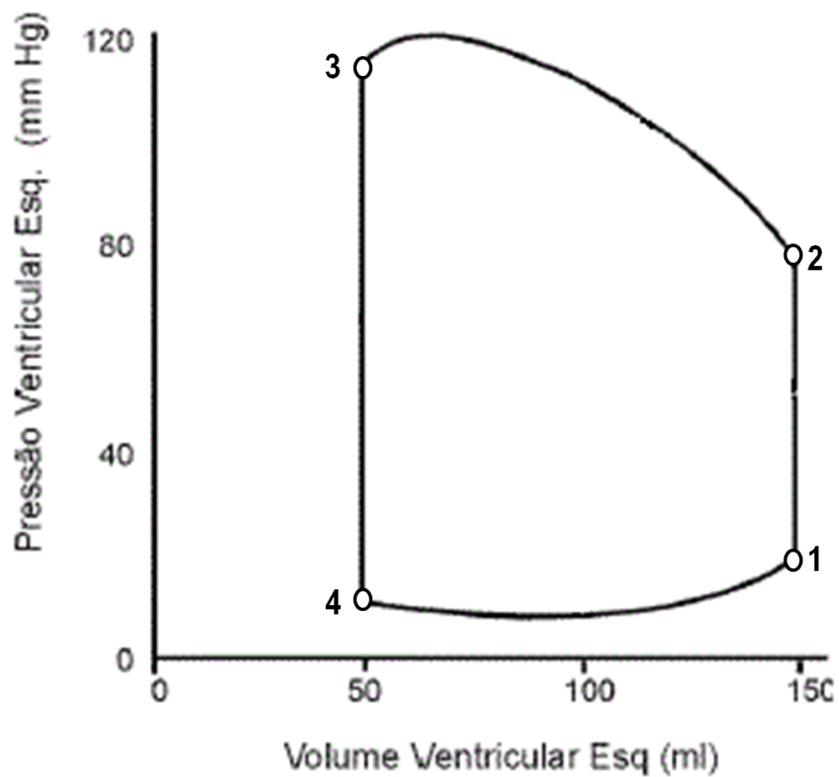
A fase diastólica do ciclo começa com a abertura das válvulas atrioventriculares (AV) (segmento 4-1 da figura 3). Quando a pressão do ventrículo esquerdo se torna menor que a do átrio esquerdo a válvula mitral se abre dando início a fase de enchimento ventricular, provocando uma queda inicial da pressão atrial. Em seguida, as pressões em ambas as câmaras elevam-se lentamente à medida que o átrio e o ventrículo continuam se enchendo passivamente em

harmonia com o retorno do sangue ao coração através das veias (Mohrman e Heller, 2007).

A contração atrial é iniciada próximo do final da diástole ventricular disparada pela despolarização das células atriais. À medida que estas células desenvolvem tensão, e se encurtam, a pressão atrial aumenta, e uma quantidade de sangue adicional flui para o ventrículo. (Mohrman e Heller, 2007)

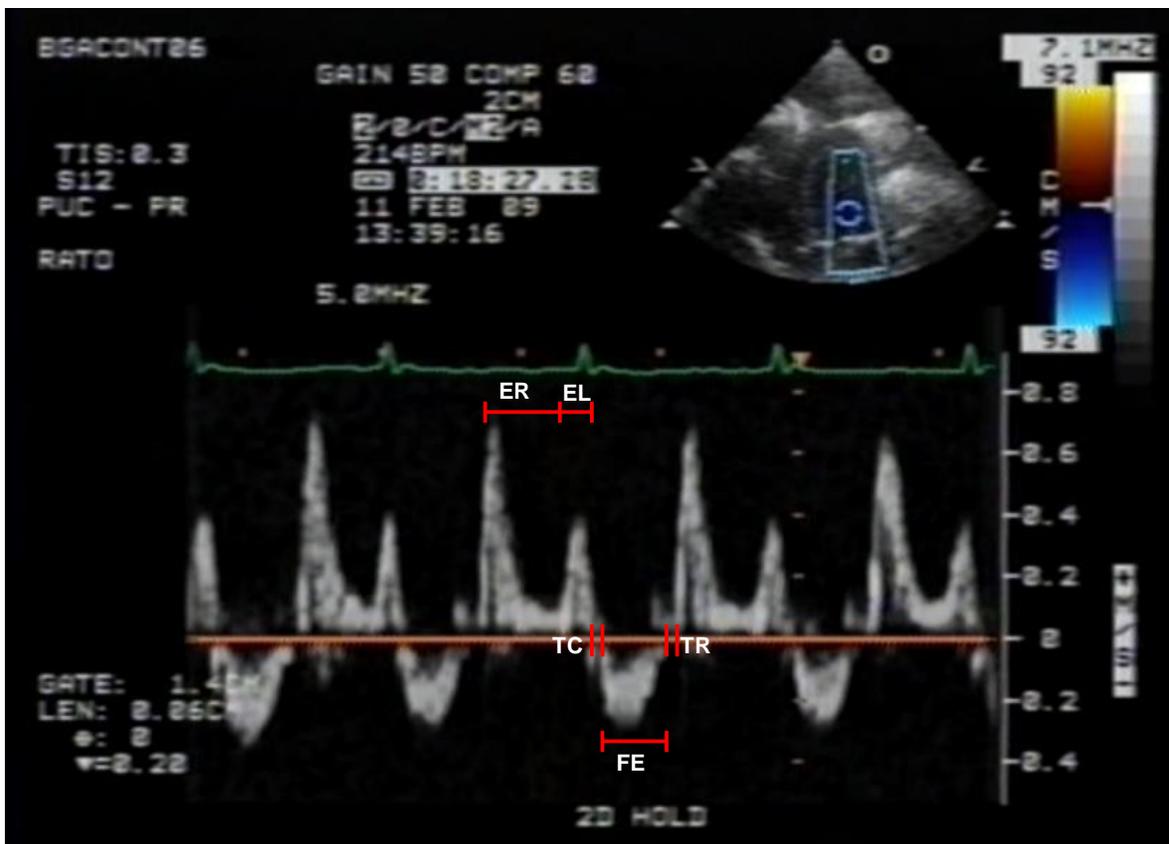
A sístole ventricular inicia quando o potencial de ação ao se propagar pelo nodo AV e sistema de His Purkinje, dá origem a despolarização das células do músculo ventricular. A contração das células do músculo ventricular disparada pelo potencial de ação faz com que a pressão intraventricular aumente acima daquela do átrio, o que causa fechamento abrupto da válvula AV. À medida que a contração ventricular se intensifica a pressão ventricular continua a aumentar. Estando a pressão ventricular em níveis maiores do que a atrial porém menores do que a existente na raiz da aorta, ambas as válvulas, mitral e tricúspide encontram-se fechadas (segmento 1-2 figura 3). Esta fase, por não existir mudança no volume de sangue intraventricular é definida como contração isovolumétrica. No momento em que a pressão intraventricular exceder a pressão da aorta, a válvula aórtica se abre, dando início a fase de ejeção ventricular (segmento 2-3 figura 3). A seguir a força de contração ventricular diminui. No instante em que a pressão intraventricular cair abaixo da pressão aórtica, ocorre o fechamento abrupto da válvula aórtica. A medida que o músculo ventricular relaxa a pressão intraventricular diminui rapidamente. Neste intervalo de tempo os valores de pressão intraventricular encontram-se abaixo da pressão da raiz da aorta, contudo, acima da pressão intraatrial. Como consequência as válvulas mitral e aórtica encontram-se fechadas, não havendo mudança no volume de sangue intraventricular. Esta fase é definida como fase de relaxamento isovolumétrico (seguento 3-4, figura 3). No instante em que a pressão intraventricular cair abaixo da pressão atrial, a válvula AV se abre e dá-se início a um novo ciclo cardíaco (Mohrman e Heller, 2007). Estas fases do ciclo cardíaco bem como suas características (tempo, velocidade de enchimento, velocidade de ejeção, dentre outros) podem ser analisadas mediante o emprego de ecodoplercardiografia. A

figura 4 é um registro original de um experimento típico com rato do grupo controle, onde demonstramos as diferentes fases do ciclo cardíaco.



Fonte: adaptado de Cingolani e Houssay, 2004.

FIGURA 3 - Representação gráfica do ciclo cardíaco (pressão – volume). 1 = contração isovolumétrica, 2 = ejeção, 3 = relaxamento isovolumétrico, 4 = enchimento diastólico.



Fonte: elaborado pelo autor

FIGURA 4 - Registro original de um experimento típico de ecocardiografia com rato do grupo controle, demonstrando as fases do ciclo cardíaco. ER = fase de enchimento rápida, EL = fase de enchimento lento, TC = tempo de contração isovolumétrica, TR = tempo de relaxamento isovolumétrico, FE = fase de ejeção.

1.1.4 Potencial de Ação Cardíaco

O potencial de ação é um fenômeno das células excitáveis, como as nervosas e as musculares, e consiste numa rápida despolarização, seguida por repolarização do sarcolema. Os potenciais de ação se constituem numa das modalidades de transmissão da informação no sistema nervoso e em todos os tipos de músculos (Costanzo, 2004).

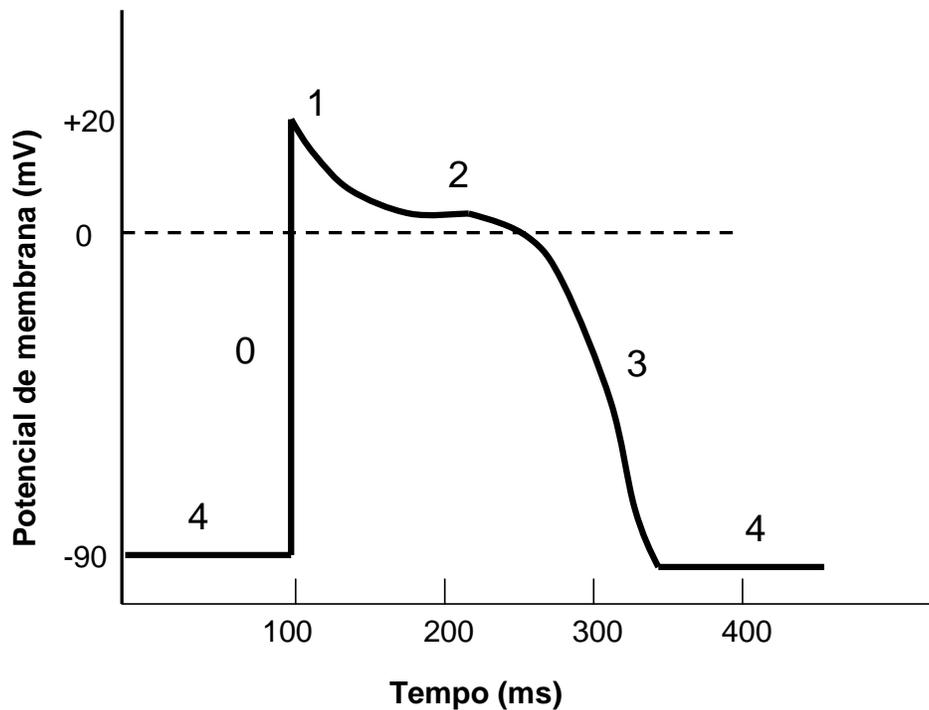
A excitação rítmica e sincrônica do coração deve-se ao fato de que neste existem algumas células que tem a propriedade de gerarem espontaneamente potenciais de ação atuando assim como marca-passo. Estes potenciais de ação se propagam de uma célula a outra, graças a baixa resistência elétrica dos discos intercalares. A velocidade de condução, a amplitude e a duração do potencial de ação é variável, depende da espécie e da região do coração que é excitada. Em humanos, a velocidade de condução do potencial de ação nos átrios é de 0,8 a 1 m/s enquanto que no músculo ventricular (sub endocárdio) a velocidade pode alcançar 1 m/s. A maior velocidade de condução ocorre no sistema de His Purkinje onde esta alcança 2 m/s. Nas fibras do nodo átrio-ventriculares a velocidade é de 0.005 m/s (Mangoni e Nargeot, 2008).

Os potenciais de ação da célula cardíaca são resultados de alterações transitórias da permeabilidade iônica da membrana celular. Porém os potenciais de ação das diferentes regiões do coração (ventrículos, átrios e Sistema de Purkinje), não são idênticos (Mohrman e Heller, 2007).

Como demonstrado na figura 4, os potenciais de ação de resposta rápida são caracterizados por cinco fases: despolarização rápida (Fase 0) a qual ocorre devido à abertura de canais rápidos de sódio, fazendo com que o potencial de membrana se aproxime do potencial de equilíbrio para o Na^+ ; repolarização transitória rápida (Fase 1), que deve-se principalmente ao efluxo de K^+ e inativação dos canais rápidos de sódio; uma fase de platô longo (Fase 2), onde o valor do potencial de ação se mantém relativamente constante, devido principalmente ao influxo de Ca^{2+} e efluxo de K^+ , a fase de repolarização (Fase 3),

que ocorre como consequência da inativação dos canais de cálcio e aumento da corrente de potássio de retificação retardada e a fase fase 4, devido a corrente de potássio retificadora de influxo (Mohrman e Heller, 2007).

As células do nodo sinusal geram espontaneamente potenciais de ação. . Como a frequência de potenciais de ação gerados nestas células é maior do que em qualquer outra, o nodo sinusal se constitui no marca passo primário do coração. Os potenciais de ação de resposta lenta são caracterizados por uma fase de despolarização inicial mais lenta (ocasionada por redução da condutância ao K^+ , aumento na condutância ao sódio e cálcio) seguida por uma fase na qual a velocidade de despolarização aumenta, como resultado do aumento da condutância ao cálcio. O pico de voltagem alcançado é menor do que os das células de potenciais de resposta rápidas. A fase de platô mais curta e menos estável, bem como a repolarização (devido a inativação dos canais de cálcio e ao aumento na condutância ao K^+) para um valor de potencial designado como potencial diastólico máximo. Com o transcorrer do tempo ocorre uma fase que se caracteriza por apresentar despolarização diastólica lenta. Portanto, como em todas as células excitáveis, os potenciais de ação da célula cardíaca resultam de alterações transitórias, principalmente na permeabilidade da membrana celular aos íons K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , que produzem as várias fases dos potenciais de ação de respostas rápida e lenta (Mangoni e Nargeot, 2008).



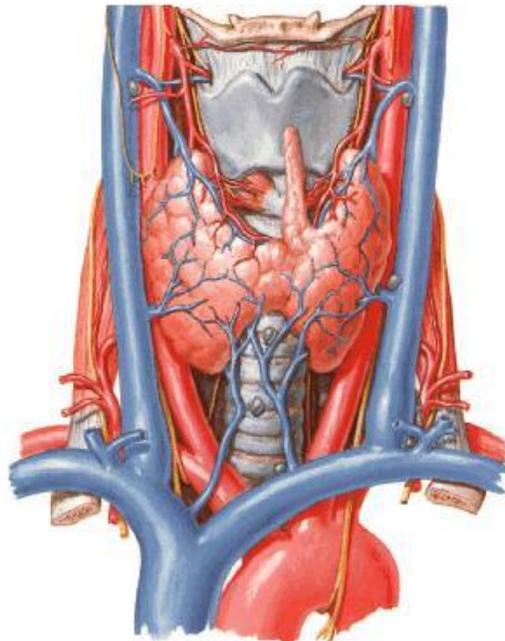
Fonte: adaptado de Cingolani e Houssay, 2004

FIGURA 5 – Representação esquemática do potencial de ação cardíaco.

O hormônio da tireóide afeta a frequência de geração bem como a duração do potencial de ação dos miócitos cardíacos através de mecanismos genômicos e não genômicos. No coração as células marca-passo estão localizadas no nodo sinoatrial. Os canais hiperpolarizantes, localizados nessas células tem sua transcrição regulada pelo hormônio da tireóide. Portanto no hipotireoidismo encontra-se a duração do potencial de ação mais prolongada que em eutireóideos (Sun et al., 2000).

Tireoide

A tireóide é uma glândula produtora e secretora dos hormônios T3 (triiodotironina), rT3 (triiodotironina reversa) e T4 (tetraiodotironina ou tiroxina). Está localizada na parte anterior do pescoço, possui dois lobos um direito e um esquerdo unidos por uma banda de tecido glandular denominado istmo (Figura 6). A produção e secreção hormonal é estimulada pelo hormônio estimulante da tireóide (TSH), proveniente da hipófise anterior. O TSH, por sua vez, é secretado pela estimulação da hipófise anterior pelo hormônio liberador de tireotrofina (TRH), proveniente do hipotálamo. Cada um desses hormônios está sob controle de retroalimentação negativa (*feedback negativo*), através das alças hipotálamo-hipófise-tireoide (Franklyn et al, 1991).



Fonte: Netter (1997)

FIGURA 6 - Representação e localização da glândula tireóide.

Os hormônios da tireóide exercem efeitos nos diferentes órgãos, sendo reguladores-chave do metabolismo, desenvolvimento e crescimento. (Cingolani, e Houssay, 2004; Molina, 2007). Grande parte dos hormônios tireoidianos secretados percorre a corrente sanguínea, ligado a proteínas. Existem três principais proteínas ligadoras: a globulina ligadora da tiroxina (TBG), a pré-albumina ligadora da tiroxina (TBPA) e a albumina; porém a TBPA e a albumina possuem afinidade muito menores do que a TBG (Devdhar, Ousman e Burman, 2007).

Os efeitos biológicos do T4 são em grande parte resultado de sua conversão intracelular em T3 (ou rT3) pela 5' desiodase, sugerindo que o T4 é um pró-hormônio e o T3 é a forma ativa do hormônio. Foram identificadas três isoformas de desiodases, a do tipo 1 (D1), a do tipo 2 (D2) e a do tipo 3 (D3) (Brent, 1994).

A enzima D1 está localizada na membrana celular e é encontrada predominantemente no fígado e rim humanos; a maior função é fornecer T3 para o plasma. A sua atividade está aumentada no hipertireoidismo e diminuída no hipotireoidismo. A enzima D2 encontra-se distribuída no retículo endoplasmático do músculo esquelético e cardíaco, sistema nervoso central (SNC), pele e hipófise; tem a sua atividade elevada no hipotireoidismo e diminuída no hipertireoidismo. Tanto D1 quanto D2 são capazes de gerar T3 (hormônio ativo) e 3,3-T2 (iodotironina inativa) a partir da desiodação do carbono 5 do T4 e rT3, respectivamente (Harvey e Willians, 2002). A terceira isoforma de desiodase, a D3, é muito expressa nos tecidos em desenvolvimento, placenta e no útero grávido; é também encontrada no SNC. Esta apresenta sua atividade elevada no estado de hipertireoidismo e diminuída no hipotireoidismo (Brent, 1994).

As ações dos hormônios da tireóide resultam principalmente da interação do T3 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., 1993).

1.2 Hipotireoidismo

O hipotireoidismo é uma patologia relativamente comum, resulta da redução da síntese dos hormônios tireóideos ou da ação destes nos tecidos periféricos. Na maioria dos casos essa patologia se dá devido à diminuição da síntese e secreção dos hormônios pela glândula tireóide. Como incidência, o hipotireoidismo, aumenta com a idade e é dez vezes mais comum nas mulheres que em homens. (Devdhar, Ousman e Burman, 2007).

O hipotireoidismo pode ser transiente ou permanente, central ou primário. O hipotireoidismo primário se refere à desordem na glândula tireóide, resultando na redução da síntese e secreção dos hormônios tireóideos. O hipotireoidismo central é caracterizado por desordens do eixo hipotalâmico-pituitária, levando a redução da secreção de TSH ou redução da atividade biológica deste. O central divide-se em secundário, caracterizando-se por desordem da glândula pituitária e o terciário onde a disfunção ocorre no hipotálamo. (Devdhar, Ousman e Burman, 2007).

O hormônio da tireóide atua em diversos tipos celulares. O indivíduo portador de hipotireoidismo apresenta manifestações em diversos sistemas e tecidos como:

➤ **Pele e anexos**

Achados típicos do hipotireoidismo incluem pele seca, pálida, às vezes amarela, o cabelo se torna grosso e frágil, a transpiração é reduzida. A presença de edema pré-tibial pode ser um achado para diagnosticar hipotireoidismo (Heymann, 1992).

➤ **Sistema Nervoso**

Sintomas como sonolência, lentidão no processamento de informação, problemas de memória, geralmente são achados do hipotireoidismo. Alguns estudos demonstram redução do fluxo sanguíneo cerebral e do metabolismo da glicose (Burmeister et al., 2001).

➤ **Sistema Respiratório**

A hipoventilação e a hipercapnia são complicações sérias do hipotireoidismo. Essas mudanças podem ocorrer devido à fraqueza dos músculos respiratórios. Esta patologia também pode cursar com ou agravar a apnéia do sono (Siafakas, Salesiotou e Filaditaki, 1992; Ladenson, Goldenheim e Ridgeway, 1988).

➤ **Sistema Gastrointestinal**

A constipação resulta da redução da motilidade intestinal e é um sintoma comum em pacientes portadores de hipotireoidismo. No hipotireoidismo como também em outras patologias autoimunes, há risco de anemia perniciosa e atrofia gástrica (Shafer, Prentiss e Bond, 1984).

➤ **Sistema Reprodutor**

A oligomenorreia ou a hipermenorreia podem estar presentes nessa condição patológica. Pacientes portadores de hipotireoidismo primário podem ter níveis séricos de prolactina elevados. Esses níveis de prolactina alterados podem ser decorrentes do aumento nos níveis de TSH que estimula a secreção de prolactina. Na condição de hipotireoidismo os níveis de TSH podem aumentar (por mecanismo de retroalimentação) na tentativa de melhorar a secreção e produção de TH. Hiperprolactinemia pode desenvolver hipogonadotrofismo e hipogonadismo, fatores esses que reduzem a fertilidade e aumenta o risco de aborto (Devdhar, Ousman, e Burman, 2007).

Os níveis de testosterona total em homens podem estar reduzidos no hipotireoidismo devido à redução nos níveis da globulina ligadora ao hormônio sexual (Devdhar, Ousman, e Burman, 2007).

➤ **Nutrição e Metabolismo**

No hipotireoidismo o metabolismo corporal está reduzido. O hormônio da tireóide aumenta a taxa metabólica basal em quase todos os tecidos e órgãos do

corpo, e aumenta a demanda metabólica levando a mudanças no débito cardíaco, resistência vascular periférica (RVP), e na pressão arterial. Essas mudanças são similares as respostas fisiológicas ao exercício (Danzi e Klein, 2003).

O hipotireoidismo é caracterizado por hipercolesterolemia, aumento de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e de apolipoproteína B, fatores esses que favorecem a aterosclerose (Klein e Danzi, 2007; O'Brien et al., 1993). A taxa metabólica basal e o consumo de oxigênio estão reduzidos, assim como a termogênese o que resulta a intolerância ao frio. Apesar da ingestão e o apetite reduzidos, o indivíduo portador de hipotireoidismo geralmente apresenta aumento de peso corporal devido ao acúmulo de gordura, retenção de água e sódio. O paciente apresenta também lentidão do *turnover* protéico, da biosíntese dos ácidos graxos e da lipólise (Devdhar, Ousman, e Burman, 2007).

O hipotireóideo ainda pode apresentar retenção de água e sódio (Hanna e Scanlon, 1997).

➤ **Sistema Cardiovascular**

Nas últimas décadas pesquisadores mostraram que o hormônio tireoidiano é essencial para o desenvolvimento e diferenciação muscular (Dieckman e Solaro, 1990). É reconhecido seu efeito no sistema cardiovascular e que mudanças nos níveis circulantes desse hormônio influencia a contratilidade e a função eletrofisiológica do coração (Klein, 1990). O TH também exerce importante papel na regulação de diversos parâmetros cardíacos como funções sistólica e diastólica, frequência cardíaca e débito cardíaco.

Em diversos modelos animais, correlação de parâmetros de performance cardíaca *in vivo* (velocidade de produção de força ou pressão bem como de relaxamento, tempo de contração isovolumétrica, tempo de relaxamento isovolumétrico, débito sistólico, débito cardíaco dentre outros) com dados experimentais obtidos em preparações isoladas, demonstram que o hormônio da tireoide participa da regulação da de genes responsáveis pela expressão da SERCA, NCX, MHC, canais de potássio e sódio, receptores dihidropiridínicos e rianodínicos, fosfolambano. O aumento do tempo de relaxamento isovolumétrico

bem como redução da velocidade de relaxamento, observado no hipotireoidismo, tem sido atribuído a uma menor expressão da SERCA e aumento do estado de fosforilação do fosfolambano. Contudo alterações nos níveis de expressão do NCX tem sido controverso. Estudos demonstram que no hipotireoidismo estes níveis poderiam estar aumentados (Reed et al., 2000; Cernohorsky et al., 1998) ou inalterados (Shenoy et al., 2001; Sepet et al., 1993).

Este hormônio também influencia a regulação da pressão arterial, através de alteração da resistência vascular sistêmica. Muitas dessas alterações são decorrentes de efeitos genômicos e não genômicos do hormônio da tireóide (Biondi e Klein, 2004; Biondi et al., 2002; Kahaly, 2000).

