

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LEANDRO TEIXEIRA PARANHOS LOPES

**EFEITOS CARDIOVASCULARES DO HIPERTIREOIDISMO
EXPERIMENTAL, DO TREINAMENTO FÍSICO E DE SUA
ASSOCIAÇÃO EM RATOS WISTAR**

Uberlândia

2010

LEANDRO TEIXEIRA PARANHOS LOPES

**EFEITOS CARDIOVASCULARES DO HIPERTIREOIDISMO
EXPERIMENTAL, DO TREINAMENTO FÍSICO E DE SUA
ASSOCIAÇÃO EM RATOS WISTAR.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Elmiro Santos Resende

UBERLÂNDIA

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

L864e Lopes, Leandro Teixeira Paranhos, 1981-
 Efeitos cardiovasculares do hipertireoidismo experimental, do
 treinamento físico e de sua associação em ratos Wistar [manuscrito] /
 Leandro Teixeira Paranhos Lopes. - 2010.
 63 f. : il.

 Orientador: Elmiro Santos Resende.

 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

 Inclui bibliografia.

 1. Exercícios físicos - Aspectos fisiológicos. 2. Hipertireoidismo -
 Teses. 3. Coração - Hipertrofia - Teses. I. Resende, Elmiro Santos.
 II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Gradua-
 ção em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 612.766.1

LEANDRO TEIXEIRA PARANHOS LOPES

**EFEITOS CARDIOVASCULARES DO HIPERTIREOIDISMO
EXPERIMENTAL, DO TREINAMENTO FÍSICO E DE SUA
ASSOCIAÇÃO EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós Graduação em
Ciências da Saúde da Faculdade de
Medicina da Universidade Federal de
Uberlândia, como parte das
exigências para obtenção do título de
mestre em Ciências da Saúde.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Otoni Moreira Gomes (UFMG)

Prof. Dr. José Antônio Galo (UFU)

Prof. Dr. Gilmar da Cunha Sousa (UFU)

Prof. Dr. Elmiro Santos Resende (UFU) (Presidente)

À **Deus**, pela vida e pela força que me proporcionou, estando sempre comigo nas horas fáceis e nas difíceis, mas o mais importante, está comigo mesmo quando não estou perto dele.

À minha noiva **Karine de Moraes Carrijo** que sem dúvida lutou comigo e abdicou muitas vezes de suas próprias vontades para que as minhas fossem realizadas.

À **minha mãe, meu pai e minha irmã**, esses anjos que sem dúvida estão sempre comigo em qualquer momento, em qualquer lugar a qualquer hora.

AGRADECIMENTOS

Aos meus **ratinhos** que foram fundamentais na concretização deste trabalho.

Ao meu orientador, **Elmiro Santos Resende** que acreditou em meu trabalho desde o início e que além de um grande doutor é também um grande amigo e foi fundamental para o enriquecimento do trabalho.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Uberlândia pela importante contribuição dada a minha formação.

Ao meu eterno professor, incentivador, amigo e “pai” **Alexandre Gonçalves**, que além de todo seu conhecimento a mim proporcionado, foi fundamental para conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos, **Fernanda Rodrigues de Sousa e Gerald Alex Ferreira** que renunciaram suas madrugadas de sono para participar e ajudar neste trabalho.

À minha amiga **Juliana Souza Andréo**, minha companheira de classe, que sempre me ouviu nos meus momentos de angústia, tristeza e alegrias e com sua paciência e delicadeza me ajudou.

Aos meus amigos técnicos do laboratório, **Estáquio e Antônio**, que me ensinaram muito nesta caminhada.

À professora **Kelly Douat Godoy**, **Universidade Presidente Antônio Carlos** e aos professores **Alexandre Mendonça Ribeiro e Deborah Cristina Mendonça do Instituto Passo 1 de Pós Graduação**, pela contribuição dada à minha carreira acadêmica.

“Determinação coragem e auto confiança
são fatores decisivos para o sucesso.
Se estamos possuídos por uma inabalável
determinação conseguiremos superá-los.
Independentemente das circunstâncias,
devemos ser sempre humildes, prudente
e despidos de orgulho”

Dalai lama

“Que o teu trabalho seja perfeito para que, mesmo
depois da tua morte, ele permaneça”

Leonardo da Vinci

RESUMO

A hipertrofia cardíaca é um dos componentes do remodelamento cardíaco e implica em modificações da estrutura geométrica, da composição bioquímica, da geração e condução elétricas, do volume das células musculares, da organização do colágeno e dos vasos sanguíneos. O excesso do hormônio tireoidiano provoca alterações hemodinâmicas e hipertrofia cardíaca, porém os efeitos de sua associação com o exercício físico ainda não estão esclarecidos. O presente estudo teve como objetivo analisar as respostas cardiovasculares no hipertireoidismo experimentalmente induzido, no treinamento físico aeróbico e na sua associação em ratos. Foram submetidos, em estudo experimental randomizado, 38 ratos Wistar divididos em 4 grupos: exercício (E), hormônio tireoidiano e exercício (HTE), hormônio tireoidiano (HT) e controle (C). Avaliou-se a resposta da frequência cardíaca e da pressão arterial antes e após o período de intervenção e os resultados foram comparados em cada grupo e entre eles. O peso úmido do coração e do VE foi obtido ao final do experimento e comparado entre os grupos. Também nesta fase foi realizada a medida do diâmetro transversal dos cardiomiócitos e os resultados igualmente comparados entre os grupos. Os resultados demonstraram que a FC de repouso pós intervenção do grupo E foi mais baixa em comparação a todos os grupos. A FC do grupo E diminuiu e nos outros grupos aumentou ao final do estudo. Não houve alteração na PA. No que se refere aos cardiomiócitos, os grupos E, HTE e HT apresentaram hipertrofia em comparação ao C. Conclui-se, portanto, que o hormônio tireoidiano isoladamente ou em associação com o exercício físico promove aumento da FC. O treinamento físico não foi capaz de reduzir a FC na presença do HT. Os diâmetros celulares medidos foram maiores nos grupos E, HTE e HT em comparação ao grupo C. Não houve diferença quando foi feita a comparação entre os grupos E, HTE e HT.

Palavras-chave: Treinamento físico. Hormônio tireoideano. Efeitos cardiovasculares

ABSTRACT

Cardiac hypertrophy is a component of cardiac remodeling and involves changes in the geometric structure, composition biochemistry, electrical generation and conduction, the volume of muscle cells, the organization of collagen and blood vessels. Excess thyroid hormone causes cardiac hypertrophy and hemodynamic side effects, but its association with physical exercise remains unclear. This study aimed to examine the cardiovascular responses to experimentally induced hyperthyroidism in physical training and their combination in rats. Thirty eight Wistar rats were randomized to four experimental groups: exercise (E), thyroid hormone and exercise (HTE), thyroid hormone (TH) and control (C). We evaluated the response of heart rate (HR) and blood pressure (BP) before and after intervention in each group and between them. The wet weight of heart and the LV was obtained at the end of the experiment and compared between groups. Also in this phase was evaluated by measuring the transverse diameter of cardiomyocytes and the results also compared between groups. The results showed that HR in group E was lower at rest compared to all groups. The HR decreased in group E and increased in the other groups at the end of the study. There was no change in BP. The diameter of cardiomyocytes increased in groups E, HT and HTE when it was compared to C. We conclude that the thyroid hormone alone or in combination with physical exercise promotes increased heart rate. Physical training was not able to reduce HR in the presence of HT. There was no difference between groups E, HTE and HT.

Keywords: Physical training. Thyroid hormone. Cardiovascular Effects

LISTA DE IMAGENS

Imagem 1: Aferição da PA e FC no esfigmomâmetro adaptado para ratos.....	29
Imagem 2: Pressão de pulso obtida através do esfigmomanômetro de cauda adaptado para ratos.....	30
Imagem 3: Pressão arterial obtida em imagem através do esfigmomanômetro de cauda adaptado para ratos	30
Imagem 4: Frequência cardíaca obtida em imagem através do esfigmomanômetro de cauda adaptado para ratos.	31
Imagem 5: Treinamento físico na água.	33
Imagem 6: Treinamento físico na água	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração dos níveis plasmáticos de T3 e T4 após seis semanas de intervenção	37
Tabela 2: Peso Corporal antes e após seis semanas de intervenção.....	38
Tabela 3: Valores da pressão arterial e da frequência cardíaca antes e após seis semanas de intervenção.	39
Tabela 4: Diâmetro dos cardiomiócitos após seis semanas de intervenção	41
Tabela 5: Peso total do coração e o peso do ventrículo esquerdo após seis semanas de intervenção.....	42

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Níveis plásmaticos do T_3 e T_4 após seis semanas de intervenção	37
Gráfico 2: Peso corporal antes e após seis semanas de intervenção	38
Gráfico 3: Valores da pressão arterial antes e após seis semanas de intervenção	40
Gráfico 4: Valores da frequência cardíaca antes e após seis semanas de intervenção	40
Gráfico 5: Diâmetro dos cardiomiócitos após seis semanas de intervenção.....	41
Gráfico 6: Peso total do coração e do ventrículo esquerdo após seis semanas de intervenção	42

LISTA DE ABREVIATURAS

DC= Débito cardíaco

FC= Frequência cardíaca

HC= Hipertrofia cardíaca

HT= Hormônio tireoidiano

IC= Insuficiência cardíaca

PA= Pressão Arterial

PAS= Pressão arterial sistólica

PC= Peso corporal

RVS= Resistência vascular sistêmica

T3= Triiodotironina

T4= Tetraiodotironina (tiroxina)