A avaliação da performance cardíaca, assim como as deficiências das funções sistólica e diastólica decorrente do hipotireoidismo, pode ser observada por intermédio de ecocardiograma (Di Paola et al., 2004; Kahaly et al., 1995; Grossmann et al., 1994). Em ratos observa-se o aumento do tempo de relaxamento isovolumétrico. Este prolongamento é provavelmente devido ao aumento do período diastólico precoce, sugerindo existir comprometimento do relaxamento ativo (Vitale et al., 2002; Kahaly et al., 1995).

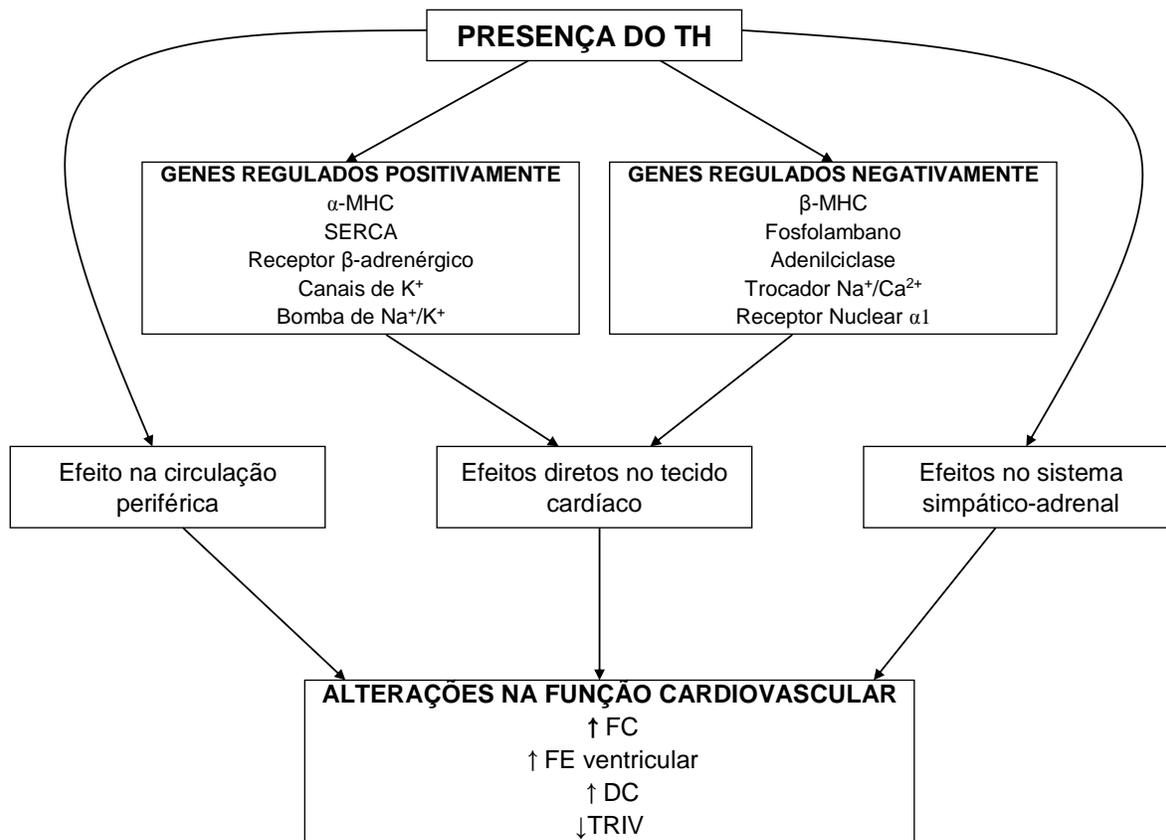
Há evidências de que a expressão genômica e fenotípica do coração são extremamente sensíveis ao hormônio da tireóide. Estudos *in vivo e in vitro*, sugerem que as alterações nos níveis do hormônio tireoidiano podem afetar a expressão gênica dos miócitos cardíacos e, conseqüentemente, alterar a função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

O Hormônio T3 também afeta o sistema simpatoadrenal, levando ao aumento da sensibilidade adrenérgica no coração, e aumento no consumo periférico de oxigênio resultando no aumento da contratilidade cardíaca (Polikar 1993). Portanto, mudanças na função da tireóide implicam em alterações cardíacas como débito cardíaco, volume de ejeção e resistência vascular sistêmica (Sahin et al., 2005; Fazio et al, 2004).

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, alteração da atividade do sistema nervoso

autônomo simpático e modificações hemodinâmicas periféricas, além dos efeitos extracelulares que são menos entendidos.

Em estudo realizado por Thomal (2007), utilizando análise da função cardíaca por ecocardiografia, eletrocardiografia, e mensuração de força em papilares intactos, foi possível observar alterações como aumento do tempo de relaxamento isovolumétrico; aumento do tempo de contração isovolumétrica; diminuição de frequência cardíaca e conseqüente alterações no débito cardíaco; aumento da resistência vascular periférica; diminuição das velocidades de contração e relaxamento.



Fonte: Adaptado de Machackova et al, 2005

FIGURA 7 - Representação esquemática do mecanismo de ação do T3.

1.2.1 Efeitos Genômicos

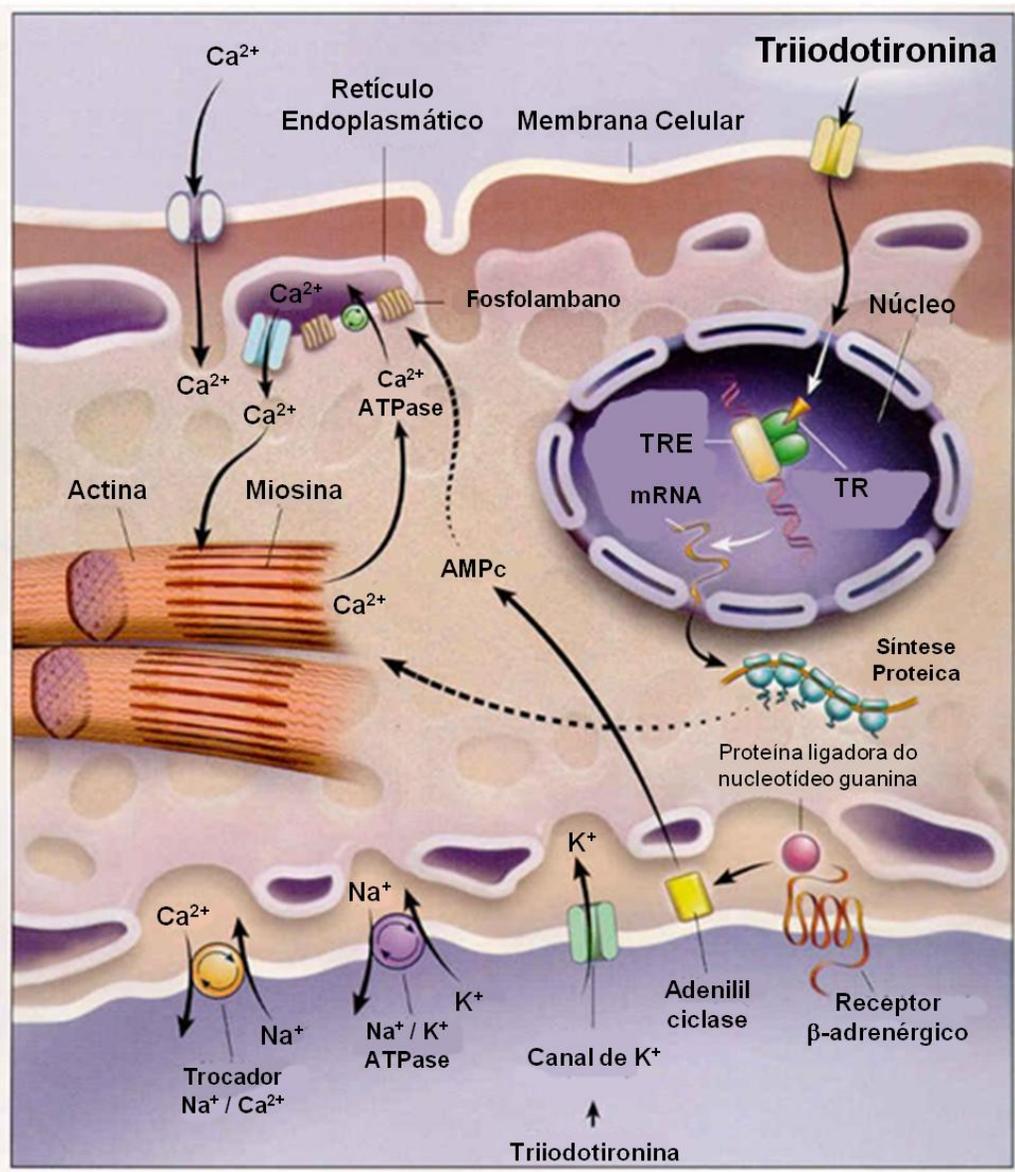
A ação dos hormônios tireoidianos é iniciada pelo transporte deste através da membrana por transportadores específicos. Recentemente foi identificado que a porção extracelular da integrina $\alpha_v\beta_3$ atua como receptor de membrana para o hormônio da tireóide (Cao, Kambe e Seo, 2006). Uma vez no interior do miócito o hormônio da tireóide interage com seu receptor (TRs). Existem quatro importantes isoformas de TRs (TR $\alpha 1$, TR $\alpha 2$, TR $\beta 1$, TR $\beta 2$) caracterizadas em humanos (Harvey e Willians, 2002). O complexo T3-TR liga-se a elemento de resposta a hormônio

tireoidiano (TREs) o qual são seqüências específicas de DNA (FIGURA 8). Durante esse processo, proteínas nucleares como co-repressoras e co-ativadoras são recrutadas ou excluídas pela interação T3-TR-TRE (Brent, 1994). Ocorre então mudança conformacional na cromatina através de acetilação e desacetilação das histonas, resultando na descompactação ou compactação da cromatina, regulando a acessibilidade de genes para a maquinaria transcricional (Boelaert e 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), Ca^{2+} - ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), 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 $\alpha 1$ e do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. (Gick et al., 1990; Ojamaa et al., 1999).

A modulação da taxa de transcrição de diversos genes ocorre pela ação do hormônio da tireóide no meio extranuclear dos miócitos cardíacos. Em curto prazo triiodotironina promove mudanças características na atividade de vários canais de sódio, cálcio e potássio, e mudanças nos níveis de cálcio e potássio que podem aumentar cronotropia ou inotropia (Walker et al., 1994).

Alterações nessas proteínas e no estado de fosforilação do fosfolambano contribuem para alterações das funções sistólica e diastólica (Kiss et al., 1994; Ojamaa, Kenessey e Klein, 2000).



Fonte: Klein e Ojamaa, 2001

FIGURA 8 - Mecanismos celulares de ação genômica do T3.

1.2.2 Efeitos não genômicos

Têm sido relatado alguns efeitos não-genômicos do TH. 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. Em experimentos realizados com miócitos cardíacos foi demonstrado que em cerca de 4 minutos, o T3 conduz o rápido recrutamento dos canais de inativação lenta de sódio. Ações extranucleares dos hormônios da tireóide não requerem a formação de um complexo nuclear. Quando comparadas às ações nucleares, os efeitos não-genômicos ocorrem mais rapidamente (Davis e Davis, 2002; Incerpi, 2005). Dentre os efeitos não-genômicos do TH estão:

➤ **Canal de sódio**

Os efeitos do hormônio T3 nos canais de sódio parecem ser mediados pela proteína cinase C (Davis e Davis, 2002). Dudley e Baumgarten (1993) mostraram abertura de canais de sódio decorrente da ação do hormônio T3. Estes utilizaram clampeamento de voltagem em células de ventrículo de coelhos, e adicionaram o hormônio T3. Trinta segundos após acrescentar o hormônio foi possível observar os efeitos da abertura desses canais.

➤ **Duração do potencial de ação: corrente de K⁺**

Em ratos hipotireóideos, Sun et al, demonstraram um aumento na duração do potencial de ação (APD) quando comparada com a de miócitos de animais eutireóideos (Sun et al. 2000).

No miócito cardíaco do rato, duas correntes de despolarização são importantes na regulação do potencial de ação: corrente transitória Ca²⁺ independente (I_{to}) — transiente outward current e corrente de K⁺ de inativação lenta — slowly inactivating K⁺ current (I_k). Esta ação não-genômica do T3, foi atribuída pelos investigadores a um efeito na corrente de potássio voltagem dependente (I_k) de inativação lenta, o qual é o principal contribuinte da

repolarização (Delmar et al., 1991). Isso indica que o efeito do T3 na duração do potencial de ação é obscuro devido à ampla contribuição do Ito para a duração do potencial de ação.

➤ **Atividade da Ca^{2+} ATPase sarcolemal**

Um estudo *in vitro* mostrou que a preparação de membrana miocárdica obtida de coelho e a exposição desta a L-tiroxina (LT4) promoveu um aumento na atividade Ca^{2+} ATPase sarcolemal. O aumento na atividade requereu a presença de calmodulina e foi também dependente de PKC (Rudinger et al., 1984; Mylotte et al., 1985).

1.2.3 Influência do sistema simpático-adrenal na função cardíaca

O sistema simpático-adrenal faz parte do sistema nervoso autônomo (SNA). O SNA constitui uns dos principais mecanismos corporais que contribuem para manutenção de um meio apto, constante e regulado. Este é dividido em simpático e parassimpático, os quais liberam pelas terminações das fibras pós-ganglionares, noradrenalina e acetilcolina respectivamente. Esses neurotransmissores exercem papel importante na regulação do funcionamento cardíaco. O sistema simpático também estimula a atividade secretória da medula da supra-renal, a qual libera adrenalina que exerce no músculo cardíaco efeitos sinérgicos aos efeitos diretos do sistema nervoso simpático (Cingolani e Houssay, 2004; Landowne, 2007).

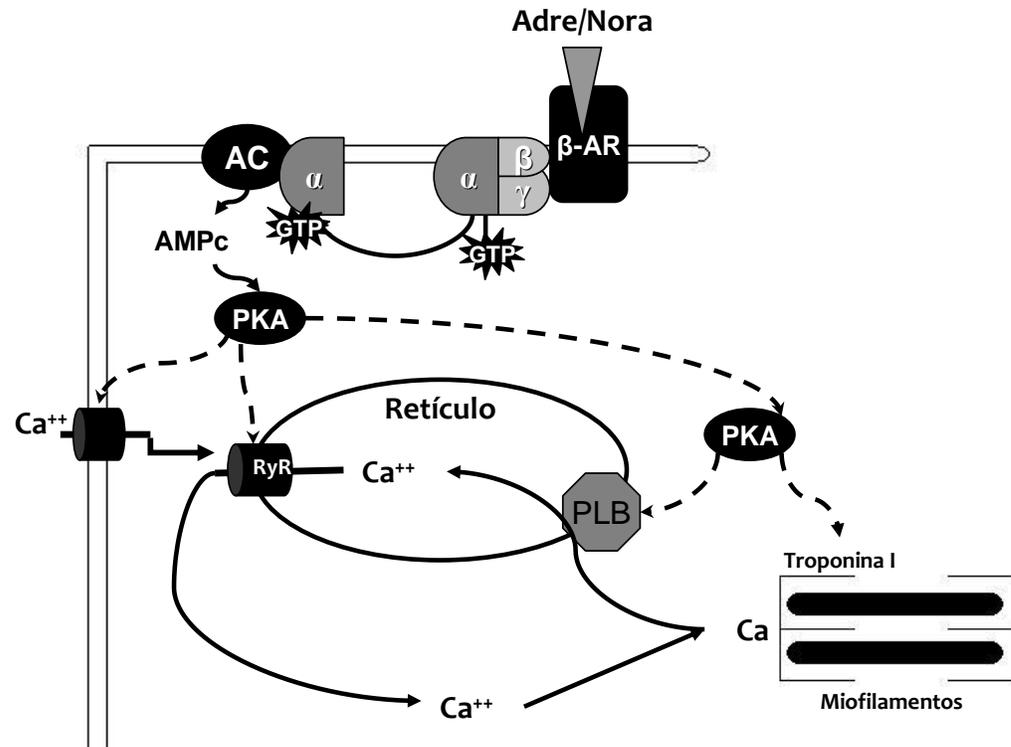
A estimulação simpática no coração através dos receptores β -adrenérgicos (noradrenalina) promove aumento da contração (inotropismo positivo) e acelera o relaxamento (lusitropismo positivo). Os receptores β -adrenérgicos são receptores acoplados a proteína ligadora de GTP, ou proteína Gs (Bers, 2002) e têm sua expressão e atividade alterada pelo hormônio da tireóide (Davis e Davis, 2002).

As proteínas G constituem uma família de proteínas heterotriméricas de ligação guanosina trifosfato (GTP) e são fundamentais para a ligação entre o primeiro evento, ocupação do receptor e o primeiro mensageiro, e a adenilato

ciclase (Lefkowitz, 1996). A proteína G consiste de três unidades associadas α , β e γ . As unidades β e γ atuam como uma única subunidade funcional. A subunidade α pode tanto estimular (α_s) como inibir (α_i). Na condição de repouso, a guanosina difosfato (GDP) está fortemente ligada a subunidade α . O acoplamento do primeiro mensageiro β -adrenérgico ao seu receptor ativa o sistema deslocando GDP pelo GTP. A subunidade estimulatória (α_s) de Gs se combina com GTP e, em consequência, se separa das duas outras subunidades para promover a atividade da adenilato ciclase e formação do AMPc (Molina, 2007). O AMPc formado a partir do ATP sob a influência da adenilato ciclase ativada, vai se constituir num segundo mensageiro (Cingolani e Houssay, 2004). Este segundo mensageiro ativa a proteína cinase A (PKA). Esta proteína fosforila diversas outras envolvidas no processo de contração muscular, como fosfolambano, canais de cálcio do tipo lento, receptores de rianodina, troponina I e proteína C ligadora de miosina (FIGURA 9).

A fosforilação do fosfolambano e da troponina I promove o aumento da recaptação de cálcio para o retículo e a dissociação do cálcio dos miofilamentos, respectivamente, o que desenvolve um efeito lusitrópico positivo. A recaptação de cálcio mais rápida faz com que haja maior disponibilidade deste no retículo o que pode promover também efeito inotrópico positivo e efeito cronotrópico positivo. (Bers, 2002).

Ainda o AMPc aumenta a atividade dos canais I_f , despolarizando as células do nodo sinusal mais rapidamente e aumentando assim, a frequência cardíaca. A noradrenalina encurta a duração do potencial de ação fazendo com que os canais de potássio se abram mais rapidamente. O número de canais do tipo lento aberto pela noradrenalina também é aumentado. Os efeitos da noradrenalina, nesses canais, são mediados pela PKA e o resultado final é o aumento no influxo de cálcio e, conseqüentemente, um efeito inotrópico positivo (Landowne, 2007).



Fonte: adaptado de Bers, 2001

FIGURA 9 – Via de sinalização β -adrenérgica.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar, empregando-se técnicas *in vivo* e *in vitro*, os efeitos do hipotireoidismo na atividade elétrica e mecânica cardíaca e no sistema vascular de ratos Wistar.

2.2 Específicos

Empregando-se animais eutireóides e hipotireóides, os objetivos específicos deste estudo foram:

- Quantificar, mediante emprego de ecocardiografia, parâmetros de performance cardíaca (fração de ejeção, volume sistólico, volume diastólico final, débito sistólico, índice de Tei, tempo diastólico total e tempo de relaxamento isovolumétrico).
- Aferir, por método direto, os níveis de pressão arterial sistólica e diastólica.
- Examinar, mediante eletrocardiografia, alterações na atividade elétrica miocárdica.
- 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 de relaxamento (-df/dt), potenciações pós pausas (1, 3, 5, 10 e 20 segundos) e força *versus* diferentes concentrações extracelular de Ca^{2+} (0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 5,0 e 10 mM)
- Avaliar em músculos papilares permeabilizados com saponina, os efeitos do hipotireoidismo no tempo de recaptção e liberação de cálcio do RS.
- Avaliar, em músculos papilares isolados e quiescentes, a contribuição do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ para o tempo de relaxamento, após contração induzida pela cafeína em solução na qual se substituiu isotonicamente, o Na^+ e Ca^{2+} pelo LiCl.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo experimental foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 250-350 g, fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, e mantidos em gaiolas sob condições de controle de temperatura e um ciclo claro-escuro de 12 horas (8 da manhã às 8 da noite período claro – 8 da noite às 8 da manhã período escuro), tendo livre acesso à ração. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA - 220), do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Os animais foram divididos ao acaso em dois grupos: um grupo experimental e um grupo controle. No grupo experimental, o hipotireoidismo foi induzido pela administração de metimazol na água de beber (20 mg/100 mL), durante 4 semanas (Sala-Roca et al., 2002). Esta solução foi renovada a cada três dias. Os animais de ambos os grupos tiveram livre acesso a ração e água.

Os dois grupos de animais (experimental e controle) foram utilizados para avaliação ecocardiográfica, seguida da avaliação eletrocardiográfica, mensuração da pressão arterial e avaliação da contratilidade de músculos papilares isolados eletricamente estimulados. Outros 4 grupos (2 experimentais e 2 controles) foram empregados, 2 (experimental e controle) para avaliação da contribuição do trocador NCX no relaxamento de papilares isolados quiescentes e 2 (experimental e controle) para a avaliação da capacidade de carregamento do retículo sarcoplasmático com íons cálcio (experimentos de fibras permeabilizadas com o uso de saponia).

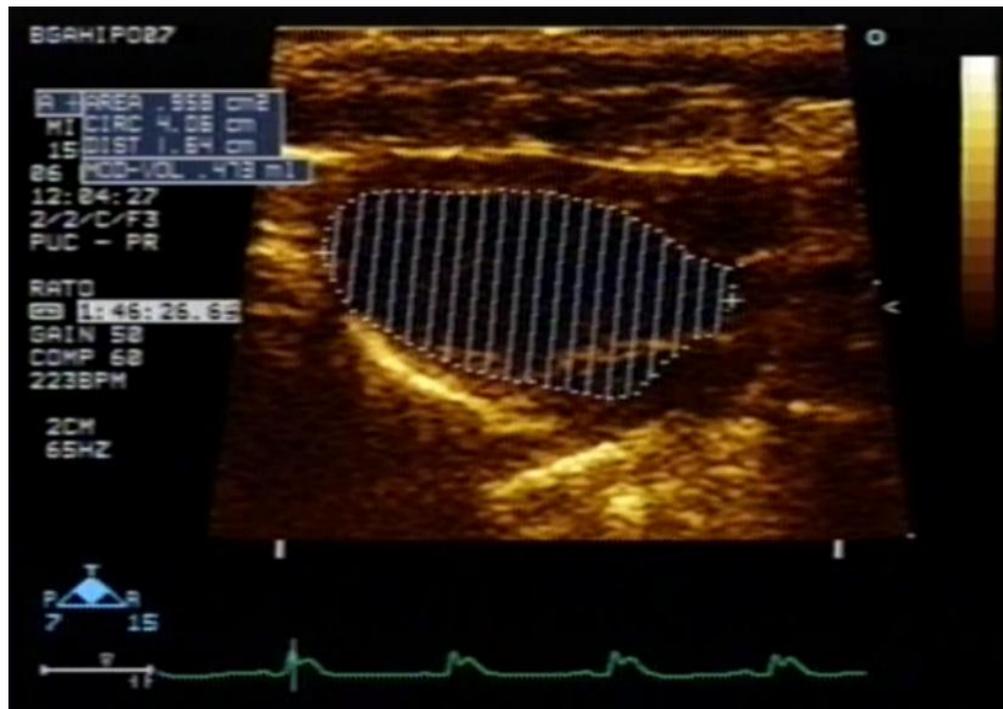
Para avaliação ecocardiográfica os animais dos grupos experimentais e controle foram randomicamente selecionados sem que o avaliador soubesse a condição experimental de cada um deles. Essa avaliação foi realizada no Laboratório de Técnica Operatória da Pontifícia Universidade Católica do Paraná pelo Prof. Dr. Nelson Itiro Miyague. Em seguida os animais foram submetidos à avaliação da atividade elétrica cardíaca por eletrocardiografia. Após foi realizada a mensuração da pressão arterial e experimentos para mensuração de parâmetros de contratilidade do músculo papilar isolado.

3.1 Avaliação da função cardíaca por ecocardiografia

Os animais foram submetidos à anestesia geral com cloridrato de ketamina 50 mg/kg e cloridrato de xilazina 20 mg/kg, e tricotomizados. Foi utilizado um equipamento de ecocardiografia bidimensional modelo Sonos 5500 (Hewlett Packard, USA), com transdutores setorial S12 (5-12 MHz) e limiar 15L6 (7-15 MHz). Cada parâmetro foi mensurado, em cada animal, no mínimo 3 vezes:

Area diastólica (cm²), área sistólica (cm²): as áreas são calculadas assumindo que a cavidade ventricular possui um formato elipsóide. A cavidade é demarcada pelo avaliador conforme demonstrado na figura 10, a qual é uma imagem original de um experimento típico.

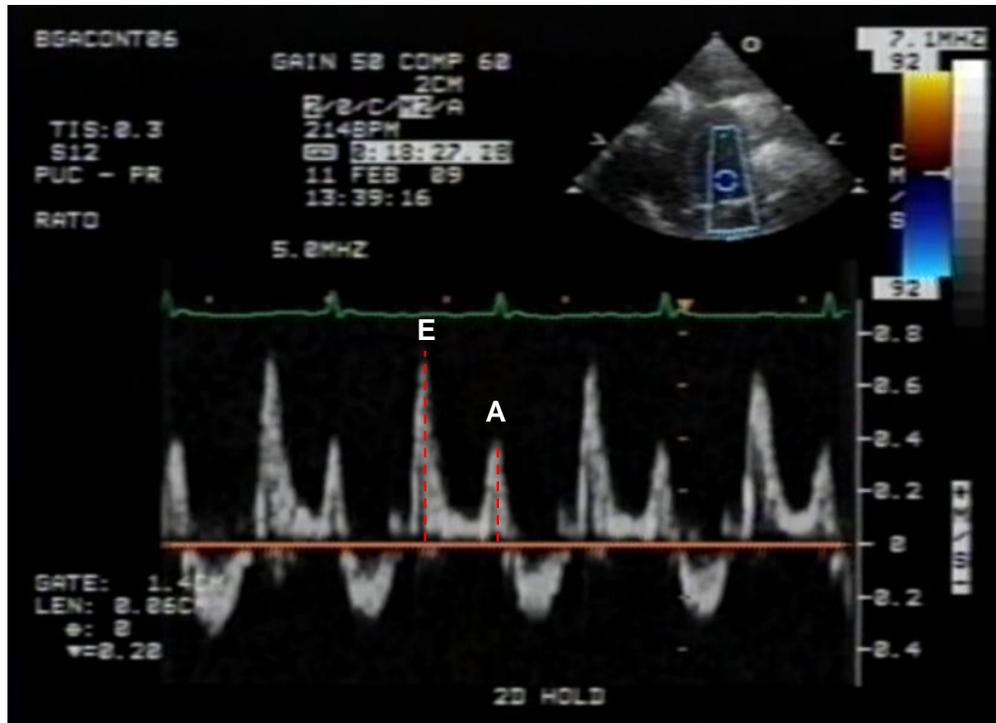
Volume diastólico final (mL), volume sistólico final (mL): Mediante a análise da posição das válvulas de admissão (mitral) e de saída (aórtica) delimitou-se o início da fase de contração isovolumétrica. Nesta fase ambas as válvulas encontram-se fechadas. Assim, utilizando o método de Simpson (Wyat, 1980) é possível calcular o volume diastólico final. Este método calcula os volumes assumindo que o ventrículo esquerdo seja formado por diversos segmentos com espessura e área transversa conhecida. O volume da cavidade será igual à soma dos diversos volumes dos segmentos, como demonstrado na figura 10. Após a fase de ejeção ventricular e anteriormente ao início da fase de enchimento ventricular, portanto quando as válvulas mitral e aórtica se encontravam fechadas, mensurou-se a área sistólica e calculou-se o volume sistólico. Assim, conhecendo-se o volume diastólico final e o volume sistólico do ventrículo esquerdo, é possível calcular o débito sistólico e a fração de ejeção, servindo cada animal como seu próprio controle. A fração de ejeção é expressa como o percentual do volume diastólico total que é ejetado pelo ventrículo esquerdo, em um ciclo cardíaco. O débito sistólico obtém-se subtraindo do volume diastólico final, o volume sistólico.



Fonte: registro original de ecocardiografia de um rato hipotireoideu (numero 7) do dia 11 de Fevereiro de 2009.

FIGURA 10 – Imagem ecocardiográfica de um rato hipotireoideu, demonstrando o procedimento para obtenção do volume diastólico final.

Onda E (m/s), onda A (m/s): o fluxo sanguíneo transmitral normal apresenta duas ondas, uma que resulta do enchimento rápido (onda E) e outra, mais tardia e que é dependente da sístole atrial (onda A). Estas duas ondas estão demonstradas na imagem ecocardiográfica da figura 11.



Fonte: registro original de ecocardiografia de um rato (número 6) do grupo controle do dia 11 de fevereiro de 2009.

FIGURA 11 - Imagem ecocardiográfica do coração de um rato, demonstrando as ondas E e A.

Tempo sistólico total (s): intervalo de tempo mensurado a partir do fechamento da válvula atrioventricular esquerda até o fechamento da válvula aórtica

Tempos diastólicos: o tempo diastólico total foi mensurado como o intervalo de tempo transcorrido a partir do momento do fechamento da válvula aórtica (término da fase de ejeção ventricular) passando pela fase de enchimento ventricular até o momento da abertura da válvula aórtica. Subtraindo-se deste intervalo de tempo, o tempo transcorrido do fechamento da válvula aórtica à abertura da válvula mitral (o qual corresponde ao tempo de relaxamento isovolumétrico), obtem-se o tempo diastólico.

Tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) (s): corresponde ao intervalo de tempo entre o fechamento da válvula aórtica (final da fase de ejeção) e abertura da válvula atrioventricular esquerda (início da onda E), sendo um indicador da distensibilidade do ventrículo esquerdo.

Tempo de contração isovolumétrica (TCIV) (s): O TCIV é medido por ecocardiograma como o tempo decorrido entre o fechamento da válvula mitral (final da onda A) e abertura da válvula aórtica (início da fase de ejeção). Para frequências cardíacas elevadas, pode-se estimar o TCIV subtraindo-se do tempo sistólico, ou seja, o intervalo de tempo transcorrido entre o fechamento da válvula mitral (final da onda A) e fechamento da válvula aórtica (final da fase de ejeção), o tempo transcorrido entre a abertura da válvula aórtica até o seu fechamento (tempo de ejeção ventricular).

Índice de Tei: o índice de Tei (Tei et al., 1995) é obtido subtraindo-se do intervalo de tempo transcorrido entre o fechamento da válvula atrioventricular esquerda até a sua abertura, o tempo de ejeção (intervalo de tempo transcorrido a partir da abertura da válvula aórtica até o seu fechamento) e o resultado dividido pelo tempo de ejeção ventricular, ou seja, é a soma do tempo de contração isovolumétrica ao tempo de relaxamento isovolumétrico dividido pelo tempo de ejeção. Este índice é, portanto, útil, já que existe correlação entre os tempos de contração e de relaxamento isovolumétricos com os valores máximos de pressão intraventricular medida nestas duas fases do ciclo cardíaco com o emprego de métodos diretos (transdutores de pressão). Assim, um aumento nos valores deste índice denota, indiretamente, comprometimento ventricular global (sistólico e/ou diastólico), sendo uma ferramenta importante na avaliação global do desempenho cardíaco (Tei et. al., 1995).

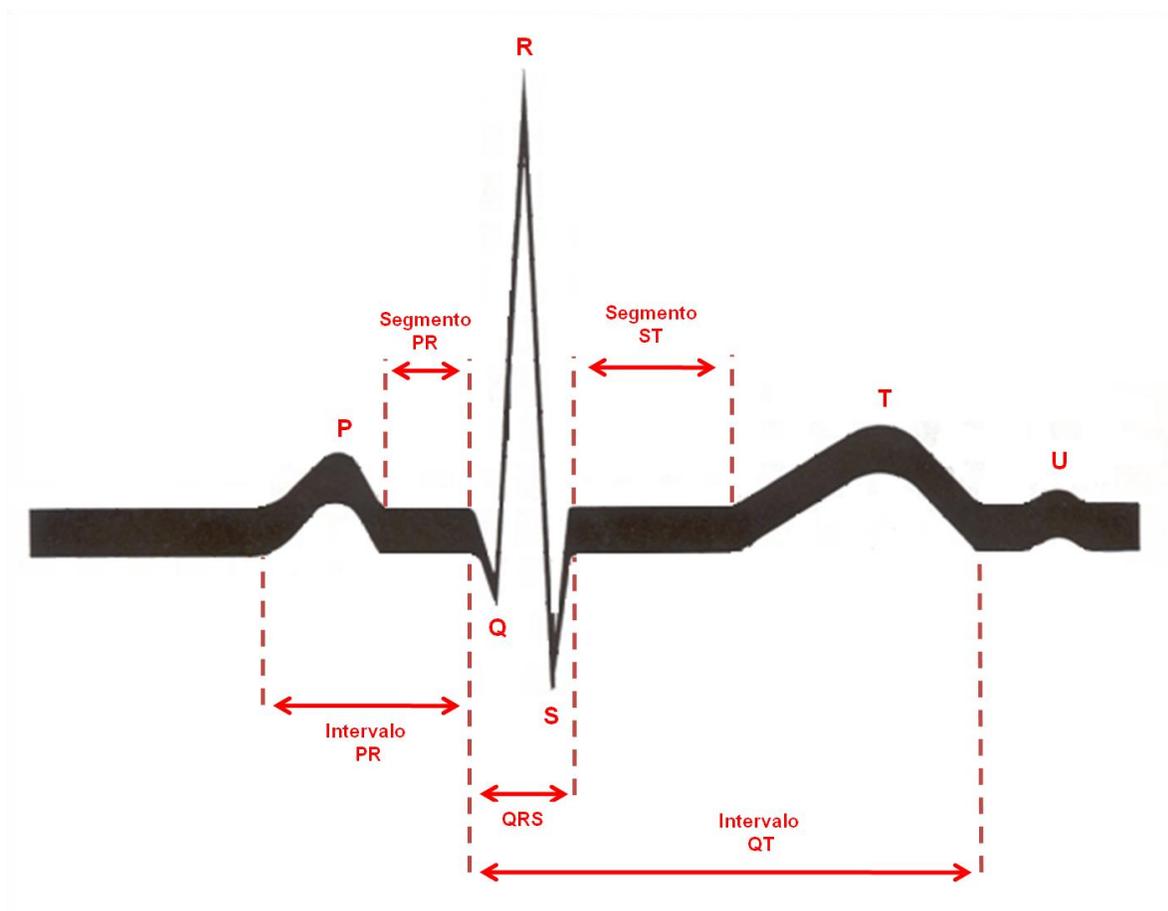
Débito Cardíaco: Foi calculado multiplicando o débito sistólico pela frequência cardíaca.

Frequência cardíaca (bpm): foi mensurada como o inverso do período transcorrido entre dois picos subseqüentes do complexo QRS.

3.2 Avaliação da atividade elétrica do coração mediante eletrocardiografia

Para análise da atividade elétrica do coração dos animais, foi utilizado eletrocardiógrafo Mikromed ER 661 (Hungria). Os animais foram previamente anestesiados, posicionados em decúbito dorsal e eletrodos subcutâneos foram inseridos para obtenção das derivações convencionais DI, DII, DIII, AVR e AVL.

Nos traçados eletrocardiográficos foram calculados os intervalos e segmentos mostrados na figura 12.



Fonte: adaptado de Scheidt, 1986.

FIGURA 12 – Imagem representativa dos intervalos e segmentos de um eletrocardiograma.

3.3 Experimentos de mensuração da pressão arterial (*in vivo*)

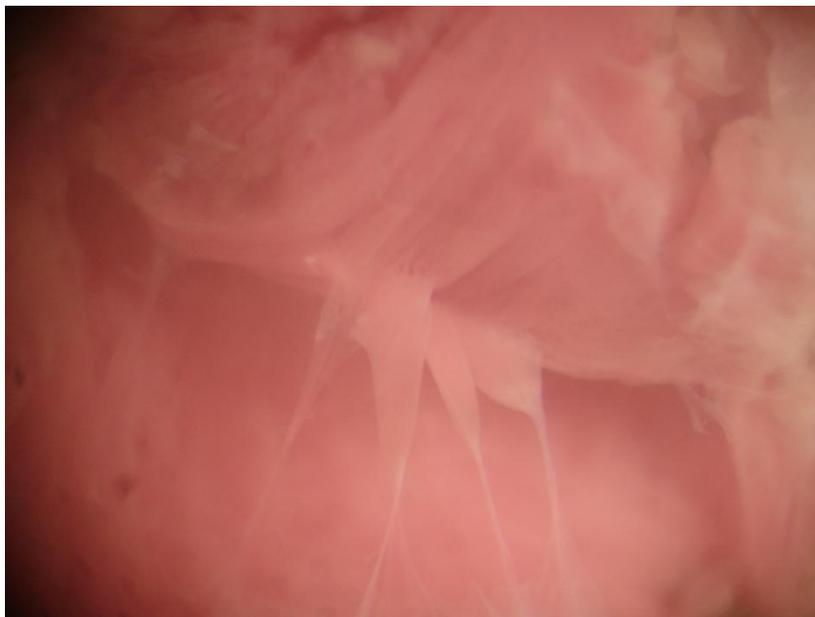
Os animais foram heparinizados (500 UI, i.p.) e anestesiados com cloridrato de xilazina (20mg/Kg) e cloridrato de cetamina (50mg/kg). Após a verificação de falta de resposta a estímulo doloroso na raiz da cauda e nas orelhas, e da ausência de reflexos pupilares e palpebrais foi iniciado o procedimento cirúrgico. Os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica, fixando-se as patas em uma base de madeira. Inicialmente, realizou-se uma incisão na pele na linha média na região do pescoço, expondo os músculos esternocleidomastóideo e esternohióideo. Com a utilização de uma pinça realizou-se a dissecação dos músculos para encontrar a artéria carótida comum e o nervo vago. A seguir, a artéria carótida e o nervo vago foram isolados. Comum fio, foi realizada uma ligadura na região cefálica da artéria com a finalidade de obstruir o fluxo sanguíneo. Na região distal da carótida foi posicionado outro fio, cujas suas extremidades foram tracionadas com uma pinça hemostática para obstruir o fluxo sanguíneo temporariamente. Com uma tesoura oftalmológica realizou-se uma secção parcial da artéria em um ângulo de 45° para introduzir do catéter (*Angiocath 22GAX1.00 IN (0,9x 25 mm) BD ®*, previamente heparinizado. Após a introdução de aproximadamente 1 cm do cateter, o mesmo foi fixado com o fio posicionado distalmente. O catéter foi acoplado a um transdutor de pressão (NARCO BioSystem, Houston, Texas) conectado a um polígrafo para registro e também a um conversor Analógico-Digital-Digital Analógico (*DATA TRANSLATION - AT 2801-A*) — acoplado a um computador. Em todas as mensurações aguardou-se a estabilização dos níveis de pressão arterial por um tempo de aproximadamente 30 minutos. A calibração do transdutor foi realizada antes de iniciar o registro da pressão arterial em todos os experimentos. Após a coleta dos dados, a cânula foi desconectado do transdutor de pressão e procedeu-se à colheita de sangue arterial o qual mantido em frasco (VACUETTE). Estes foram identificados e encaminhados ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da UFPR para mensuração dos níveis plasmáticos de T3, T4 e TSH.

3.4 Dosagem Hormonal

As concentrações dos hormônios tireoidianos plasmática dos dois grupos foram determinados pelo *IMMULITE 2000 Analyser Total T4, T3* — imunoensaio competitivo de fase sólida, de enzimas químico-luminosas e TSH-ensaio imunométrico em fase sólida quimioluminescente de duas voltas, realizado no Setor de Hormônios do Laboratório do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

3.5 Experimentos com músculo papilar isolado intacto

Após a mensuração da pressão arterial e coleta de sangue, foi realizada a toracotomia nos animais. Os corações foram removidos rapidamente e colocados em um copo de 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; TRIZMA=10 e glicose=11, com pH=7,4, procedendo-se a seguir, a pesagem do órgão. Na sequência, o coração foi colocado e fixado em uma placa de Petri, contendo solução de Ringer previamente oxigenada. Procedeu-se a abertura de ambos os ventrículos e com o uso de um estereó microscópio, realizou-se a dissecação cuidadosa dos músculos papilares (FIGURA 13).



Fonte: microfotografia original demonstrando músculos papilares do ventrículo direito de rato (número 3) do grupo controle.

FIGURA 13 - Imagem demonstrativa dos músculos papilares de ratos.

Tendo-se removido o músculo papilar, este foi colocado em uma placa de Petri contendo solução Ringer e suas extremidades foram fixadas, mediante o emprego de duas argolas, uma a uma posição estacionária de um micromanipulador e a outra, a um transdutor de força (WPI-Fort 10, *Transuction Laboratories Co.*). A preparação foi então transferida para uma câmara com capacidade para 15 ml, continuamente oxigenada e mantida 32 °C.

Os músculos foram estimulados com pulsos supralimíares de voltagem (10 a 15 V) duração no máximo cinco 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 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 60 minutos e, em seguida, realizados os protocolos experimentais. A força

desenvolvida foi registrada continuamente em papel mediante o emprego de um polígrafo *Lafayette Instrument Company*, Indiana, USA e também digitalizadas, mediante o emprego de um conversor A/D (DataTranslation- 2801 A) e os dados armazenados em um computador para posterior análise.

Foram analisados os seguintes parâmetros contráteis: máxima força isométrica desenvolvida (F); tempo necessário para atingir 50% da contração e 50% do relaxamento (T_{50}); potenciação da contração isométrica (PR) obtida após pausas na estimulação elétrica de 1, 3, 5, 10 e 20 segundos; velocidades máximas de contração e de relaxamento (df/dt).

Antes de cada experimento foi realizada a curva de calibração do transdutor de força obtida com massas conhecidas (padrão). Mensuraram-se, com o uso de uma grátula posicionada na ocular do estéreo microscópio, o diâmetro e o comprimento da preparação. No final de cada experimento, os músculos papilares foram 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 1,06.

Assim, a força produzida pelos músculos papilares está normalizada pela sua área de secção transversa.

3.5.1 Protocolos experimentais

➤ Produção de Força em Diferentes Concentrações extracelulares de Cálcio

Com a finalidade de avaliar o efeito da diminuição dos hormônios T3 e T4 ou da redução de sua ação sobre as intervenções inotrópicas foram realizados os seguintes estudos: após período de estabilização, foi avaliada a dependência do desenvolvimento da força de contração isométrica (F) dos músculos papilares, e as

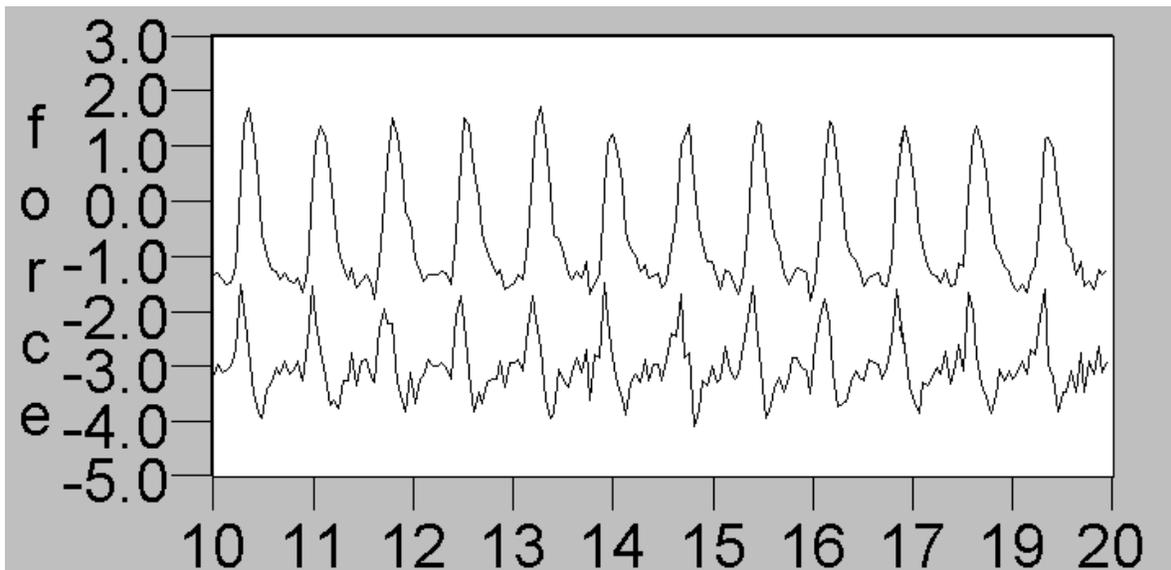
alterações da concentração extracelular de cálcio $[Ca^{2+}]$ (0,50; 1; 2; 3; 5 e 10 mM), na solução de Ringer.

➤ **Potenciação pós pausa**

Após a estabilização da preparação, cessou-se a estimulação elétrica dos papilares isolados por um período de 1, 3, 5, 10 e 20 segundos. A amplitude da primeira contração após este período 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.

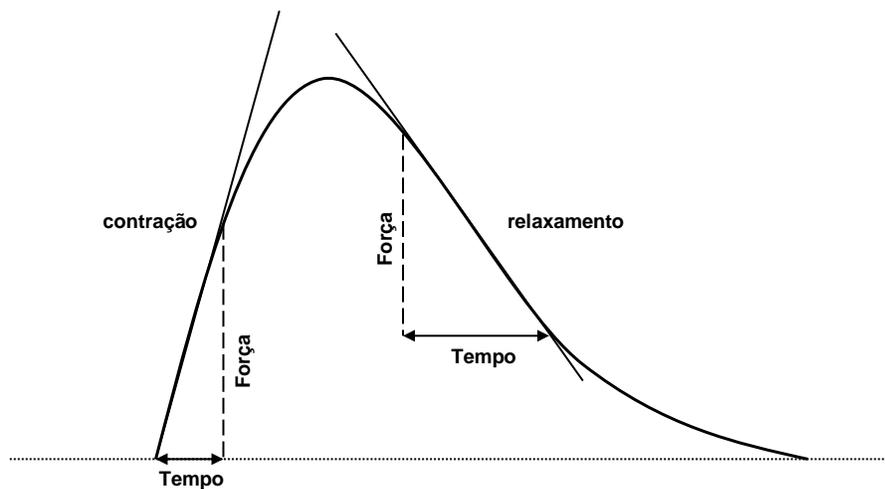
➤ ***Velocidade de Contração e de Relaxamento***

A velocidade máxima de produção de força ($+df/dt$) e a velocidade máxima de relaxamento ($-df/dt$), foram calculadas em tempo real empregando-se o programa de computador LABTECH, o qual foi utilizado para processamento, aquisição e análise dos dados (figura 14). Também procedeu-se a análise dos dados traçando-se uma tangente no registro de força obtido durante a fase da contração e de relaxamento, respectivamente. Neste caso, e com o objetivo de termos uma melhor resolução temporal da produção de força, aumentamos a velocidade de deslocamento do papel de 1 mm/seg para 25 mm/segundo conforme demonstrado na figura 15. Mensurou-se a velocidade de contração ou de relaxamento, tomando-se um intervalo de tempo onde foi obtida a maior variação de força. Os dados estão expressos em força produzida (mN) por área de secção transversa do músculo por segundo ($mN/mm^2/seg$).



Fonte: registro original de um experimento típico com papilar eletricamente estimulado.

FIGURA 14 - Representação do registro experimental através do labtech.

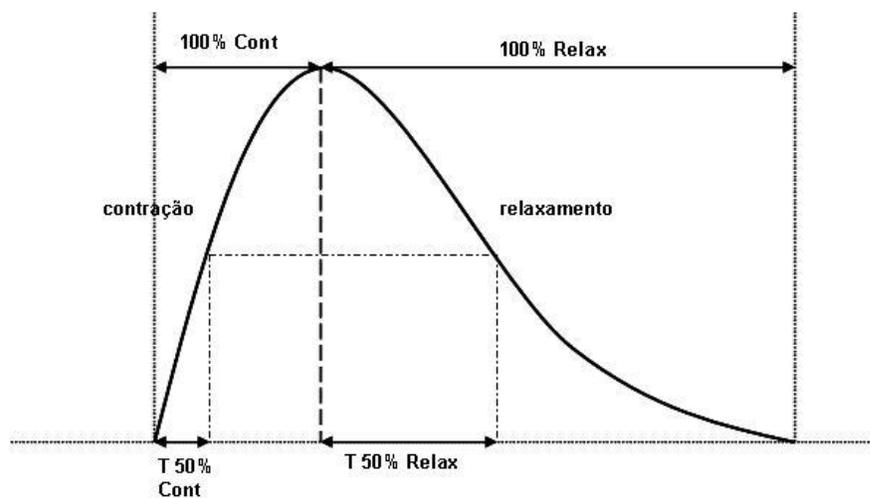


Fonte: elaborado pelo autor

FIGURA 15 - Representação do método de análise da velocidade de contração e de relaxamento.

➤ **Tempo Necessário para Atingir 50% de Força e 50% de Relaxamento**

O tempo necessário para produção de 50% da força máxima e para atingir 50% do relaxamento foi calculado conforme mostrado na figura 16. Inicialmente mensurou-se a máxima produção de força, e a seguir mediu-se o tempo necessário à obtenção de 50 % deste valor.



Fonte: elaborado pelo autor

FIGURA 16 - Representação do método de análise do t_{50} .

➤ **Participação do Trocador Na^+/Ca^{2+}**

Para dissecação e montagem dos papilares na câmara foram utilizados os mesmos procedimentos descritos no ítem 3.5. Porém nesse protocolo os papilares não foram estimulados eletricamente e a câmara que contém solução onde o papilar é banhado, tem capacidade para 2,5 ml de solução.

Para a realização deste protocolo foram utilizadas três câmaras contendo diferentes soluções. A primeira foi utilizada à solução de Ringer a qual já foi

descrita anteriormente. Na segunda câmara utilizamos a solução de Ringer $0\text{Na}^+ 0\text{Ca}^{2+}$. Esta solução é preparada substituindo-se 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 normal. A última câmara continha a 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 (Endo, 1975).

Para avaliação da participação do NCX foi utilizado o seguinte protocolo:

A preparação foi inicialmente banhada em solução Ringer normal por no mínimo 30 minutos e a seguir esta foi transferida para solução de 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 ocorreu entre 5 e 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. Manteve-se a preparação nesta solução até que um novo estado estacionário de força fosse alcançado para, em seguida, retorná-la a uma solução de Ringer normal ou a solução de Ringer $0\text{Na} 0\text{Ca}$ na ausência de cafeína.

Para avaliar a participação do NCX foi calculado o tempo de relaxamento como mostrado na figura 16. Para avaliarmos a contribuição do NCX no tempo de relaxamento (50 e 100 %), subtraímos do tempo de relaxamento da preparação em Ringer $0\text{Na} 0\text{Ca}$, o tempo de relaxamento obtido em solução de Ringer normal. Os dados foram então normalizados como percentual de contribuição do NCX para o relaxamento.

3.6 Experimentos com fibras permeabilizadas *com saponina*

Para a obtenção e dissecação das preparações, procedeu-se conforme descrito no item 3.5. Os papilares dissecados foram transferidos para uma placa de Petri contendo a Solução R (Tabela 1). Esta solução tem a propriedade de quelar o cálcio, induzindo ao relaxamento total das fibras e, permitir a realização da dissecação das trabéculas sem risco de laceração de tecido. As extremidades das trabéculas de músculo permeabilizado, foram montadas entre 2 fórcepes, sendo uma extremidade conectada a um transdutor de força isométrica (Scientific Instruments, GMHB, Heidelberg, Alemanha) e, a outra extremidade conectada a um micromanipulador. Os registros gráficos foram realizados usando um polígrafo modelo RB 1020; Equipamentos Científicos do Brasil. As trabéculas foram estiradas até 20% do comprimento do músculo na condição de relaxamento. As soluções experimentais foram adicionadas a cada uma de uma série de câmaras denominadas de câmaras com capacidade de 2,5 ml. Tais câmaras foram encaixadas numa base acrílica e mantidas sob constante agitação mediante barras de aço inoxidável imantadas.

As trabéculas foram transferidas e mantidas, por 20 minutos, em uma câmara contendo a mesma Solução R acrescida de saponina (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Após a permeabilização por saponina, as trabéculas eram transferidas para outra câmara contendo Solução R sem saponina.

A saponina atua interagindo com moléculas de colesterol presentes na bicamada lipídica do sarcolema e no sistema tubular transversal, ocasionando remoção seletiva desse lipídio promovendo perfurações na membrana (Launikonis e Stephenson, 1997). Dessa forma essas estruturas são seletivamente permeabilizadas preservando, além das proteínas do sistema contrátil, o RS e suas estruturas de membrana.

Através desse método é possível avaliar a participação da SERCA no processo de contração e relaxamento do músculo cardíaco. Para tal avaliação foi realizado o seguinte protocolo: a trabécula mantida na Solução R foi transferida para outra câmara contendo a Solução L. A Solução L apresenta uma

concentração de íons Ca^{2+} suficiente para, mediante transporte ativo realizado pela SERCA, realizar o carregamento dessa organela. Avaliou-se o tempo de carregamento dessa organela, mantendo-se as preparações nesta solução por 5, 30, 60 e 120 segundos.

Após o carregamento a preparação foi transferida para outra câmara contendo a Solução E. A solução E (pCa 8,5) apresenta uma concentração de íons Ca^{2+} inferior a 10^{-8}M . Como a concentração de EGTA é baixa (0,5 mM), sua capacidade de tamponamento de íons Ca^{2+} é pequena. Portanto quando a liberação de íons Ca^{2+} pelo RS é efetuada, este íon (por não ser tamponado) ativará o sistema contrátil, o qual desenvolverá tensão. O nível de tensão produzida fornecerá um indicativo da quantidade de Ca^{2+} liberado do RS.

Em seguida a preparação é transferida para uma câmara contendo Solução E na qual adicionou-se cafeína (30 mM). Dessa forma é possível avaliar a produção de força decorrente do carregamento do RS em diferentes tempos. Na sequência a preparação foi transferida para uma câmara contendo solução R. No final do experimento realizou-se a ativação máxima do sistema contrátil com íon cálcio transferindo-se a preparação para uma câmara contendo solução A (pCa 4,0). A força produzida pelas preparações quando de sua exposição à cafeína, foi normalizada para a força produzida em pCa 4.

3.6.1 Soluções

Para se realizar o cálculo da composição das soluções foi utilizado um programa de computador que descreve as múltiplas constantes de equilíbrio de íons em solução usando valores constantes de associação previamente publicados (Godt e Lindley, 1982). As composições das soluções são apresentadas na Tabela 1.

	Solução R	Solução L	Solução E	Solução A
Mg ²⁺ (mmol/L)	1	1	1	0,1
MgATP (mmol/L)	1	1	1	1
NaCP (mmol/L)	15	15	15	15
EGTA (mmol/L)	5	5	0,5	5
BES	50	50	50	50
pCa (-log[Ca ²⁺])	>8,5	6,4	>8,5	4,0
pH	7	7	7	7
Força iônica	200	200	200	200
Temperatura (°C)	22	22	22	22

TABELA 1 - Composição das soluções usadas nos experimentos com fibras permeabilizadas por saponina. NaCP, Na₂phosphocreatine; BES, N,N-Bis (2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid; pCa = -log[Ca²⁺]₀; e pH = -log [H⁺].

As soluções descritas na tabela 1 tem concentrações de 0,5 mM e 5 mM de EGTA (ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) que é um agente com capacidade de tamponar íons Ca²⁺ da solução (Godt & Lindley, 1982).

3.7 Análise estatística

Os dados, foram considerados estatisticamente diferentes quando a probabilidade de ocorrência da hipótese nula foi igual ou inferior a 5% (p < 0,05). Para comparação de uma única condição experimental em relação ao controle, no mesmo experimento, empregou-se o teste t de Student pareado e entre experimentos diferentes, o não-pareado. Para análise dos contrastes a posteriori foi utilizado o teste de Tukey. Para análise dos dados foram utilizados os

programas Sigma Plot versão 9.0 e Sigma Stat versão 2.0 fabricados pela Jandel Scientific Inc. Os dados obtidos em pelo menos 6 experimentos, estão expressos com a média \pm erro padrão.

4 RESULTADOS

4.1 Ecocardiograma

O valor médio de volume diastólico final nos grupos controle e hipotireoidismo foram, respectivamente de $0,464 \pm 0,009$ e $0,414 \pm 0,013$ ml ($p = 0,004$).

O débito sistólico e o débito cardíaco no grupo controle foram, respectivamente de $0,267 \pm 0,010$ e de $69,347 \pm 5,836$ ml/min. No hipotireoidismo os valores destas duas variáveis foram, respectivamente de $0,198 \pm 0,008$ ml e $38,535 \pm 2,731$ ml/min. Comparando-se os valores destas duas variáveis entre os dois grupos, verificou-se que estes diferiram de forma estatisticamente significativa. Como média da frequência cardíaca dos animais hipotireoideos ($194,7 \pm 6,7$ bpm) foi estatisticamente menor do que a do grupo controle ($271,4 \pm 14,6$ bpm), as diferenças nos valores do débito cardíaco observado entre os grupos foram por tanto, decorrentes da combinação de 2 fatores: um menor débito sistólico e uma menor frequência cardíaca observada nos animais com hipotireoidismo. Quanto a fração de ejeção, esta foi estatisticamente menor no grupo hipotireoideu do que no grupo controle ($48,27 \pm 21,601\%$ vs $57,748 \pm 1,696\%$).

O grupo hipotireoideu apresentou, de forma estatisticamente significativa, um maior tempo de ejeção (120 ± 4 vs 78 ms ± 2) e de relaxamento isovolumétrico (46 ± 2 vs 26 ± 1 ms) que o grupo controle. Como consequência destes dois fatores, o a variável A, a qual é a soma do tempo sistólico e do tempo de relaxamento isovolumétrico está aumentada, de forma estatisticamente significativa, no grupo hipotireoideu (182 ± 6 vs 119 ± 1 ms). A média do tempo diastólico total do grupo controle e experimental foram, respectivamente de 174 ± 7 e 132 ± 7 ms ($p < 0,001$). Analisados no conjunto, estes dados demonstram que o hipotireoidismo promove comprometimento sistólico e diastólico.

No grupo controle a média da onda E foi de 0,756 m/seg \pm 0,015 e no grupo experimental de 0,669 m/seg \pm 0,015, quando comparados apresentaram um valor de $p < 0,001$, sendo estatisticamente diferentes. A média da onda A no grupo controle foi de 0,416 m/seg \pm 0,029 e no grupo hipotireoideu a média foi de 0,294 m/seg \pm 0,015. Quando comparados apresentaram significância estatística com valor de $p < 0,001$.

A média da área diastólica do grupo controle foi de 0,941 cm² \pm 0,012 e do grupo hipotireoidismo de 0,866 cm² \pm 0,017, sendo estatisticamente significativos quando comparados com valor de $p < 0,001$.

Os valores do índice de Tei no grupo experimental não diferiram de forma estatisticamente significativa dos valores obtidos no controle. Da mesma forma não houve diferença entre os grupos dos valores da razão da onda E e onda A.

Todos os valores estão apresentados na tabela 4.

		Controle		Hipo	
		Média	Erro Padrão	Média	Erro Padrão
VS	ml	0,1970	0,009	0,2160 *	0,0100
VDF	ml	0,4640	0,009	0,4140 *	0,0130
TRIV	ms	26,0	1	46,0 *	2
TCIV	ms	14,0	1	16,0	2
TE	ms	78,0	2	120,0 *	4
Onda E	m/seg	0,7560	0,0150	0,6690	0,0150
Onda A	m/seg	0,4160	0,0290	0,2940 *	0,0150
TDT	ms	132,0	7	174,0 *	7
FC	bpm	271,4000	14,6840	194,7690 *	6,7870
AD	cm ²	0,9410	0,0120	0,8660 *	0,0170
AS	cm ²	0,5430	0,0140	0,5640	0,0160
FE	%	57,7480	1,6960	48,2700 *	1,6010
T desac. onda E	ms	79,0	3	53,0	1
Var. A	ms	119,0	1	182,0 *	6
Ciclo cardíaco	–	0,2250	0,008	0,3110 *	0,0110
DS	ml	0,2670	0,0100	0,1980 *	0,008
DC	ml/min	69,3470	5,8360	38,5350 *	2,7310
Tei	–	0,5270	0,0270	0,5130	0,0200
E/A	–	1,8100	0,0800	2,3460	0,1260

TABELA 2 - Valores de performance cardíaca de animais controle e hipotireóides obtidos por ecocardiografia. VS=volume sistólico, VDF=volume diastólico final, TRIV=tempo de relaxamento isovolumétrico, TCIV=tempo de contração isovolumétrica, TE=tempo de ejeção, TDT=tempo diastólico total, FC=frequência cardíaca, AD=área diastólica; AS=área sistólica; FE=fração de ejeção; T desac. onda e=tempo de desaceleração da onda e, Var. A=variável A (tempo sistólico + TRIV), DS=débito sistólico; DC=débito cardíaco; Tei=índice de TEI; E/A=taxa onda E por onda A. * representa diferença estatisticamente significativa dos valores do grupo experimental em relação ao grupo controle.

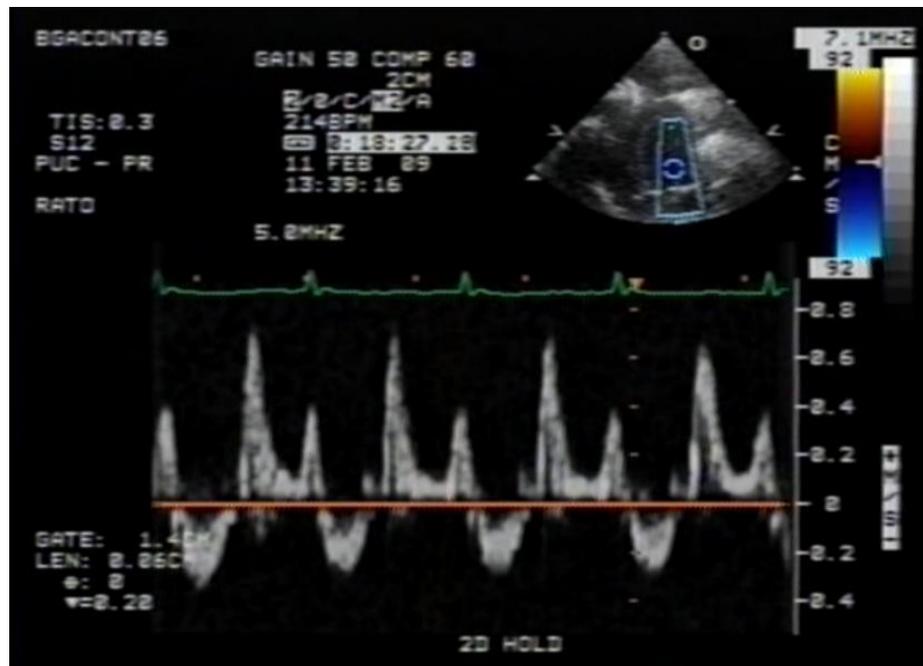


FIGURA 17 – Registro original de um experimento típico de ecocardiografia de rato do grupo controle.

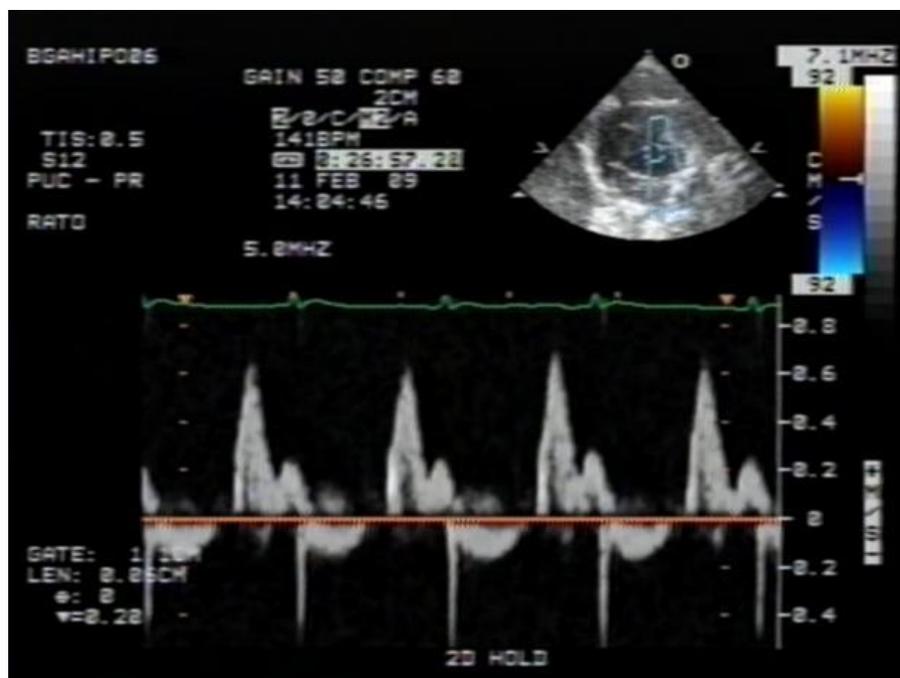


FIGURA 18 – Registro original de um experimento típico de ecocardiografia de rato com hipotireoidismo.

4.2 Eletrocardiograma

A análise do traçado eletrocardiográfico foi realizada nas derivações DI, DII, DIII, AVR e AVL. Ambos os animais do grupo controle e do grupo experimental mostraram eixo normal, complexo QRS normal, não sendo possível observar alterações significativas quer na geração e/ou condução das ondas de despolarização ou repolarização ventricular, entre os grupos. Não foram detectados a presença de extrasístoles atriais ou ventricular em nenhum animal. Em todos os animais de ambos os grupos, o ritmo foi sinusal. O único parâmetro eletrocardiográfico que se apresentou alterado nos animais com hipotireoidismo foi o intervalo PR, o qual apresentou aumento no tempo. Como o segmento PQ não apresentou diferenças em relação ao controle, esse aumento é decorrente do incremento da duração da onda P.

Os traçados eletrocardiográficos do grupo controle podem ser observados na Figura 17 e do grupo hipotireoidismo na Figura 18.

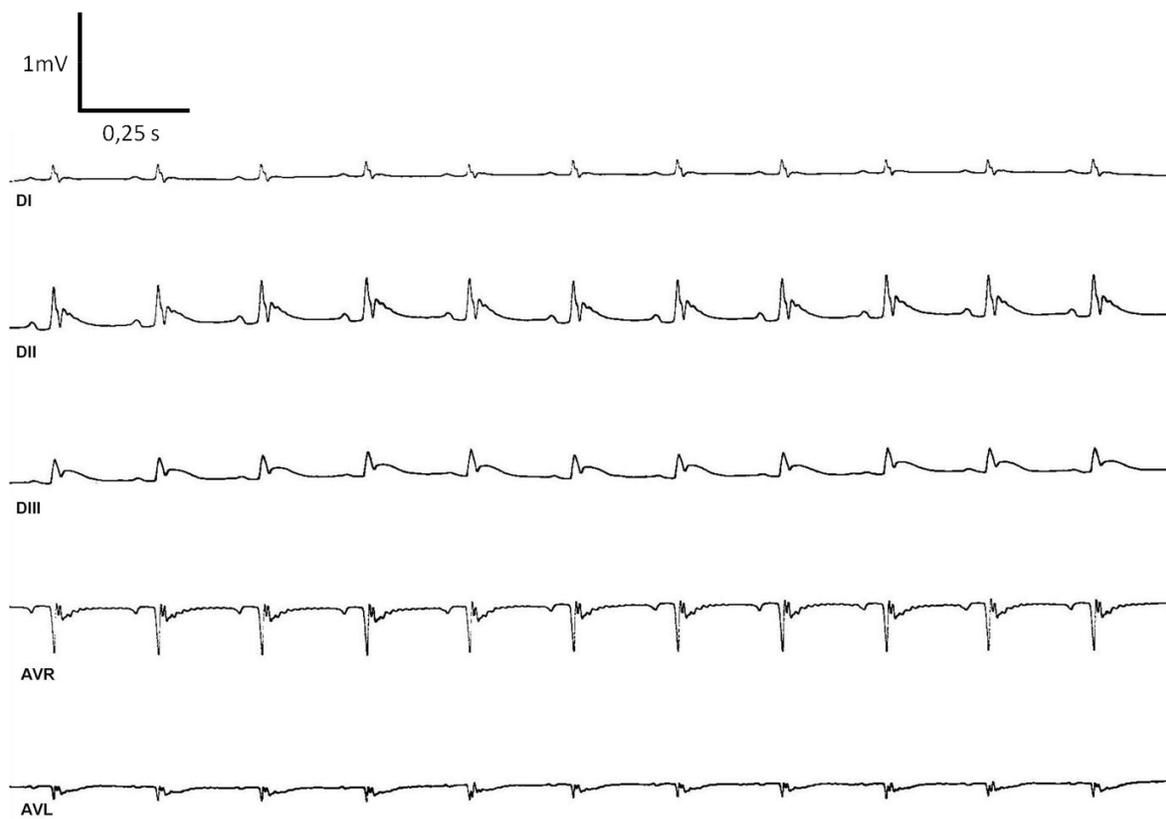


FIGURA 19 – Registro típico de um eletrocardiograma de rato (grupo controle).

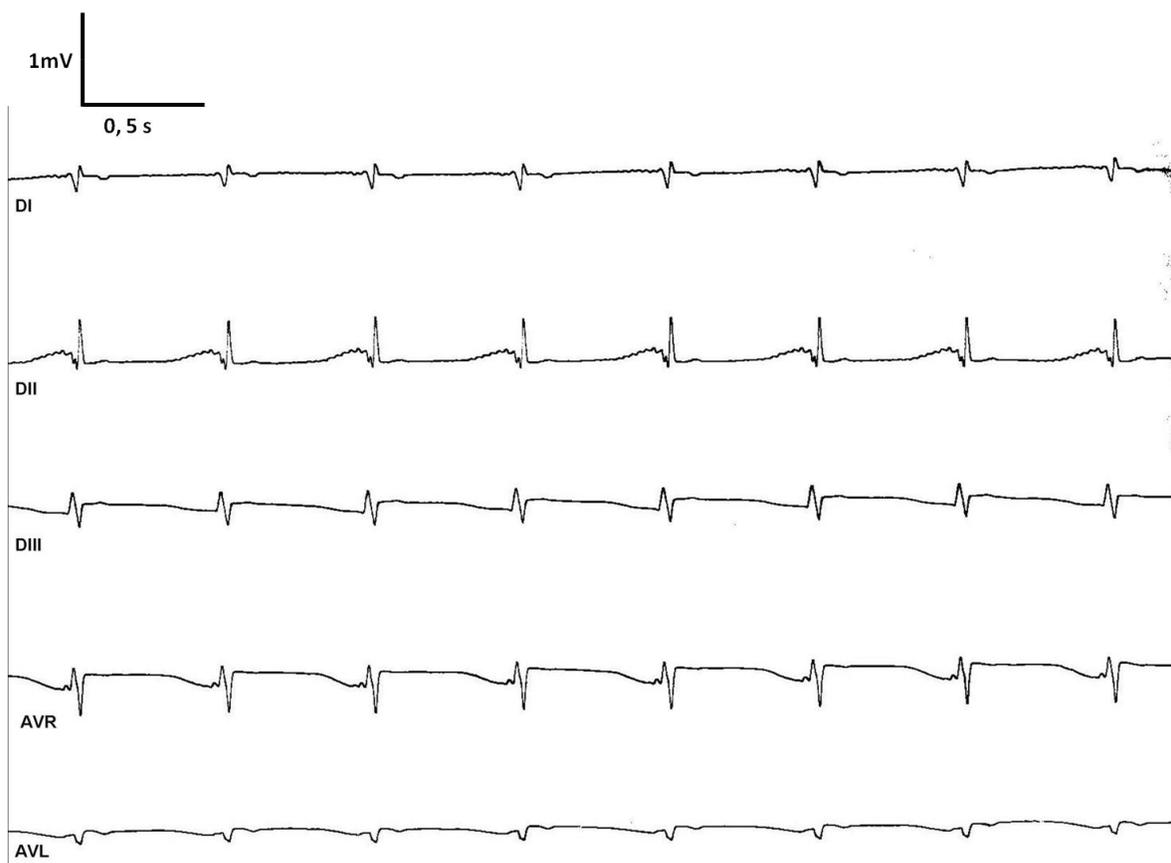


FIGURA 20 – Registro típico de um eletrocardiograma de rato (grupo hipotireoidismo).

	Inter PR	Seg PR	Dur QRS	Seg ST	Inter QT	EEM
Controle	50,7*	19,7	31,7	10	121,3	54
Erro Padrão	1,06E+00	1,02E+00	1,18E+00	0,00E+00	5,48E+00	13,433
Hipo	54	19,3	34	10	126,3	47
Erro Padrão	1,03E+00	4,63E-01	1,32E+00	0,00E+00	6,99E+00	2,54E+04

TABELA 3 - Valores de parâmetros eletrocardiográficos de animais controle e hipotireoideos. Inter PR= intervalo PR; Seg PR= segmento PR; Dur QRS= duração do complexo QRS; Seg ST= segmento ST; Inter QT= intervalo QT; EEM= eixo elétrico médio. Os valores estão expressos em milisegundos; * diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

4.3 Pressão Arterial

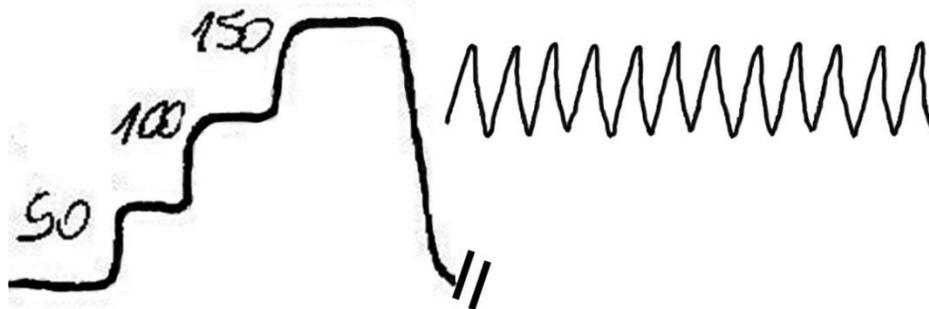


FIGURA 21 – Registro original de um experimento típico de mensuração da pressão arterial de rato.

A curva de calibração (conforme demonstrado na figura 21) foi realizada sempre antes do início da mensuração da pressão arterial.

Foi aferida a pressão sistólica e diastólica em 10 animais do grupo controle e em 12 do grupo experimental. A média dos valores da pressão sistólica do grupo hipotireoidismo foi de $105,11 \pm 4,59$ (mmHg) e do grupo controle foi de $118,67 \pm 4,87$ (mmHg). A média da pressão diastólica do grupo hipotireoidismo foi de $91,77 \pm 4,95$ (mmHg) e do grupo controle de $101,82 \pm 4,99$ (mmHg). Estes dados podem ser observados na figura 22.

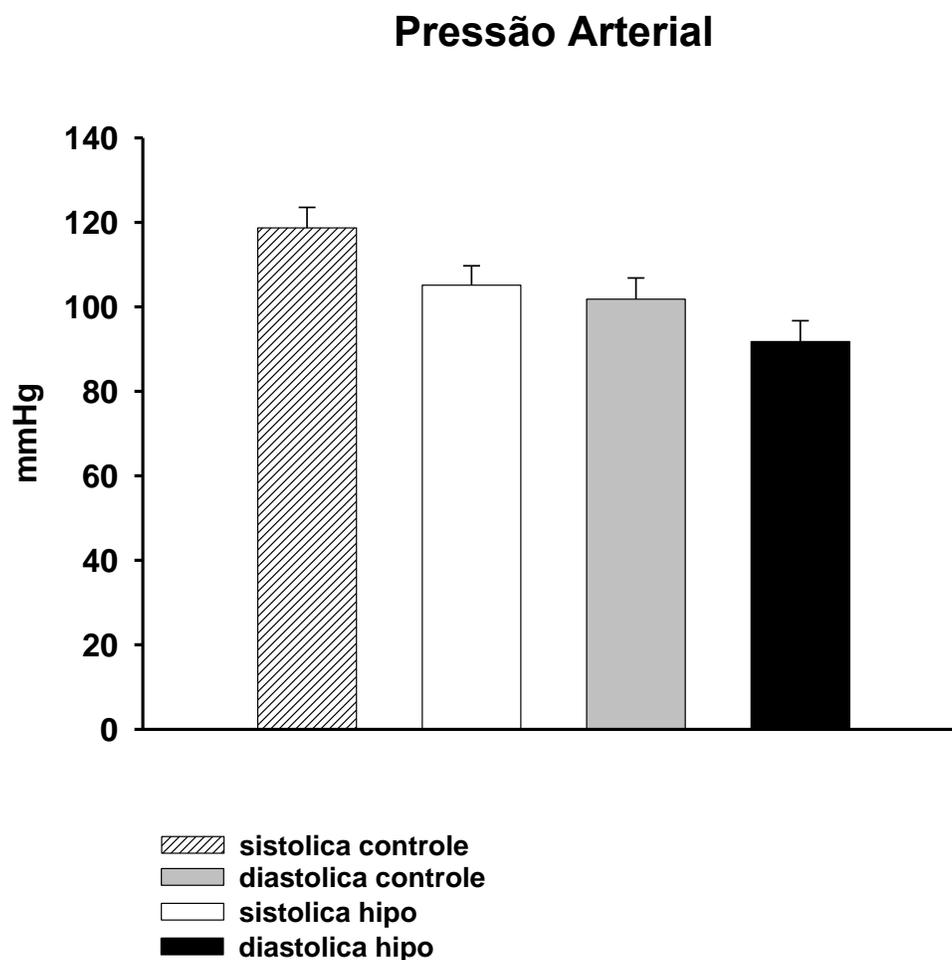


FIGURA 22 – Representação gráfica dos dados de pressão sistólica e diastólica dos grupos controle e hipotireoidismo.

Não foi encontrada diferença estatística significativa entre os valores de pressão sistólica e diastólica do grupo experimental com os valores do grupo controle.

4.4 Dosagem Hormonal

Os níveis de T3, T4 e no grupo controle e experimental aproximaram-se dos valores descritos na literatura (Ojamma et al, 2000)

No grupo experimental, os valores de T3 foram inferiores a 25 ng/dL e de T4 inferiores a 1 µg/dl em todos os animais. No grupo controle os valores médios de T3 e T4 foram respectivamente de $33,73 \pm 3,21$ ng/dl e $2,42 \pm 0,13$ µg/dl.

Os dados estão demonstrados na Tabela 2.

HIPO	T3	T4
	< 25 ng/dl	< 1µg/dl
	< 25 ng/dl	< 1µg/dl
	< 25 ng/dl	< 1µg/dl
	< 25 ng/dl	< 1µg/dl
	< 25 ng/dl	< 1µg/dl
	< 25 ng/dl	< 1µg/dl
CONTROLE	T3	T4
	45, 7 ng/dl	2, 54 µg/dl
	44, 6 ng/dl	2, 2 µg/dl
	25 ng/dl	3 µg/dl
	34 ng/dl	2, 1 µg/dl
	42 ng/dl	2, 4 µg/dl
	41, 1 ng/dl	2, 32 µg/dl

TABELA 4 – Valores de T3 e T4 nos grupos controle e hipotireoidismo.

4.5 Força isométrica

As análises dos resultados das diferentes concentrações de cálcio na solução de Ringer (Curva de Cálcio — 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0 e 10 mM) sobre a força isométrica desenvolvida pelos músculos papilares nos grupos controle e experimental, estão ilustrados graficamente na figura 23. Quando comparados os valores de força das contrações isométricas entre os dois grupos, nas respectivas concentrações de cálcio, não houve diferença estatística significativa. Os dados estão expressos em mN/mm^2 .

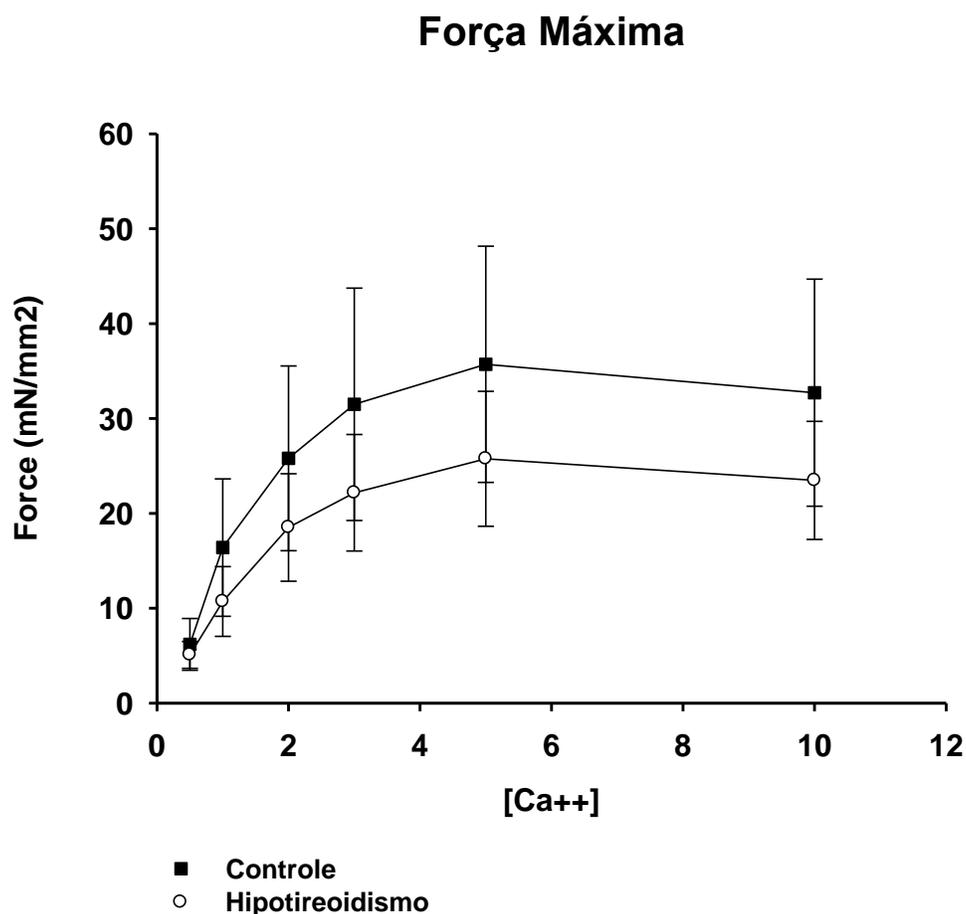


FIGURA 23 - Representação gráfica da força máxima produzida em papilares isolados nas concentrações de cálcio de 0,5; 1; 2; 3; 5; 10 mm nos grupos controle e hipotireoidismo.

4.6 Potenciações pós-pausas

A potenciação pós-pausa foi utilizada para avaliar a atividade do retículo sarcoplasmático (RS), já que o retículo sarcoplasmático serve como sistema regulatório no ciclo da contração — relaxamento do músculo pelo controle da concentração intracelular do cálcio livre. A recaptção de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático é o principal determinante da velocidade de relaxamento do miocárdio. Além disso, a quantidade absoluta de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático durante a diástole (potencialmente disponível para liberação na excitação celular) é determinante da força contrátil.

Nas Figuras 24 e 25, observam-se exemplos de registros originais das contrações pós-pausas em ratos dos grupos controle e experimental respectivamente. Como pode ser observado, a força da primeira contração após o período de pausa, é maior do que a força obtida, no estado estacionário, anterior ao período de pausa. Normalizando estes valores para valores percentuais e comparando-os, não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Os dados estão apresentados na forma de gráficos nas figuras 26 e 27.

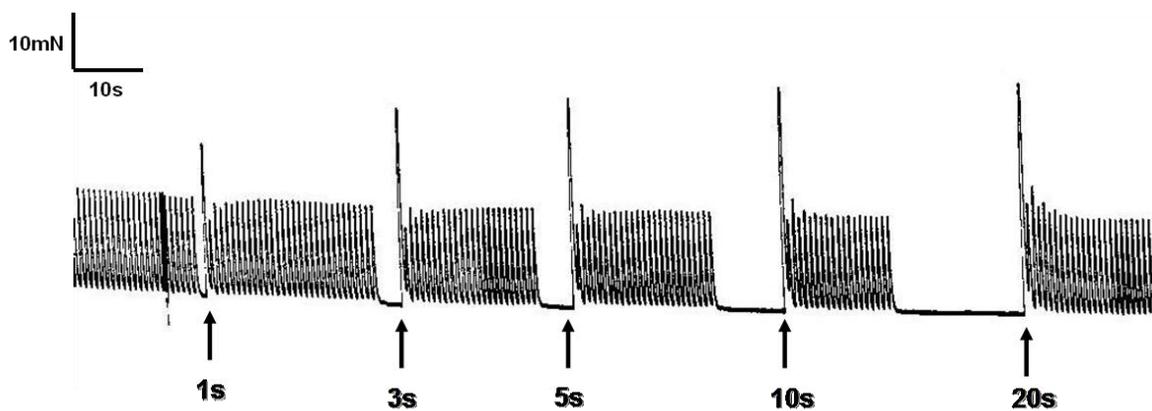


FIGURA 24 – Registro original de um experimento típico de potenciações pós-pausas de 1, 3, 5, 10 e 20 segundos (controle).

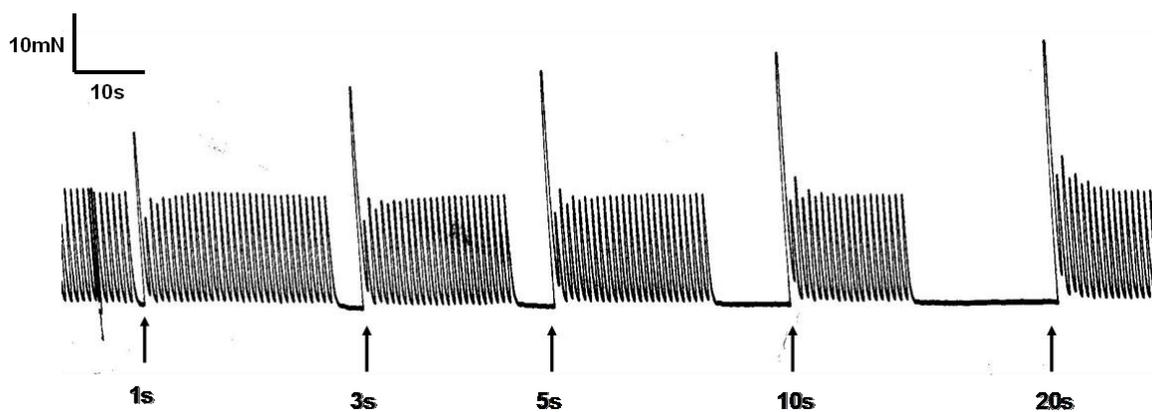


FIGURA 25 – Registro original de um experimento típico de potenciações pós-pausas de 1, 3, 5, 10 e 20 segundos de rato com hipotireoidismo.

Potenciação Pós Pausa - Controle

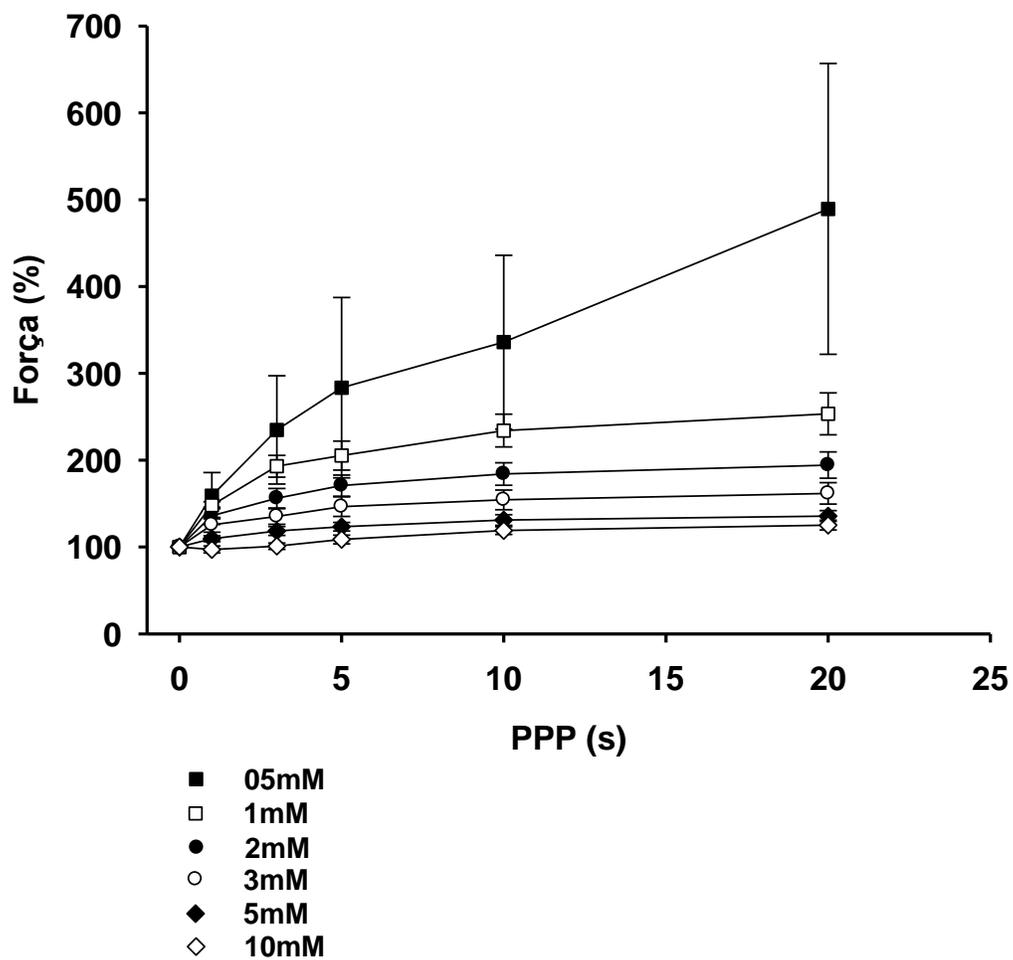


FIGURA 26 - Representação gráfica dos dados de contração isométrica de papilares obtidos após pausas de 1, 3, 5, 10 e 20 segundos do grupo controle.

Potenciação Pós Pausa - Hipotireoidismo

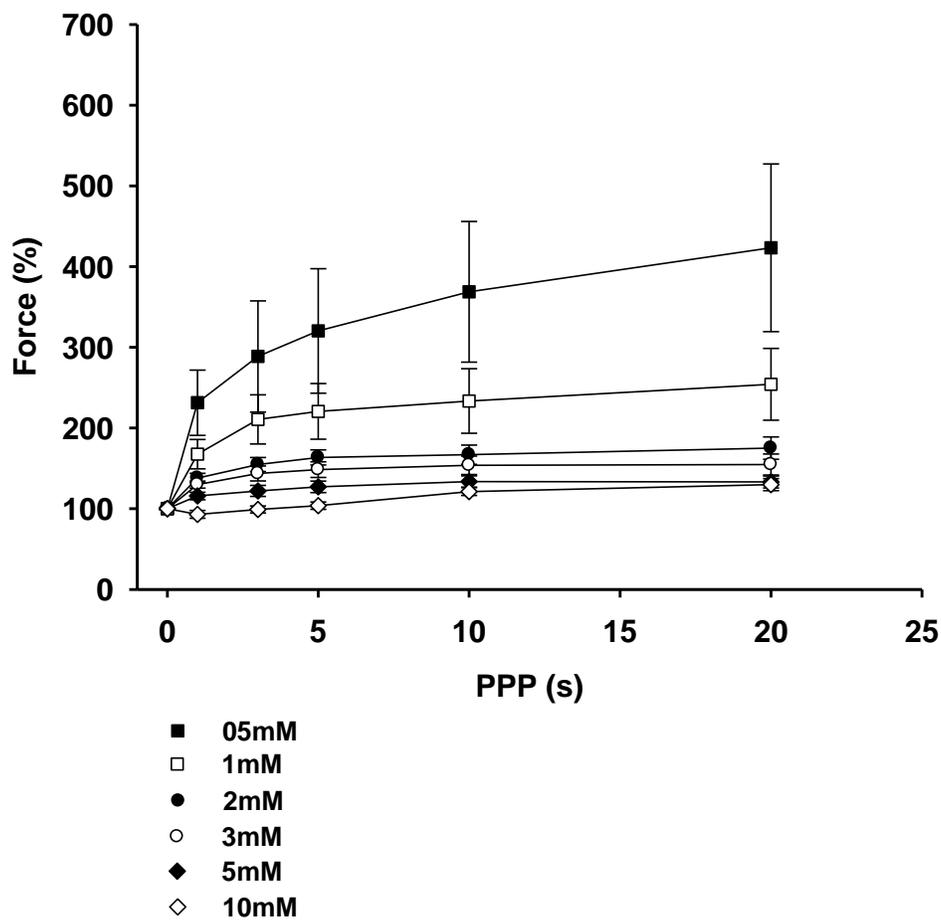


FIGURA 27 - Representação gráfica dos dados de contração isométrica de papilares obtidos após potenciações pós-pausas (1, 3, 5, 10 e 20 segundos) - grupo hipotireoidismo.

4.7 Velocidades de contração e de relaxamento (df/dt)

Foram analisadas as velocidades de contração e relaxamento em todas as concentrações de cálcio (0,5; 1; 2; 3; 5; 10 mM) dos grupos controle e hipotireoidismo. Apenas na concentração de 3 mM foi verificada diferença estatisticamente significativa tanto na velocidade de relaxamento quanto na de contração quando comparado os animais do grupo experimental com o controle. Na concentração de cálcio de 3 mM obtivemos uma média da +df/dt de $165,4 \pm 44,7$ mN/mm²/s no grupo experimental e de $366,5 \pm 77,7$ mN/mm²/s no grupo controle. A média da -df/dt do grupo hipotireoidismo foi de $83,4 \pm 22,2$ mN/mm²/s e do grupo controle de $179,2 \pm 39,3$ mN/mm²/s.

Os dados de df/dt estão representados nas figuras 28 e 29.

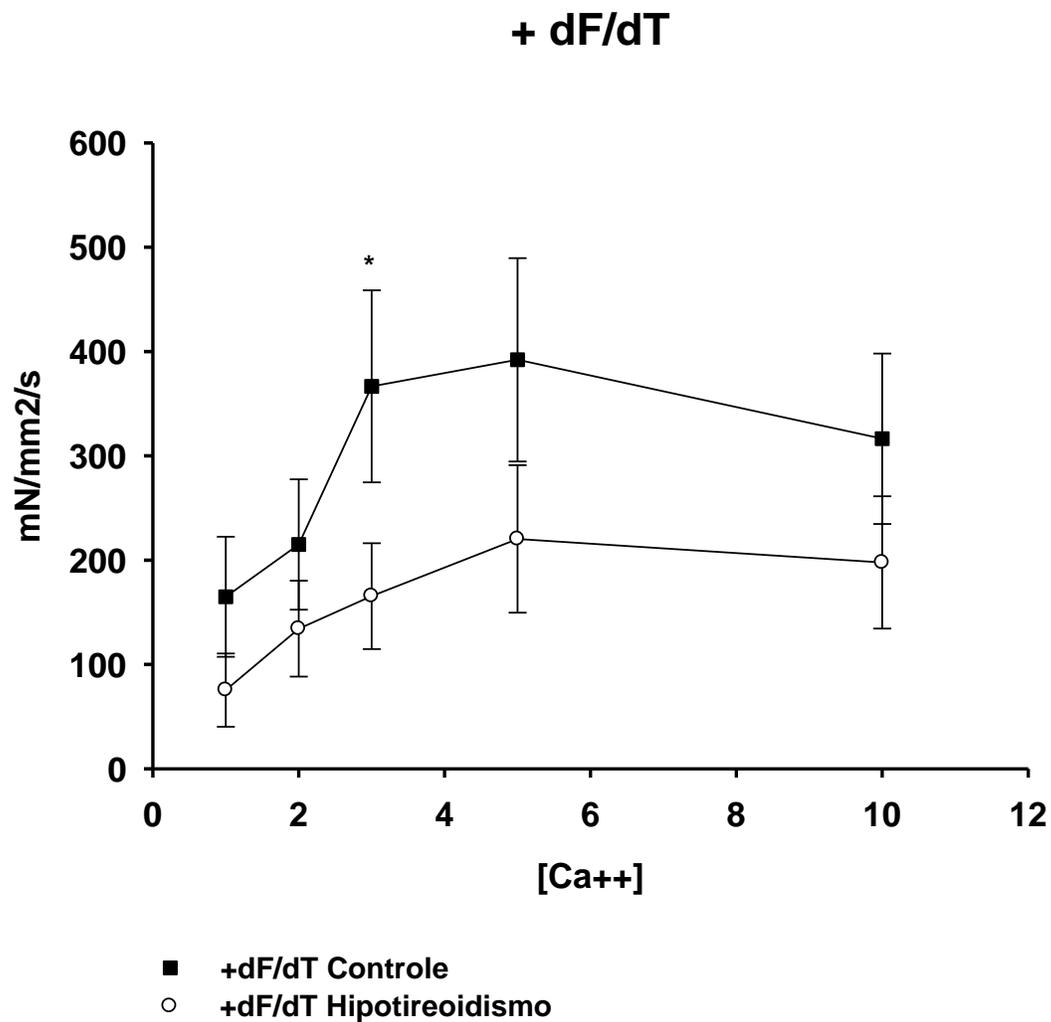


FIGURA 28 - Representação gráfica da velocidade de contração de músculo papilar dos grupos controle e hipotireoidismo (+df/dt). *= apresenta diferença estatística significativa.

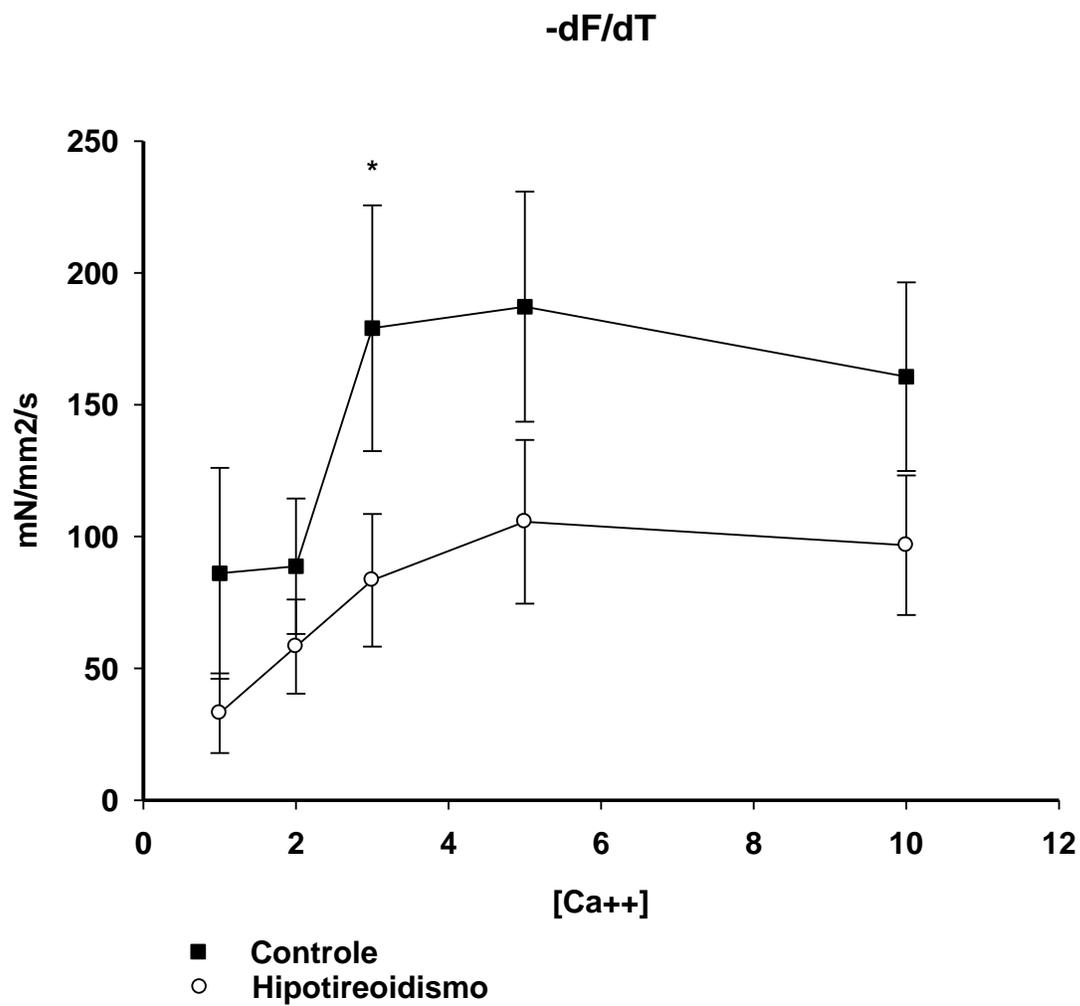


FIGURA 29 - Representação gráfica da velocidade de relaxamento de músculo papilar dos grupos controle e hipotireoidismo (-df/dt). *= apresenta diferença estatística significativa.

4.8 Tempo necessário para produção de 50% da força máxima e para 50% do relaxamento

O tempo para produção de 50% da força máxima, e para atingir 50% do relaxamento muscular foi mensurado em preparações mantidas em Ringer contendo a concentração de cálcio extracelular de 2 mM. Os dados (em segundos) do grupo controle e experimental encontram-se na tabela abaixo.

CONTROLE	T₅₀ contração (2mM)	T₅₀ relaxamento (2mM)
Média	0,0533	0,1822
Erro Padrão	4,7140e-3	0,0178
HIPO	T₅₀ contração (2mM)	T₅₀ relaxamento (2mM)
Média	0,0580	0,2020
Erro Padrão	3,5901e-3	0,0101

TABELA 5 – Valores da média do t₅₀ dos grupos controle e hipotireoidismo (segundos).

T50 % contração e relaxamento

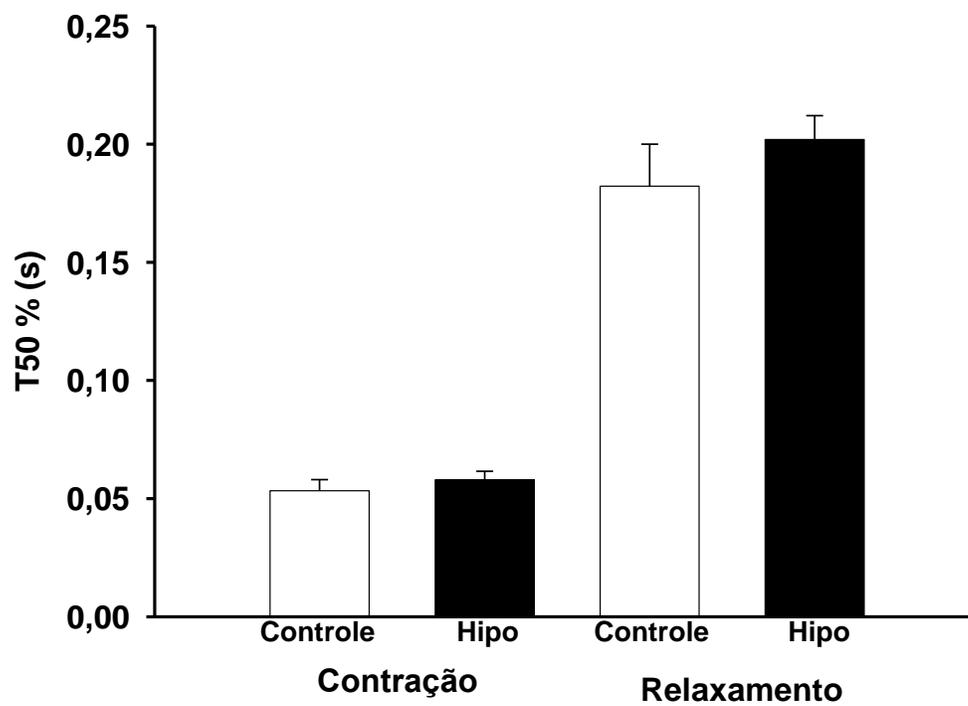


FIGURA 30 - Representação gráfica dos resultados de t_{50} dos grupos controle e hipotireoidismo.

4.9 Avaliação da contribuição do Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ no tempo de Relaxamento de músculos papilares quiescentes

A avaliação da contribuição do NCX no relaxamento de preparações de músculo papilar isolado está demonstrada na figura 35. Como pode ser observado, o tempo de relaxamento muscular é aumentado, porém não sendo estatisticamente significativa, nos animais hipotireoideus, quando se mantém as preparações em solução na qual se removeu o Na^+ e o Ca^{2+} (figura 34). Em Ringer normal, verificamos que o tempo necessário para obtenção de 50 % de relaxamento no grupo hipotireoideu é idêntico ao do grupo controle enquanto que para 100 % de relaxamento, o grupo hipotireoideu apresentou valor menor do que o grupo experimental, não havendo, entretanto diferença estatística entre os mesmos (figura 33). O relaxamento obtido em Ringer normal ocorre como consequência da recaptação sarcoplasmática do íon cálcio realizado pela SERCA e da remoção deste íon pelo NCX. Já o relaxamento muscular obtido quando as preparações são mantidas em solução não contendo Na^+ e Ca^{2+} , o relaxamento é devido, primariamente pela SERCA. Assim, por subtração dos tempos de relaxamento obtidos em solução zero Na^+ + zero Ca^{2+} aos obtidos em Ringer normal, podemos estimar a contribuição do NCX. Os dados da contribuição do NCX para o relaxamento muscular estão demonstrado na figura 35. Verificamos por tanto, que no hipotireoidismo o NCX desempenha um papel preponderante para o relaxamento de músculos papilares isolados.

Nas figuras 31 e 32 estão representados os registros dos experimentos para análise da participação do NCX.

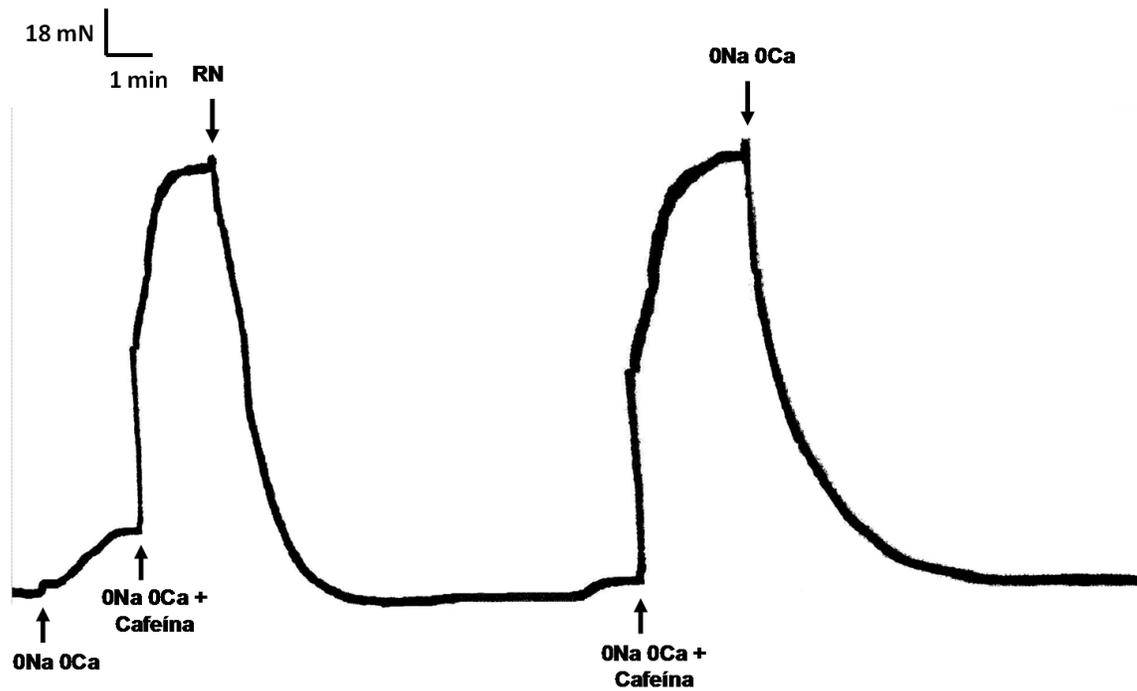


FIGURA 31 – Exemplo de um registro de relaxamento de músculos papilares do grupo controle utilizando soluções de ringer normal (rn) e ringer zero sódio e zero cálcio (0na 0ca) após contração induzida por cafeína.

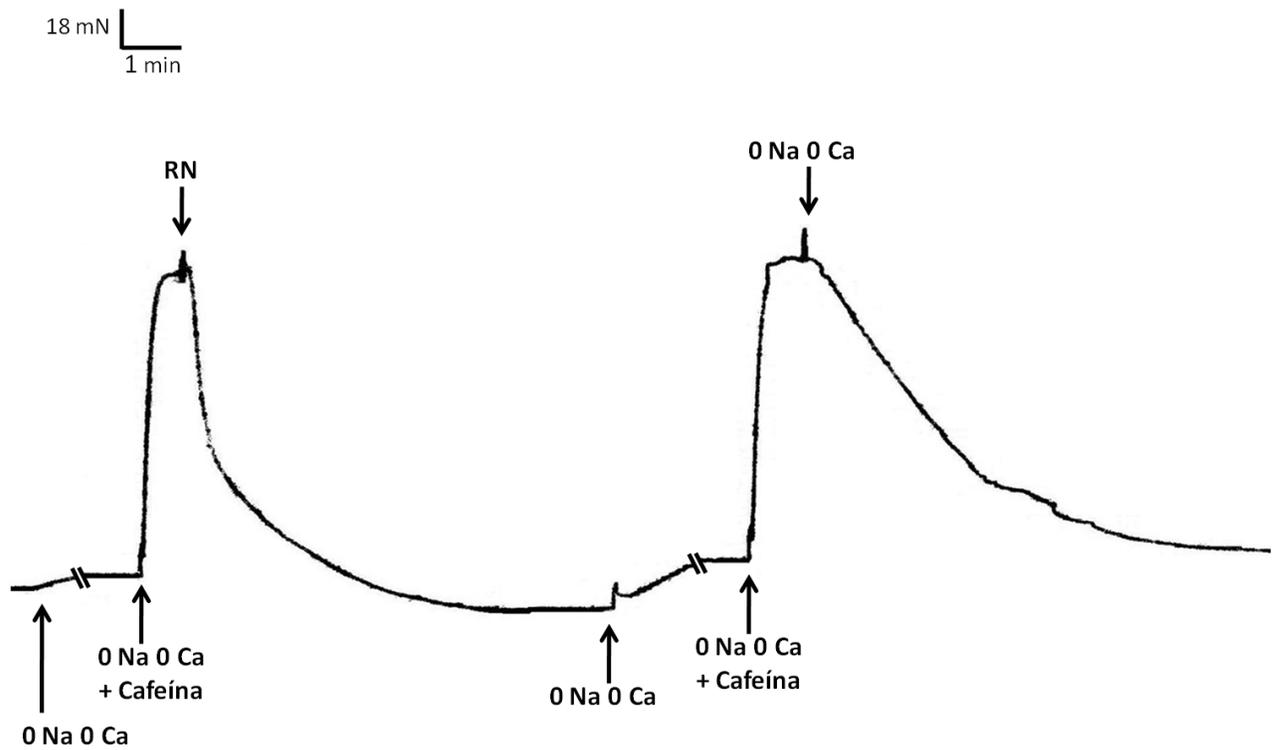


FIGURA 32 – Registro original de um experimento típico do protocolo de avaliação da contribuição do trocador NCX e da SERCA no relaxamento de músculo papilar isolado de rato hipotireoideu.

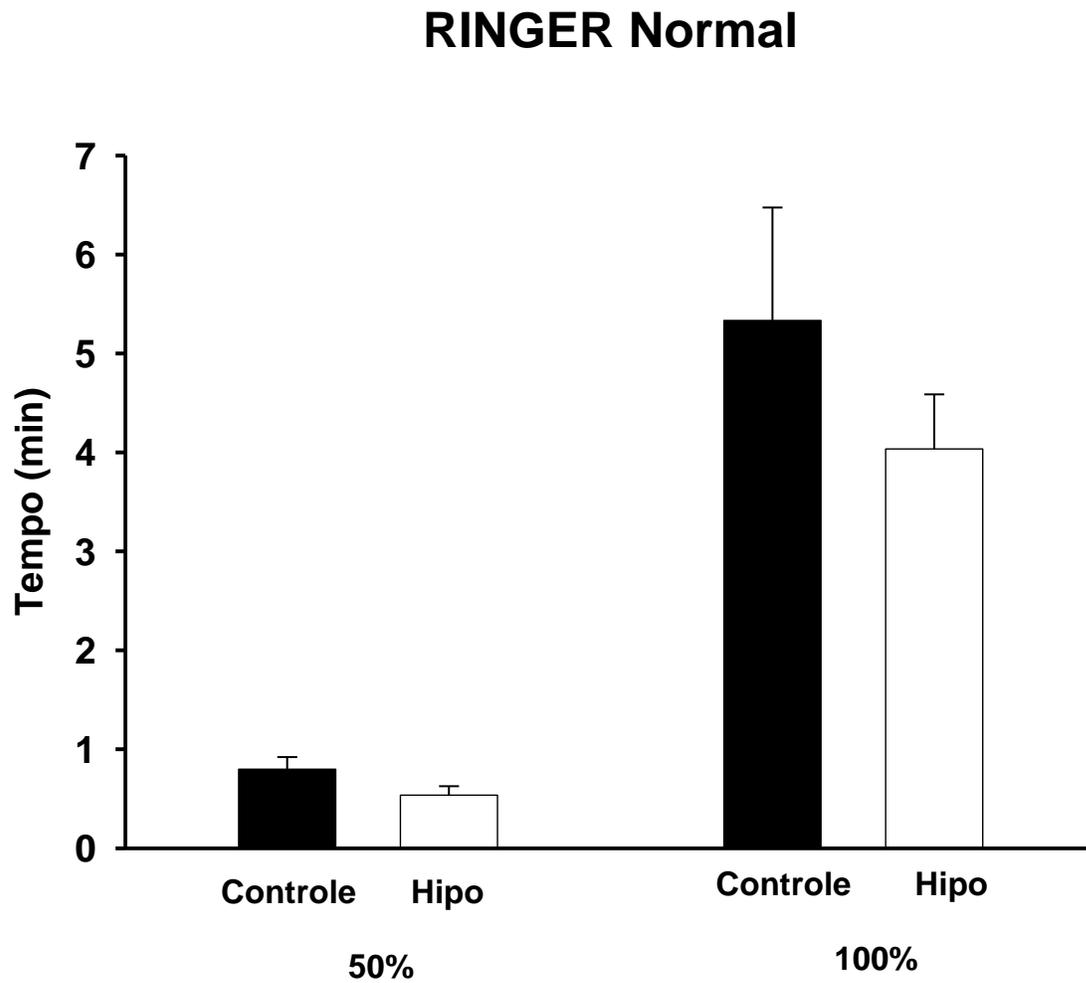


FIGURA 33 – Representação gráfica do tempo necessário para obtenção de 50 e 100 % de relaxamento de papilares isolados em Ringer normal.

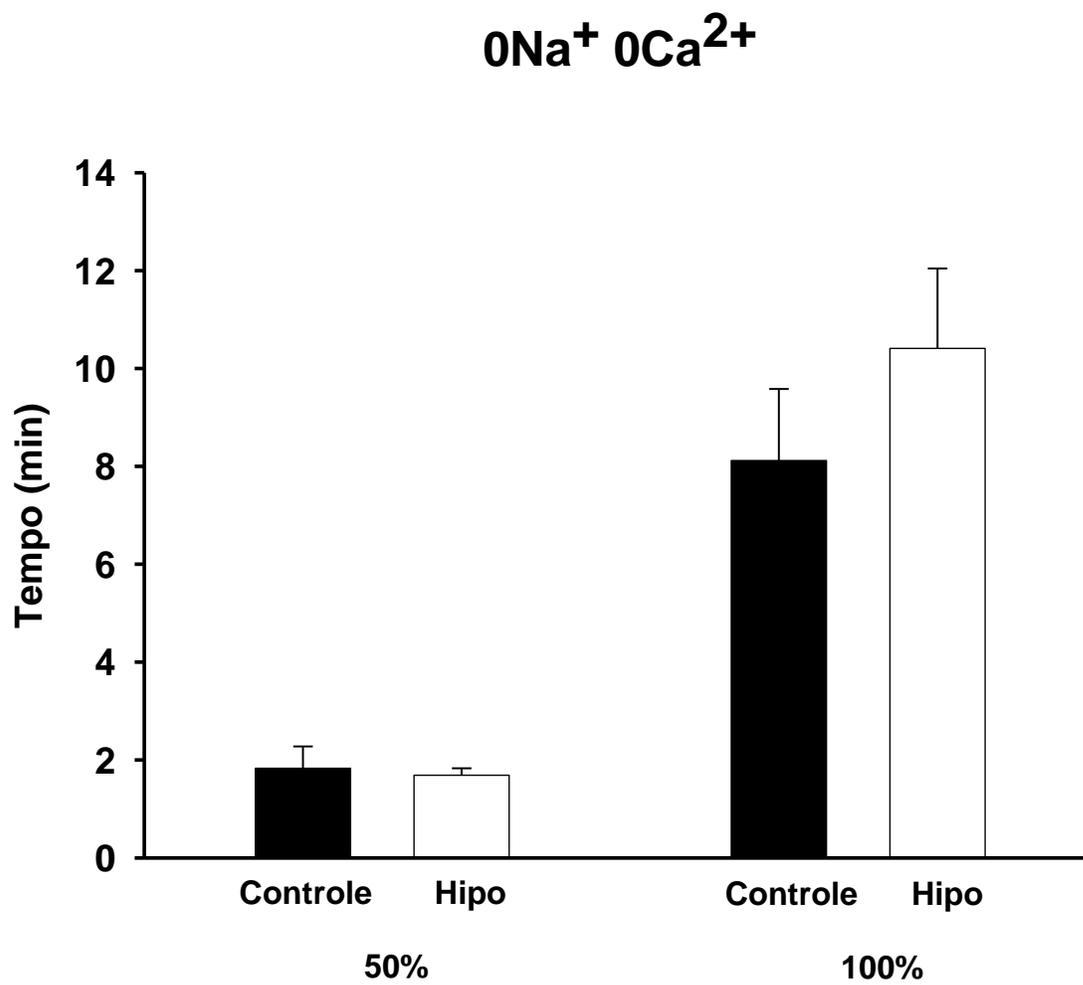


FIGURA 34 - Representação gráfica do tempo necessário para obtenção de 50 e 100 % de relaxamento de papilares isolados.

Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

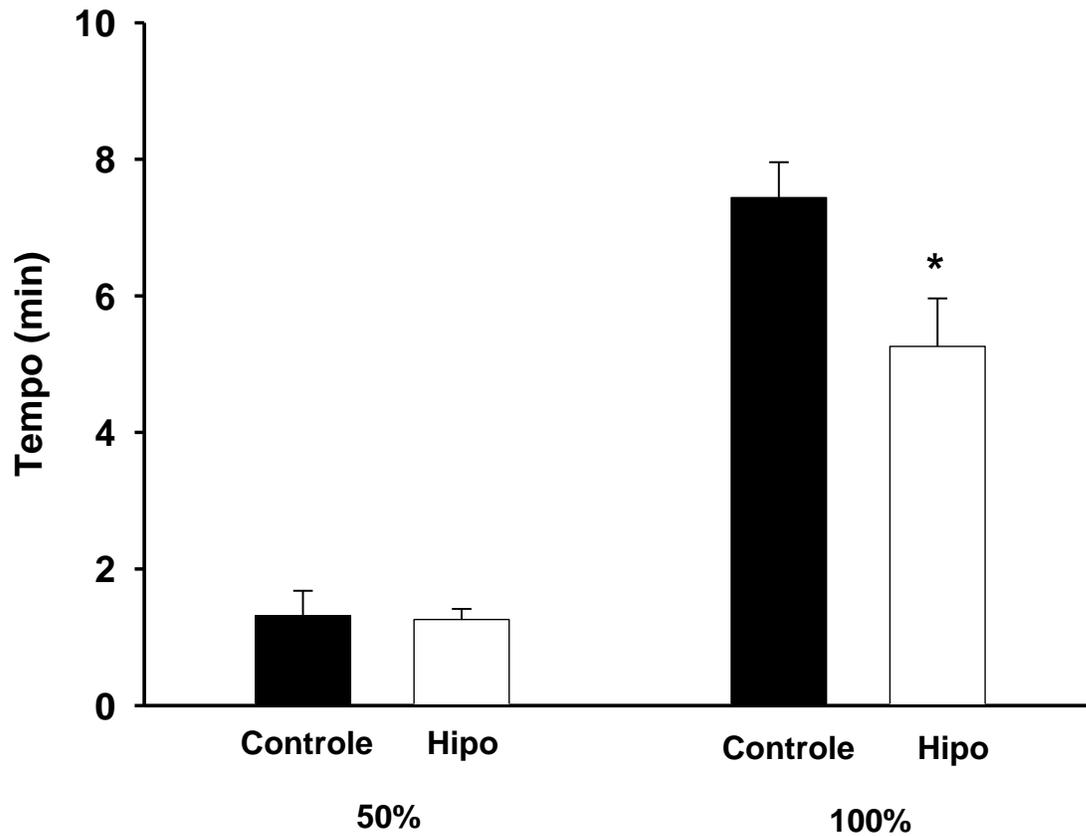


FIGURA 35 – Representação gráfica dos resultados da contribuição do ncx para obtenção de 50 e 100 % de relaxamento de papilares isolados de rato. *=Diferença estatisticamente significativa do tempo para obtenção de 100 % de relaxamento do grupo experimental em relação ao controle.

4.10 Trabéculas de Papilares Permeabilizados com o uso de saponina

Em trabéculas de papilares permeabilizados com o uso de saponina foi avaliado a capacidade de carregamento do retículo sarcoplasmático com íons cálcio em 5, 30, 60 e 120 segundos. Após estes intervalos de tempo promoveu-se a liberação de íons cálcio utilizando-se a cafeína. A força de contração muscular serviu de parâmetro para se estimar a quantidade de cálcio liberada. Os dados foram normalizados e expressos em valores percentuais da máxima força produzida a partir da ativação do sistema contrátil obtida com solução contendo pCa 4,0. Os resultados estão demonstrados graficamente na figura 36. A produção de força foi estatisticamente menor no grupo de animais com hipotireoidismo nos tempos de carregamento com íons cálcio de 5, 30 e 60 segundos. No tempo de carregamento de 120 segundos não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Força Versus Tempo de Carregamento

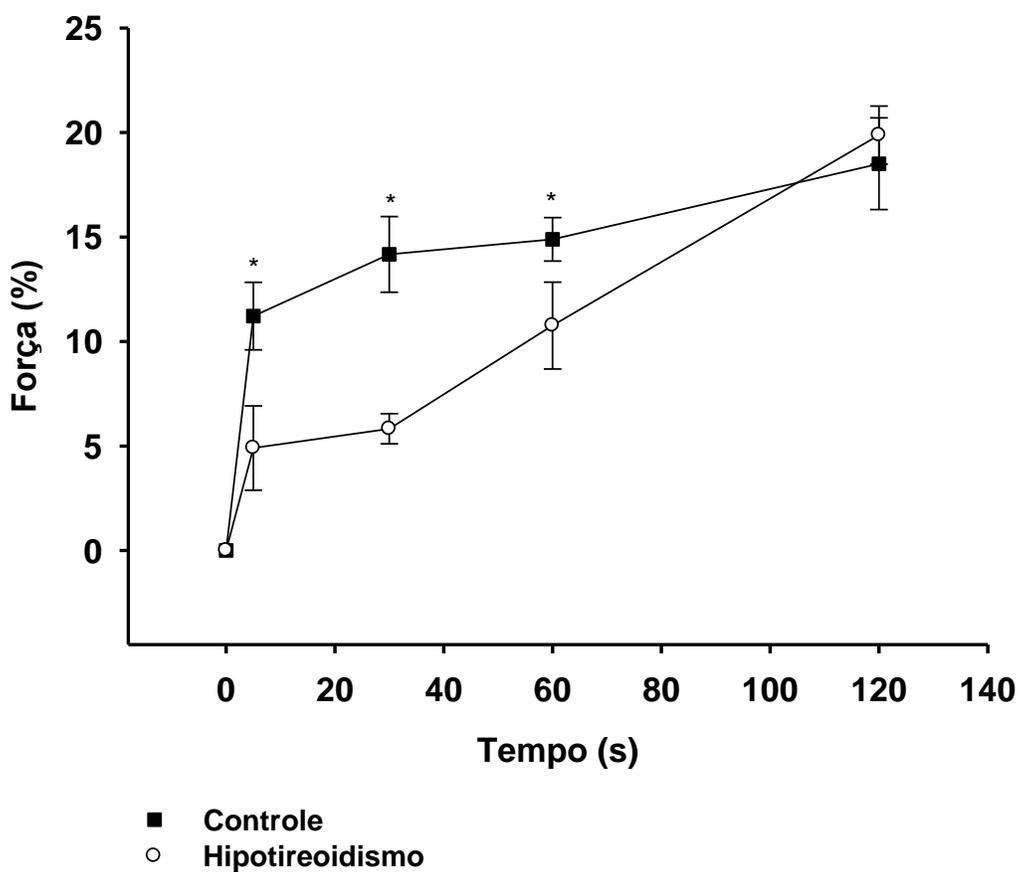


FIGURA 36 – Produção de força induzida pela liberação de íons cálcio após carregamento do RS em tempos de 5, 30, 60 e 120 segundos. *= apresenta diferença estatística significativa.

5 DISCUSSÃO

A função primária do coração é garantir o débito adequado de sangue para atender, de forma global, às demandas metabólicas de todos os órgãos e sistemas. Existem três principais mecanismos envolvidos na regulação do débito cardíaco: o mecanismo que ajusta de momento a momento o débito cardíaco, representado pela regulação heterométrica (lei de Frank Starling); o mecanismo de regulação homeométrica (contratilidade miocárdica) que opera graças às flutuações nos níveis intracelulares de cálcio, e ocorre a cada ciclo cardíaco; e a sensibilização do sistema de regulação do complexo troponina tropomiosina, presente nos filamentos finos (Cingolani e Houssay, 2004; Mohrman e Heller, 2007).

O mecanismo de regulação heterométrico é dependente do volume diastólico final e, portanto, depende do retorno venoso e do volume de líquido no compartimento intravascular. Assim, qualquer fator que o altere, como, por exemplo, a resistência vascular periférica total, o volume circulante e a complacência do leito venoso poderão levar a alterações no débito cardíaco (Cingolani e Houssay, 2004; Mohrman e Heller, 2007).

O mecanismo homeométrico de regulação do débito cardíaco opera sempre que fatores neuro-humorais, como níveis circulantes de catecolaminas, angiotensina, tônus simpático, dentre outros, venham a modificar a condutância dos canais de cálcio presentes no sarcolema, dos trocadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, da bomba de cálcio, da atividade da SERCA e da sensibilidade do sistema contrátil ao cálcio (Cingolani e Houssay, 2004; Mohrman e Heller, 2007).

Além destes três mecanismos de regulação do débito cardíaco, a regulação da frequência cardíaca, possibilita que o débito cardíaco seja ajustado às diferentes condições de vida do indivíduo (Cingolani e Houssay, 2004; Mohrman e Heller, 2007).

Estes mecanismos isoladamente ou em conjunto operam para que a bomba cardíaca gere força (pressão) suficiente para garantir que a resistência oferecida

ao deslocamento do sangue seja vencida. Portanto, estes mecanismos devem ser suficientemente eficientes a permitir que se estabeleça um gradiente de pressão artério-venosa que vença os fatores de resistência dados pelas propriedades intrínsecas do sangue (viscosidade) e geométricas (comprimento e raio) dos vasos sanguíneos.

Dentre as alterações cardiovasculares provocadas pelo hipotireoidismo estão descritas redução do débito cardíaco, tanto por redução da frequência como por redução do débito sistólico. Estas duas variáveis quando reduzidas, tendem a provocar uma redução da pressão arterial. Neste estudo, bem como outros descritos na literatura, verificou-se que a pressão arterial (sistólica e diastólica) não diferiu do grupo eutireoideu. Assim existem duas possibilidades para a manutenção dos níveis pressóricos nos animais hipotireoideus: incremento no volume circulante e/ou aumento da resistência periférica total.

Na vasculatura o hormônio da tireóide promove diminuição da resistência vascular periférica através de efeito direto nas células musculares lisas. O efeito mediado pelo T3 nas células musculares lisas dos vasos se dá de forma genômica e não genômica. A ação não genômica se dá através de efeitos nos canais iônicos e na síntese de óxido nítrico, promovendo diminuição da RVP. Aumento da síntese de NO endotelial, resulta em parte do efeito do T3 na via da proteína quinase Akt. Esta por sua vez tem como alvo a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). O NO sintetizado nas células endoteliais atua de forma parácrina, nas células musculares lisas adjacentes facilitando o relaxamento vascular (Kuzman et al., 2005; Hiroi et al., 2006). Isso nos leva a crer que os efeitos hemodinâmicos do hormônio da tireóide tem grande atribuição a ativação da eNOS.

Como citado por Imai et al. (1995) no hipotireoidismo a complacência arterial está reduzida, e segundo Taddei et al. (2003) disfunção endotelial e o relaxamento prejudicado das células musculares lisas dos vasos, contribuem para aumento da RVP. Esses efeitos levam a uma hipertensão diastólica em 30% dos pacientes e o tratamento com hormônio da tireóide restaura o relaxamento endotelial e os níveis normais de pressão arterial (Taddei et al., 2003).

O peptídeo natriurético atrial regula o balanço de sódio e de água, e desempenha importante papel na regulação da pressão arterial. A expressão do ANP é regulada pelo hormônio da tireóide, pelas mudanças na pressão sanguínea e estados patológicos que afetam a função cardíaca (Lewicki e Protter, 1995). Esta pode ser outra substância responsável pelas alterações de pressão no hipotireoidismo.

Neste estudo observamos que animais com hipotireoidismo apresentaram de forma estatisticamente significativa, redução da frequência cardíaca. Este dado está de acordo com outro trabalho realizado em nosso laboratório (Thomal, 2007). Existem pelo menos duas possibilidades pelas quais a frequência cardíaca pode ser alterada: modificação direta das propriedades elétricas das células de automaticidade intrínseca (nodo sinusal), ou alterações nos níveis de fatores neuro-humorais que modulam a atividade deste marca-passo primário, como, por exemplo, catecolaminas circulantes, tônus simpático, dentre outros (Biondi et al 2002). Apesar de o efeito cronotrópico positivo exercido pelo T3 estar bem caracterizado, as bases moleculares de suas ações não tem sido investigado em detalhes.

As alterações da automaticidade intrínseca devem-se a aos efeitos do TH nos canais de membrana. Alterações específicas na expressão ou na função de canais iônicos devido ao hipotireoidismo têm sido identificadas. Em ratos com hipotireoidismo o RNA mensageiro que codifica para os canais K_V 1.5, K_V 4.2 e K_V 4.3 está diminuído. A corrente I_{to} ocorre primariamente devido a esses canais em ratos adultos, e no hipotireoidismo a I_{to} está diminuída. Recentemente, dois genes que codificam para a corrente hiperpolarizante I_f , a qual contribui para a atividade de marca passo tem sido clonada. Eles foram denominados HCN2 e HCN4. HCN2 produz canais responsáveis pelo componente rápido da corrente I_f , e o HCN4 codifica para canais responsáveis pelo componente lento. No hipotireoidismo a expressão desses genes está diminuída (Gloss et al., 2001). Contudo a análise dos dados de eletrocardiografia não demonstrou alterações elétricas importantes no grupo experimental ou no grupo controle. Como não ocorreram alterações eletrocardiográficas detectáveis, modificações da

performance cardíaca observada no hipotireoidismo não pode ser atribuídas a distúrbios quer na geração ou condução da onda de despolarização ventricular.

A redução da FC combinada com a redução do DS observadas neste trabalho são responsáveis pela redução do DC. Os mecanismos envolvidos na redução do débito sistólico são complexos, mas basicamente dependem de duas outras variáveis: volume diastólico final e o volume sistólico de reserva. Mediante ecocardiografia, observamos que animais com hipotireoidismo apresentaram redução do volume diastólico final. Esta redução pode ser ocasionada por uma menor complacência ventricular o que caracterizaria um dos parâmetros de disfunção diastólica, ou de redução do enchimento ventricular provocado por redução do retorno venoso.

As alterações decorrentes do mecanismo de regulação heterométrica devem-se também ao aumento da rigidez do coração devido ao possível aumento de colágeno. Segundo Matsubara et al. (2000), o aumento de colágeno no miocárdio tem influência significativa na rigidez do coração e no funcionamento da câmara ventricular esquerda. Estes autores realizaram estudo com ratos, onde encontraram que o aumento da concentração de colágeno provoca disfunção diastólica, mas não apresenta efeitos na função sistólica. Outros autores relatam que o aumento de colágeno pode levar a uma disfunção diastólica ou falência cardíaca e este aumento pode ser decorrente da substituição das fibras musculares que sofreram apoptose ou morte celular, por fibras colágenas (Jin et al., 2000).

Um mecanismo pelo qual pode ocorrer morte celular no tecido cardíaco do hipotireóideo é a diminuição da produção de eritropoietina (EPO). A eritropoietina é o regulador primário da eritropoiese, e promove proliferação e diferenciação de eritróides progenitores. Esta se liga a um receptor de membrana (EPO-R) ativando diversas vias de sinalização, como da MAPK e da PI3K/Akt. A ativação da via PI3K/Akt promove ativação da maquinaria genômica aumentando a expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-XL (van der et al., 2004).

A via PI3K/Akt tem um papel importante na regulação do crescimento celular, metabolismo e sobrevivência. A Akt bloqueia a apoptose, após ser

fosforilada nos resíduos serina-treonina e ativada, esta por sua vez fosforila e inibe a GSK-3 que leva inativação da BAD da família da Bcl-2, inibindo a morte celular pela via da enzima caspase-9 (Pantos et al., 2007).

A eritropoietina é produzida nos rins. Sua produção é induzida por hipoxia, e sua expressão é regulada pelo fator induzido por hipoxia (HIF-1) (Cao, Kambe e Seo, 2006). Recentemente a ação do TH tem sido relatada diretamente com o aumento da transcrição do fator induzido por hipoxia HIF-1 α (Hiroi et al., 2006). Portanto acredita-se que no hipotireoidismo há uma diminuição do HIF-1, levando há aumento da atividade apoptótica das células cardíacas

Neste trabalho, o volume sistólico também designado como volume sistólico de reserva, está significativamente aumentado no grupo experimental. Isto significa que durante a sístole ventricular uma menor quantidade de sangue é bombeada para a circulação sistêmica. Conforme discutido acima, os animais com hipotireoidismo também apresentaram um volume diastólico final menor. A combinação destes dois fatores provavelmente promoveu uma redução da fração de ejeção. Resultados semelhantes têm sido bem descritos na literatura (Kahaly et al., 1995; Vitale et al., 2002). Esta menor fração de ejeção demonstra que os animais com hipotireoidismo apresentam também uma disfunção sistólica. Esta disfunção é multifacetada podendo envolver alterações no processo de acoplamento excitação contração ou da sensibilidade do sistema contrátil ao íon cálcio. Os dados de ecocardiografia reforçam estas hipóteses haja vista que o grupo experimental apresentou um aumento do tempo de ejeção, tempo de relaxamento isovolumétrico e tempo diastólico total. Contudo o índice de Tei, utilizado para detectar disfunções sistólicas e diastólicas, não foi estatisticamente significativo, o que está de acordo com outros autores (Ohga et al., 2002; Tang et al., 2005). A ausência de diferença estatisticamente significante no índice de Tei entre os grupos experimental e controle foi decorrente do aumento proporcional tanto no tempo de ejeção quanto no tempo de relaxamento isovolumétrico observado no grupo experimental.

No grupo hipotireoideu, a diminuição estatisticamente significativa dos valores das velocidades de contração e de relaxamento (df/dt) de papilares

isolados eletricamente estimulados foram obtidas somente na solução contendo 3 mM de cálcio. Contudo, em todas as outras concentrações extracelulares de cálcio empregadas, os valores destas variáveis estiveram abaixo dos valores do grupo controle. De forma semelhante não foi encontrada diferença estatística no tempo que ambos os grupos levavam para atingir 50% do relaxamento. Supostamente o aumento do tempo de ejeção deveria coincidir com o aumento no tempo necessário para obtenção de 50 % da força de papilares isolados e diminuição da dF/dt . Da mesma forma o aumento no TRIV deveria ser acompanhado por aumento no tempo de relaxamento e diminuição da $-dF/dT$. A correlação destes dados é complexa. Por exemplo, a frequência de estimulação utilizada em preparações isoladas é baixa, comparada com a frequência cardíaca. Tem sido demonstrado que o aumento na frequência de estimulação de corações isolados reduz tanto a $+dP/dT$ quanto a $-dP/dT$ (Pazos-Moura 2000) e esta redução poderia ser maior nos animais com hipotireoidismo já que nesta enfermidade ocorre uma menor expressão dos RyR e SERCA 2 (Arai et al, 1991; Bluhm et al., 1999; Ohga, 2002).

Em frequências cardíacas mais elevadas ocorrem também alterações hemodinâmicas, com aumento da pressão diastólica final podendo assim alterar a contratilidade ventricular (Pazos-Moura, 2000; Biondi et al, 2002). Também tem sido relatado que o hipotireoidismo altera a estrutura e o funcionamento da circulação coronariana ocasionando redução do fluxo sanguíneo coronariano tanto em condições basais como em resposta a infusão de adenosina (Tang et al, 2005), ao aumento na concentração extracelular de cálcio, a metoxamina e ao Bay K 8644 (Zwaveling et al, 1996). Tang e colaboradores (2005) demonstraram também que animais com hipotireoidismo apresentaram diminuição da densidade de arteríolas coronarianas. Além destas alterações observadas *in vivo* e em preparações de coração isolado existe a possibilidade de que fatores neurohumorais possam também contribuir não só para as alterações no tempo de ejeção e de contração isovolumétrica, mas de outras variáveis cardiovasculares, como frequência cardíaca e pressão arterial, observados no nosso estudo. No hipotireoidismo, estudos demonstram que atividade simpática pode estar

aumentada (Foley, 2001; Nielsen, 1987; Manhem, 1984). Esta atividade aumentada seria fisiologicamente, um mecanismo de compensação a qual minimizaria as alterações cardiovasculares observadas no hipotireoidismo.

Outro fator que poderia contribuir para as diferenças dos dados de ecocardiografia e em preparações de músculo papilar isolado seria as decorrentes do regime anestésico empregado (Schaefer et al, 2005). As diferenças dos dados de ecocardiografia entre o grupo hipotireoideu e controle somente poderiam ser explicadas se o anestésico empregado viessem a exacerbar as disfunções sistólica e diastólica observadas no hipotireoidismo e/ou melhorar a performance cardíaca de animais do grupo controle. Contudo, o exame ecocardiográfico de ratos e camundongos só pode ser realizado com animais anestesiados, impossibilitando portanto a comparação da influência do regime de anestesia nestes parâmetros cardiovasculares. Além disso, em preparações isoladas as velocidades de contração e relaxamento são calculadas em função do tempo e da força produzida o que não foi realizado na avaliação ecocardiográfica.

Em preparações isoladas e também em estudos *in vivo* alteração no processo de acoplamento excitação contração observado no hipotireoidismo, envolve provavelmente o decréscimo da expressão da SERCA2 (Bluhm et al., 1999; Ohga, 2002), aumento nos níveis de fosfolambano (Ojamaa, Kenessey e Klein, 2000), decréscimo da corrente lenta de cálcio (Binah, Rubinstein e Gilat, 1987) e redução da expressão de mRNA que codifica para RyR (Arai et al, 1991). No nosso estudo o aumento do tempo de ejeção e do TRIV observado nos ratos hipotireoideus, pode ser explicada pela redução da velocidade de captação do cálcio pelo retículo, a qual pode ocorrer em consequência da redução dos níveis de SERCA2 e no aumento dos níveis de fosfolambano, o que caracteriza déficit do mecanismo homeométrico de regulação do débito cardíaco (Holt et al., 1999; Ojamaa, Kenessey e Klein, 2000). Segundo Carr e Kranias (2002) e Klein e Ojamaa (2001), a quantidade expressa das proteínas fosfolambano está aumentada e de SERCA2 esta diminuída no hipotireoidismo o que corrobora nossos dados de fibras permeabilizadas com o uso de saponina. Além das alterações no processo de acoplamento excitação contração observadas no

hipotireoidismo, existe a possibilidade de que as alterações de contratilidade possam ocorrer por alteração das proteínas contráteis.

O hormônio tireoidiano regula negativamente a transcrição da β -MHC e positivamente da α -MHC (Machackova et al., 2005). A α -MHC tem alta atividade atpásica e aumenta a contração, melhorando a atividade cardíaca e volume sistólico; a β -MHC por sua vez tem baixa atividade atpásica diminuindo velocidade de encurtamento. 80 a 90% da miosina em adultos são da isoforma α , mas com o envelhecimento e similarmente no hipotireoidismo há uma transcrição da β -MHC mais elevada (Jin et al., 2000; Iemitsu et al., 2003). Essa transcrição elevada de β -MHC pode explicar as alterações de df/dt .

Alteração das proteínas contráteis devido ao hipotireoidismo também pode desencadear déficit na contratilidade miocárdica e conseqüente diminuição da FE, o que foi observado neste estudo. A redução desse parâmetro também se deve ao fato de que o hormônio da tireóide promove efeito positivo na velocidade, na força de contração sistólica, e no tempo de relaxamento no coração (Grossmann et al., 1994; Kahaly et al., 1995; Klein e Ojamaa, 2001; Klein e Danzi, 2007).

Apesar de não estar completamente elucidada, acredita-se que a potenciação pós-pausa seja conseqüência da quantidade de cálcio bombeada pela SERCA2 para dentro do retículo, durante o período em que a preparação é mantida quiescente. Espera-se que no grupo experimental, já que a expressão da SERCA encontra-se diminuída, uma redução das PPP o que não foi observado neste estudo. Também não o foi, no estudo realizado por Thomal (2007), onde os períodos de pausas usadas foram de 15, 45 e 60 segundos. Neste estudo utilizamos pausas de 1, 3, 5, 10 e 20 segundos, confirmando que em ratos, longos períodos de pausas não interferem na potenciação pós pausa (Bassani et al 2004).

A ausência de alteração das PPP do grupo experimental comparado com o grupo controle pode ser explicada pelo aumento da expressão do trocador sódio cálcio nos animais com hipotireoidismo. Dessa forma uma maior quantidade de íons cálcio, a cada ciclo cardíaco, é transportada para fora das células, mantendo uma concentração citosólica deste íon suficiente para produzir uma potenciação

pós-pausa semelhante a dos eutireóideos. Porém alguns autores relatam que a expressão desse trocador está diminuída no hipotireoidismo (Hojo et al., 1997; Boerth e Artman, 1995; Seppet et al., 1993). Nossos resultados sugerem, por outro lado que a expressão do trocador está aumentada no hipotireoidismo. Aumento na expressão do NCX tem sido descrito na literatura (Machackova et al., 2005). O tempo necessário para obtenção do relaxamento total (100 % de relaxamento) de papilares isolados de animais com hipotireoidismo obtida em solução de Ringer normal, apesar de ser menor, não diferiu do valor do grupo controle. Em preparações mantidas em Ringer 0Na-0Ca este parâmetro foi maior, mas não estatisticamente diferente, dos valores controle. Em Ringer normal, o relaxamento muscular é conseqüência da redução da concentração intracelular de íons cálcio, a qual depende basicamente da recaptação de cálcio para o interior do retículo sarcoplasmático realizado pela SERCA e do efluxo desse íon pelo trocador sódio cálcio (Meyer et al, 1999; Brenner e Yu, 1993; Sham et al., 1992). Em Ringer normal, estão atuantes a SERCA e o NCX. Em Ringer 0Na-0Ca o trocador NCX encontra-se bloqueado. Assim, subtraindo-se os valores de tempo para o relaxamento muscular obtidos nesta solução dos valores obtidos quando do bloqueio do trocador, obtém-se a contribuição do trocador para o relaxamento muscular em condições fisiológicas. Este valor foi menor e estatisticamente significativo nos animais com hipotireoidismo. Assim é provável, que no hipotireoidismo a expressão do trocador sódio-cálcio esteja aumentada já que vários trabalhos demonstram que os níveis de SERCA encontram-se reduzido (Gick et al., 1990; Ojamaa et al., 1999). Os dados obtidos nesse trabalho reforçam esta hipótese, pois o tempo de relaxamento de papilares de animais com hipotireoidismo encontra-se, em todas as preparações mensuradas quando o trocador sódio cálcio foi bloqueado pela remoção do sódio e cálcio do extracelular, acima dos valores encontrados nos animais controle. Estes dados sugerem que as alterações diastólicas observadas no hipotireoidismo poderiam ser ainda mais severas e representam um mecanismo importantíssimo para minimizar as alterações cardiovasculares observadas nessa enfermidade.

Em papilares permeabilizados com o uso de saponina observamos diferenças na produção de força após o carregamento do retículo sarcoplasmático com íons cálcio. Os tempos de carregamento utilizados foram de 5, 30, 60 e 120 segundos. Nestes experimentos foi utilizada como índice da quantidade de cálcio armazenada, a contração muscular produzida pela liberação de cálcio dessa organela a qual foi induzida pela cafeína. Encontramos diferenças na produção de força do grupo hipotireoideu em relação ao controle nos tempos de 5, 30 e 60 segundos, sugerindo que o hipotireoideu apresenta diminuição na capacidade de recaptção de cálcio pelo retículo. Essa diminuição pode ser explicada pela diminuição da expressão da SERCA2 decorrente do hipotireoidismo conforme demonstrado por Klein e Ojamaa (2001) e Carr e Kranias (2002). Por outro lado a capacidade de armazenamento de íons cálcio pelo retículo é finita, e a ausência de diferença aos 120 segundos sugere que, neste intervalo de tempo, a capacidade máxima de armazenamento tenha sido alcançada.

Este estudo demonstra que o modelo de hipotireoidismo em ratos, aliado às técnicas de ecocardiografia e de tecidos isolados pode ser muito útil para o entendimento da fisiopatologia a curto e longo prazo desta disfunção tireoidiana.

6 CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste estudo demonstram que além do cronotropismo negativo, o hipotireoidismo induzido por metimazol em ratos, induz disfunções sistólicas e diastólicas. Os resultados dessa pesquisa sugerem, portanto, que as disfunções sistólicas e diastólicas observadas no hipotireoidismo são provavelmente, resultado de uma diminuição da expressão da SERCA2 e estas disfunções são minimizadas pela contribuição maior do NCX para o relaxamento do músculo ventricular.

7 REFERÊNCIAS

1. **Arai M, Otsu K, MacLennan DH, Alpert NR and Periasamy M.** Effect of Thyroid-Hormone on the Expression of Messenger-Rna Encoding Sarcoplasmic-Reticulum Proteins. *Circulation Research* 69: 266-276, 1991.
2. **Babu GJ, Bhupathy P, Petrashevskaya NN, Wang H, Raman S, Wheeler D, Jagatheesan G, Wieczorek D, Schwartz A, Janssen PM, Ziolo MT and Periasamy M.** Targeted overexpression of sarcolipin in the mouse heart decreases sarcoplasmic reticulum calcium transport and cardiac contractility. *J Biol Chem* 281: 3972-3979, 2006.
3. **Babu GJ, Bhupathy P, Carnes CA, Billman GE and Periasamy M.** Differential expression of sarcolipin protein during muscle development and cardiac pathophysiology. *J Mol Cell Cardiol* 43: 215-222, 2007.
4. **Bassani RA, Altamirano J, Puglisi JL, Bers DM.** Action potential duration determines sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ reloading in mammalian ventricular myocytes. *J Physiol* 593-609, 2004.
5. **Bers DM.** Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415: 198-205, 2002.
6. **Bers, DM.** Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. *Kluwer Academic Publishers* 2st ed. Dordrecht, Netherlands, 2002.
7. **Binah O, Rubinstein I and Gilat E.** Effects of thyroid hormone on the action potential and membrane currents of guinea pig ventricular myocytes. *Pflugers Arch* 409: 214-216, 1987.
8. **Biondi B, Palmieri EA, Lombardi G and Fazio S.** Subclinical hypothyroidism and cardiac function. *Thyroid* 12: 505-510, 2002.
9. **Biondi B and Klein I.** Hypothyroidism as a risk factor for cardiovascular disease. *Endocrine* 24: 1-13, 2004.
10. **Bluhm WF, Meyer M, Sayen MR, Swanson EA and Dillmann WH.** Overexpression of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase improves cardiac

- contractile function in hypothyroid mice. *Cardiovascular Research* 43: 382-388, 1999.
11. **Boelaert K and Franklyn JA.** Thyroid hormone in health and disease. *Journal of Endocrinology* 187: 1-15, 2005.
 12. **Boerth SR, Artman M.** Thyroid hormone regulates Na⁺ - Ca²⁺ exchanger expression during postnatal maturation and in adult rabbit ventricular myocardium. *Cardiovascular Research*. 31: E145-E152, 1996.
 13. **Brenner B and Yu LC.** Structural changes in the actomyosin cross-bridges associated with force generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 5252-5256, 1993.
 14. **Brent GA.** The Molecular-Basis of Thyroid-Hormone Action. *New England Journal of Medicine* 331: 847-853, 1994.
 15. **Bridge JH, Smolley JR and Spitzer KW.** The relationship between charge movements associated with ICa and INa-Ca in cardiac myocytes. *Science* 248: 376-378, 1990.
 16. **Burmeister LA, Ganguli M, Dodge HH, Toczek T, DeKosky ST and Nebes RD.** Hypothyroidism and cognition: preliminary evidence for a specific defect in memory. *Thyroid* 11: 1177-1185, 2001.
 17. **Cain BS, Meldrum DR, Joo KS, Wang JF, Meng X, Cleveland JC, Jr., Banerjee A and Harken AH.** Human SERCA2a levels correlate inversely with age in senescent human myocardium. *J Am Coll Cardiol* 32: 458-467, 1998.
 18. **Calaghan SC, Le Guennec JY and White E.** Cytoskeletal modulation of electrical and mechanical activity in cardiac myocytes. *Prog Biophys Mol Biol* 84: 29-59, 2004.
 19. **Cao X, Kambe F, Miyazaki T, Sarkar D, Ohmori S and Seo H.** Novel human ZAK1-4 isoforms: hormonal and tissue-specific regulation and function as calcineurin inhibitors. *Biochem J* 367: 459-466, 2002.

20. **Carr AN and Kranias EG.** Thyroid hormone regulation of calcium cycling proteins. *Thyroid* 12: 453-457, 2002.
21. **Cernohorsky J, Kolar F, Pelouch V, Korecky B, Vetter R.** Thyroid control of sarcolemmal Na⁺/Ca²⁺ exchanger and SR Ca²⁺-ATPase in developing rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 275: H264-H273, 1998.
22. **Clement O, Puceat M, Walsh MP and Vassort G.** Protein kinase C enhances myosin light-chain kinase effects on force development and ATPase activity in rat single skinned cardiac cells. *Biochem J* 285 (Pt 1): 311-317, 1992.
23. **Cingolani HE, Houssay AB.** Fisiologia humana de Houssay. 7. ed., atual. e ampl. Porto Alegre: Artmed, 2004.
24. **Costanzo LS.** Fisiologia. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
25. **Dantzig JA, Goldman YE, Millar NC, Lacktis J and Homsher E.** Reversal of the cross-bridge force-generating transition by photogeneration of phosphate in rabbit psoas muscle fibres. *J Physiol* 451: 247-278, 1992.
26. **Danzi S and Klein I.** Thyroid hormone and blood pressure regulation. *Current Hypertension Reports* 5: 513-520, 2003.
27. **Davis PJ and Davis FB.** Nongenomic actions of thyroid hormone on the heart. *Thyroid* 12: 459-466, 2002.
28. **Delmar M, Ibarra J, Davidenko J, Lorente P and Jalife J.** Dynamics of the Background Outward Current of Single Guinea-Pig Ventricular Myocytes - Ionic Mechanisms of Hysteresis in Cardiac-Cells. *Circulation Research* 69: 1316-1326, 1991.
29. **Devdhar M, Ousman YH and Burman KD.** Hypothyroidism. *Endocrinol Metab Clin North Am* 36: 595-615, v, 2007.
30. **Di Paola R, Alagona C, Pezzino V, Mangiameli S and Regalbuto C.** Left ventricular function in acute hypothyroidism: a Doppler echocardiography

study

13. *Ital Heart J* 5: 857-863, 2004.

31. **Dieckman LJ and Solaro RJ.** Effect of Thyroid Status on Thin-Filament Ca²⁺ Regulation and Expression of Troponin-I in Perinatal and Adult-Rat Hearts. *Circulation Research* 67: 344-351, 1990.
32. **Dudley SC and Baumgarten CM.** Bursting of Cardiac Sodium-Channels After Acute Exposure to 3,5,3'-Triiodo-L-Thyronine. *Circulation Research* 73: 301-313, 1993.
33. **Endo M.** Mechanism of action of caffeine on the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Proc. Jpn. Acad.* 51, 479-484, 1975.
34. **Fazio S, Palmieri EA, Lombardi G and Biondi B.** Effects of thyroid hormone on the cardiovascular system. *Recent Progress in Hormone Research, Vol 59* 59: 31-50, 2004.
35. **Franklyn JA, Daykin J, Droic Z, Farmer M and Sheppard MC.** Long-term follow-up of treatment of thyrotoxicosis by three different methods. *Clin Endocrinol (Oxf)* 34: 71-76, 1991.
36. **Franzini-Armstrong C and Protasi F.** Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiol Rev* 77: 699-729, 1997.
37. **Foley CM, McAllister RM, Hasser EM.** Thyroid status influences baroreflex function and autonomic contributions to arterial pressure and heart rate *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 280:H2061-2069, 2001.
38. **Gaffin RD, Gokulan K, Sacchettini JC, Hewett T, Klevitsky R, Robbins J and Muthuchamy M.** Charged residue changes in the carboxy-terminus of alpha-tropomyosin alter mouse cardiac muscle contractility. *J Physiol* 556: 531-543, 2004.
39. **Gick GG, Melikian J and Ismail-Beigi F.** Thyroidal enhancement of rat myocardial Na,K-ATPase: preferential expression of alpha 2 activity and mRNA abundance. *J Membr Biol* 115: 273-282, 1990.

40. **Gloss B, Trost SU, Bluhm WF, Swanson EA, Clark R, Winkfein R, Janzen KM, Giles W, Chassande O, Samarut J and Dillmann WH.** Cardiac ion channel expression and contractile function in mice with deletion of thyroid hormone receptor alpha or beta. *Endocrinology* 142: 544-550, 2001.
41. **Godt RE & Lindley BD.** Influence of temperature upon contractile activation and isometric force production in mechanically skinned muscle fibers of the frog. *J Gen Physiol* 80: 279-297, 1982.
42. **Gordon AM, Homsher E and Regnier M.** Regulation of contraction in striated muscle. *Physiological Reviews* 80: 853-924, 2000.
43. **Grossmann G, Wieshammer S, Keck FS, Goller V, Giesler M and Hombach V.** Doppler-Echocardiographic Evaluation of Left-Ventricular Diastolic Function in Acute Hypothyroidism. *Clinical Endocrinology* 40: 227-233, 1994.
44. **Hanna FW and Scanlon MF.** Hyponatraemia, hypothyroidism, and role of arginine-vasopressin. *Lancet* 350: 755-756, 1997.
45. **Harvey CB and Williams GR.** Mechanism of thyroid hormone action. *Thyroid* 12: 441-446, 2002.
46. **Heymann WR.** Cutaneous manifestations of thyroid disease. *J Am Acad Dermatol* 26: 885-902, 1992.
47. **Hiroi Y, Kim HH, Ying H, Furuya F, Huang ZH, Simoncini T, Noma K, Ulek K, Nguyen NH, Scanlan TS, Moskowitz MA, Cheng SY and Liao JK.** Rapid nongenomic actions of thyroid hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 14104-14109, 2006.
48. **Hojo Y, Ikeda U, Tsuruya Y, Ebata H, Murata M, Okada K, Saito T, Shimada K.** Thyroid hormone stimulates Na⁺-Ca²⁺ exchanger expression in rat cardiac myocytes. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 29: 75-80, 1997
49. **Holt E, Sjaastad I, Lunde PK, Christensen G and Sejersted OM.** Thyroid hormone control of contraction and the Ca²⁺-ATPase/phospholamban

- complex in adult rat ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 31: 645-656, 1999.
50. **Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, Tanabe T, Takanashi M, Matsuda M and Yamaguchi I.** Exercise training improves cardiac function-related gene levels through thyroid hormone receptor signaling in aged rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H1696-H1705, 2004.
51. **Imai T, Hirata Y, Iwashina M and Marumo F.** Hormonal regulation of rat adrenomedullin gene in vasculature. *Endocrinology* 136: 1544-1548, 1995.
52. **Incerpi S.** Thyroid hormones: Rapid reply by surface delivery only. *Endocrinology* 146: 2861-2863, 2005.
53. **Jakab G, Kiss E, Kranias EG and Edes I.** Effect of Thyroid Status on Basal Phosphorylation of Cardiac Myofibrillar Phosphoproteins in Rats. *Cardioscience* 5: 19-24, 1994.
54. **Jin H, Yang R, Li W, Lu H, Ryan AM, Ogasawara AK, Van Peborgh J and Paoni NF.** Effects of exercise training on cardiac function, gene expression, and apoptosis in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H2994-H3002, 2000.
55. **Kahaly G, Mohrkahaly S, Beyer J and Meyer J.** Left-Ventricular Function Analyzed by Doppler and Echocardiographic Methods in Short-Term Hypothyroidism. *American Journal of Cardiology* 75: 645-648, 1995.
56. **Kahaly GJ.** Cardiovascular and atherogenic aspects of subclinical hypothyroidism. *Thyroid* 10: 665-679, 2000.
57. **Kiss E, Jakab G, Kranias EG and Edes I.** Thyroid Hormone-Induced Alterations in Phospholamban Protein Expression - Regulatory Effects on Sarcoplasmic-Reticulum Ca²⁺ Transport and Myocardial Relaxation. *Circulation Research* 75: 245-251, 1994.
58. **Klein I.** Thyroid hormone and the cardiovascular system. *Am J Med* 88: 631-637, 1990.

59. **Klein I and Ojamaa K.** Thyroid hormone and the cardiovascular system: from theory to practice. *J Clin Endocrinol Metab* 78: 1026-1027, 1994.
60. **Klein I and Ojamaa K.** Mechanisms of disease: Thyroid hormone and the cardiovascular system. *New England Journal of Medicine* 344: 501-509, 2001.
61. **Klein I and Danzi S.** Thyroid disease and the heart. *Circulation* 116: 1725-1735, 2007.
62. **Knollmann BC and Roden DM.** A genetic framework for improving arrhythmia therapy. *Nature* 451: 929-936, 2008.
63. **Kuzman JA, Gerdes AM, Kobayashi S and Liang Q.** Thyroid hormone activates Akt and prevents serum starvation-induced cell death in neonatal rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 39: 841-844, 2005.
64. **Landowne D.** Fisiologia Celular. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill Intramericana do Brasil, 2007.
65. **Ladenson PW, Goldenheim PD and Ridgway EC.** Prediction and reversal of blunted ventilatory responsiveness in patients with hypothyroidism. *Am J Med* 84: 877-883, 1988.
66. **Launikonis BS, Stephenson DG.** Effect of saponin treatment on the sarcoplasmic reticulum of rat, cane toad and crustacean (yabby) skeletal muscle. *Journal of Physiology-London* 504:425-437, 1997.
67. **Lewicki JA, Protter AA.** Physiological studies of the natriuretic peptide family. In: Laragh JH, Brenner BM, eds. Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management. New York: *Raven Press*; 1029–1053, 1995.
68. **Lefkowitz RJ.** G protein-coupled receptors and receptor kinases: from molecular biology to potential therapeutic applications. *Nat Biotechnol* 14: 283-286, 1996.
69. **Lewinter MM and Vanburen P.** Myofilament remodeling during the progression of heart failure. *J Card Fail* 8: S271-S275, 2002.

70. **Maack C and O'Rourke B.** Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics. *Basic Res Cardiol* 102: 369-392, 2007.
71. **Machackova J, Barta J and Dhalla NS.** Molecular defects in cardiac myofibrillar proteins due to thyroid hormone imbalance and diabetes. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 83: 1071-1091, 2005.
72. **Mangoni ME and Nargeot J.** Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol Rev* 88: 919-982, 2008.
73. **Manhem P.** Plasma Noradrenaline and Blood-Pressure in Hypothyroid Patients - Effect of Gradual Thyroxine Treatment. *Clinical Endocrinology* 20-6:701-707, 1984.
74. **Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Cicogna AC and Janicki JS.** Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H1534-H1539, 2000.
75. **Mattiazzi AR.** Músculo esquelético, cardíaco e liso. In *Fisiologia Humana de Houssay*, eds. Cingolani HE, Houssay AB. & cols., pp. 78-112. Artmed, 2004.
76. **Meyer M, Bluhm WF, He HP, Post SR, Giordano FJ, Lew WYW and Dillmann WH.** Phospholamban-to-SERCA2 ratio controls the force-frequency relationship. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 276: H779-H785, 1999.
77. **Minamisawa S, Wang Y, Chen J, Ishikawa Y, Chien KR and Matsuoka R.** Atrial chamber-specific expression of sarcolipin is regulated during development and hypertrophic remodeling. *J Biol Chem* 278: 9570-9575, 2003.
78. **Mittmann K, Jaquet K and Heilmeyer LM, Jr.** A common motif of two adjacent phosphoserines in bovine, rabbit and human cardiac troponin I. *FEBS Lett* 273: 41-45, 1990.
79. **Mohrman DE, Heller LJ.** *Fisiologia cardiovascular.* São Paulo: Mc Graw Hill. 6.ed, 2007.

80. **Molina PE.** Fisiologia endócrina. São Paulo: Mc Graw Hill Interamericana do Brasil. 2.ed, 2007.
81. **Morkin E.** Regulation of myosin heavy chain genes in the heart. *Circulation* 87: 1451-1460, 1993.
82. **Muthuchamy M, Grupp IL, Grupp G, O'Toole BA, Kier AB, Boivin GP, Neumann J and Wieczorek DF.** Molecular and physiological effects of overexpressing striated muscle beta-tropomyosin in the adult murine heart. *J Biol Chem* 270: 30593-30603, 1995.
83. **Mylotte KM, Cody V, Davis PJ, Davis FB, Blas SD and Schoeni M.** Milrinone and Thyroid-Hormone Stimulate Myocardial Membrane Ca-2+-Atpase Activity and Share Structural Homologies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82: 7974-7978, 1985.
84. **Nielsen HV, Hasselstrom K, Feldtrasmussen U, Mehlsen J, Siersbaeknielsen K, Friis T, Haunso S, Trapjensen J.** Increased Sympathetic Tone in Forearm Subcutaneous Tissue in Primary Hypothyroidism. *Clinical Physiology*, 7:4 297, 302, 1987.
85. **Noland TA, Jr. and Kuo JF.** Protein kinase C phosphorylation of cardiac troponin I or troponin T inhibits Ca²⁺(+)-stimulated actomyosin MgATPase activity. *J Biol Chem* 266: 4974-4978, 1991.
86. **Netter FH.** Atlas de Anatomia Humana. Porto Alegre: Artmed, 1999.
87. **O'Brien T, Dinneen SF, O'Brien PC and Palumbo PJ.** Hyperlipidemia in patients with primary and secondary hypothyroidism. *Mayo Clin Proc* 68: 860-866, 1993.
88. **Ogawa Y.** Role of ryanodine receptors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 29: 229-274, 1994.

89. **Ohga Y, Sakata S, Takenaka C, Abe T, Tsuji T, Taniguchi S and Takaki M.** Cardiac dysfunction in terms of left ventricular mechanical work and energetics in hypothyroid rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 283: H631-H641, 2002.
90. **Ojamaa K, Klemperer JD and Klein I.** Acute effects of thyroid hormone on vascular smooth muscle. *Thyroid* 6: 505-512, 1996.
91. **Ojamaa K, Sabet A, Kenessey A, Shenoy R and Klein I.** Regulation of rat cardiac Kv1.5 gene expression by thyroid hormone is rapid and chamber specific. *Endocrinology* 140: 3170-3176, 1999.
92. **Ojamaa K, Kenessey A and Klein I.** Thyroid hormone regulation of phospholamban phosphorylation in the rat heart. *Endocrinology* 141: 2139-2144, 2000.
93. **Pantos C, Dritsas A, Mourouzis L, Dimopoulos A, Karatasakis G, Athanassopoulos G, Mavrogeni S, Manginas A and Cokkinos DV.** Thyroid hormone is a critical determinant of myocardial performance in patients with heart failure: potential therapeutic implications. *European Journal of Endocrinology* 157: 515-520, 2007.
94. **Pazos-Moura C, Abel DE, Boers M, Moura E, Hampton TG, Wang J, Morgan JP, Wondisford FE.** Cardiac Dysfunction by Myocardium-Specific Expression of a Mutant Thyroid Hormone Receptor. *Circ. Res.* 86:700-706, 2000.
95. **Periasamy M, Bhupathy P and Babu GJ.** Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. *Cardiovasc Res* 77: 265-273, 2008.
96. **Perry SV.** Troponin I: inhibitor or facilitator. *Mol Cell Biochem* 190: 9-32, 1999.
97. **Polikar R, Burger AG, Scherrer U and Nicod P.** The Thyroid and the Heart. *Circulation* 87: 1435-1441, 1993.
98. **Pinto VS, Sousa VP, Cameron LC.** As bases estruturais e moleculares da contração muscular. *Fisioterapia Brasil*. Vol 5. Num. 4. 298- 306, 2004.

99. **Rayment I, Holden HM, Whittaker M, Yohn CB, Lorenz M, Holmes KC and Milligan RA.** Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* 261: 58-65, 1993.
100. **Reed TD, Babu GJ, Ji Y, Zilberman A, Ver HM, Wuytack F and Periasamy M.** The expression of SR calcium transport ATPase and the Na(+)/Ca(2+)Exchanger are antithetically regulated during mouse cardiac development and in Hypo/hyperthyroidism. *J Mol Cell Cardiol* 32: 453-464, 2000.
101. **Reiser PJ, Portman MA, Ning XH and Schomisch MC.** Human cardiac myosin heavy chain isoforms in fetal and failing adult atria and ventricles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H1814-H1820, 2001.
102. **Rudinger A, Mylotte KM, Davis PJ, Davis FB and Blas SD.** Rabbit Myocardial Membrane Ca-2+-Adenosine Triphosphatase-Activity - Stimulation Invitro by Thyroid-Hormone. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 229: 379-385, 1984.
103. **Sahin M, Guvener ND, Ozer F, Sengul A, Ertugrul D and Tutuncu NB.** Thyroid cancer in hyperthyroidism: incidence rates and value of ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy in this patient group. *J Endocrinol Invest* 28: 815-818, 2005.
104. **Sala-Roca J, Marti-Carbonell MA, Garau A, Darbra S and Balada F.** Effects of dysthyroidism in plus maze and social interaction tests. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 72: 643-650, 2002.
105. **Sande JB, Sjaastad I, Hoen IB, Bokenes J, Tonnessen T, Holt E, Lunde PK and Christensen G.** Reduced level of serine(16) phosphorylated phospholamban in the failing rat myocardium: a major contributor to reduced SERCA2 activity. *Cardiovasc Res* 53: 382-391, 2002.
106. **Schaefer A, Meyer GP, Brand B, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H, Klein G.** Effects of Anesthesia on Diastolic Function in Mice Assessed by Echocardiography. *Echocardiography* 22:665-670, 2005.
107. **Schaub MC, Hefti MA, Harder BA and Eppenberger HM.** Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. *J Mol Med* 75: 901-920, 1997.

108. **Scheidt S.** Basic electrocardiography. 1 ed., West Caldwell: CIBA-GEIGY Pharmaceuticals, 1986.
109. **Schmidt U, del Monte F, Miyamoto MI, Matsui T, Gwathmey JK, Rosenzweig A and Hajjar RJ.** Restoration of diastolic function in senescent rat hearts through adenoviral gene transfer of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. *Circulation* 101: 790-796, 2000.
110. **Seppet EK, Kolar F, Dixon IMC, Hata T, Dhalla NS.** Regulation of cardiac sarcolemmal Ca²⁺ channels and Ca²⁺ transporters by thyroid hormone. *Molecular and Cellular Biochemistry* 129: 145-159, 1993.
111. **Shafer RB, Prentiss RA and Bond JH.** Gastrointestinal transit in thyroid disease. *Gastroenterology* 86: 852-855, 1984.
112. **Sham JS, Cleemann L and Morad M.** Gating of the cardiac Ca²⁺ release channel: the role of Na⁺ current and Na(+)-Ca²⁺ exchange. *Science* 255: 850-853, 1992.
113. **Shenoy R, Klein I, Ojamaa K.** Differential regulation of SR calcium transporters by thyroid hormone in rat atria and ventricles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1690-H1696, 2001.
114. **Siafakas NM, Salesiotou V, Filaditaki V, Tzanakis N, Thalassinos N and Bouros D.** Respiratory muscle strength in hypothyroidism. *Chest* 102: 189-194, 1992.
115. **Spudich JA.** How molecular motors work. *Nature* 372: 515-518, 1994.
116. **Sucharov CC, Mariner P, Long C, Bristow M and Leinwand L.** Yin Yang 1 is increased in human heart failure and represses the activity of the human alpha-myosin heavy chain promoter. *J Biol Chem* 278: 31233-31239, 2003.
117. **Sun ZQ, Ojamaa K, Coetzee WA, Artman M and Klein I.** Effects of thyroid hormone on action potential and repolarizing currents in rat ventricular myocytes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 278: E302-E307, 2000.

118. **Taddei S, Caraccio N, Viridis A, Dardano A, Versari D, Ghiadoni L, Salvetti A, Ferrannini E and Monzani F.** Impaired endothelium-dependent vasodilatation in subclinical hypothyroidism: beneficial effect of levothyroxine therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 3731-3737, 2003.
119. **Tang YD, Kuzman JA, Said S, Anderson BE, Wang XJ, Gerdes AM.** Low thyroid function leads to cardiac atrophy with chamber dilatation, impaired myocardial blood flow, loss of arterioles, and severe systolic dysfunction. *Circulation* 112(20):3122-30, 2005.
120. **Tei C, Nishimura RA, Seward JB and Tajik AJ.** Noninvasive Doppler-derived myocardial performance index: Correlation with simultaneous measurements of cardiac catheterization measurements. *Journal of the American Society of Echocardiography* 10: 169-178, 1997.
121. **Thomal RA.** Avaliação da função cardíaca em modelo experimental de hipotireoidismo. *Tese apresentada ao programa de pós-graduação em saúde da criança e do adolescente – UFPR, 2007.*
122. **Valente M, De Santo C, de Martino RP, Di M, V, Di Meo S and De Leo T.** The direct effect of the thyroid hormone on cardiac chronotropism. *Arch Int Physiol Biochim* 97: 431-440, 1989.
123. **van der MP, Voors AA, Lipsic E, van Gilst WH and van Veldhuisen DJ.** Erythropoietin in cardiovascular diseases. *Eur Heart J* 25: 285-291, 2004.
124. **Vassallo PF, Stefanon I, Rossoni LV, Tucci PJ and Vassallo DV.** The left ventricular contractility of the rat heart is modulated by changes in flow and alpha 1-adrenoceptor stimulation. *Braz J Med Biol Res* 31: 1353-1359, 1998.
125. **Vitale G, Galderisi M, Lupoli GA, Celentano A, Pietropaolo I, Parenti N, De Divitiis O and Lupoli G.** Left ventricular myocardial impairment in subclinical hypothyroidism assessed by a new ultrasound tool: Pulsed tissue Doppler. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87: 4350-4355, 2002.
126. **Walker JD, Crawford FA, Kato S and Spinale FG.** The novel effects of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on myocyte contractile function and beta-

- adrenergic responsiveness in dilated cardiomyopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 108: 672-679, 1994.
127. **Winegrad S.** Autoradiographic studies of intracellular calcium in frog skeletal muscle. *J Gen Physiol* 48: 455-479, 1965.
128. **Wright CE, Haddad F, Qin AX, Bodell PW and Baldwin KM.** In vivo regulation of beta-MHC gene in rodent heart: role of T3 and evidence for an upstream enhancer. *Am J Physiol* 276: C883-C891, 1999.
129. **Wyatt HL, Heng MK, Meerbaum S.** Cross-sectional echocardiography. II Analysis of mathematic models for quantifying volume of the famalin-fixed left ventricle. *Circulation*, 61:1119, 1980.
130. **Zhang R, Zhao J, Mandveno A and Potter JD.** Cardiac troponin I phosphorylation increases the rate of cardiac muscle relaxation. *Circ Res* 76: 1028-1035,1995.
131. **Zwaveling J, Batink HD, Jong J, Prins EAW, Pfaffendorf M, Zwieten PA.** Thyroid hormone modulates inotropic responses, α -adrenoceptor density and catecholamine concentrations in the rat heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 354:755-764, 1996.