TR= Receptor do hormônio tireoideano

TRE= Elemento responsivo de T₃

TSH= Tireotrofina

VD= Ventrículo direito

VE= Ventrículo esquerdo

VS= Volume sistólico

SERCA2= Ca²⁺-ATPase

MHC= Cadeia pesada de miosina

Src= Receptores esteroidais

Fak= Quinase de adesão focal

ERK1/2= Quinase reguladora de sinais extracelulares

MAPK= Proteínas quinases ativadas por mitógenos

mTOR= mammalian target of Rapamycin

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE IMAGENS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE GRÁFICOS	12
LISTA DE ABREVIATURAS	13
1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Hipertrofia Cardíaca	14
1.2 Exercício Físico e Resposta Cardiovascular	17
1.3 Exercício e Hipertrofia Cardíaca	19
1.4 Hipertireodismo	21
1.5 Hipertireoidismo e Hipertrofia Cardíaca	23
1.6 Justificativa	25
2 OBJETIVO GERAL	26
2.1 Objetivos Específicos	26
3 DELINEAMENTO DO ESTUDO	27
3.1 Animais	27
3.2 Desenho esquemático do protocolo experimental	27
3.3 Adaptação ao treinamento físico e ao Power Lab.	28
3.4 Protocolo Experimental	28
3.5 Pesagem dos animais e do coração	34
3.7 Análises microscópicas da fibra muscular cardíaca.	35
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5 RESULTADOS	37
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÃO	55

REFERÊNCIAS	56
ANEXO A. Passo a passo da preparação histológica.....	62
ANEXO B. Imagens dos cortes histológicos	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipertrofia Cardíaca

A hipertrofia cardíaca (HC) é um dos componentes do remodelamento cardíaco que implica em modificações da estrutura geométrica, da composição bioquímica, da geração e condução elétrica, do volume das células musculares, da organização do colágeno e dos vasos sanguíneos. Ela decorre de alterações de ordem genética, humoral e molecular que podem surgir espontaneamente ou serem induzidas por mecanismos estressores de diferentes tipos e com formas variadas de ação (COHN *et al.*, 2000).

Um aspecto frequentemente encontrado no remodelamento hipertrófico cardíaco é o aumento da massa do órgão que ocorre devido ao incremento de volume dos cardiomiócitos e/ou dos seus componentes proteicos, da matriz de colágeno e do número e extensão dos vasos sanguíneos (VASSALO; LIMA, 1993)

As alterações dos cardiomiócitos encontradas na hipertrofia são o resultado do aumento do volume celular, uma vez que eles pouco se dividem após o nascimento (SWYNGHEDAUW, 1999). Em contraste, as células fibroblásticas e endoteliais apresentam hiperplasia e hipertrofia e são acompanhadas por aumento dos diversos componentes intersticiais.

Diante disso, pode-se dizer que a HC constitui um importante componente no processo de remodelamento cardíaco, podendo decorrer de condições fisiológicas ou patológicas.

Independentemente de sua etiologia, a HC desempenha, em suas fases iniciais, um papel compensatório que tenta normalizar o estresse da parede cardíaca com o intuito de manter a função da bomba ventricular (MILL; VASSALO, 2001; BING *et al.*, 2002). Dependendo da composição mais ou menos equilibrada dos elementos musculares e intersticiais da HC ela pode evoluir de forma fisiológica ou patológica, respectivamente. Na perspectiva geométrica da HC, ela pode adquirir um padrão concêntrico ou excêntrico em relação à cavidade do órgão. Estes dois padrões de hipertrofia apresentam diferentes características estruturais, morfológicas, bioquímicas e moleculares (MILL; VASSALO, 2001; MCMULLEN; JENNINGS, 2007).

É preciso entender que, mesmo em condições fisiológicas, pode ocorrer tanto hipertrofia concêntrica quanto excêntrica. A primeira pode ser desencadeada por treinamento físico resistido ocorrendo em consequência da sobrecarga de pressão imposta. A segunda forma pode aparecer em indivíduos em treinamento dinâmico ou aeróbico e o padrão hemodinâmico observado é caracterizado por aumento da frequência cardíaca (FC) e do volume sistólico (VS) com consequente incremento do débito cardíaco (DC). Estes componentes provocam sobrecarga do tipo volumétrico (OLIVEIRA; KRIEGER, 2002).

Em alguns estados patológicos, a hipertrofia excêntrica que acompanha a sobrecarga crônica de volume imposta pela insuficiência mitral ou aórtica, por exemplo, provoca aumento do diâmetro interno do ventrículo esquerdo (VE) pela adição de sarcômeros dispostos em série. Este padrão de HC se acompanha, nas fases mais avançadas, de aumento desproporcional do estroma e adquire padrão de hipertrofia excêntrica patológica. Ao contrário, a

hipertrofia concêntrica derivada da sobrecarga de pressão que aparece, por exemplo, na hipertensão arterial é associada ao espessamento da parede do VE com diminuição da cavidade interna ventricular que ocorre por adição de sarcômeros em paralelo (OLIVEIRA; KRIEGER, 2002).

O hormônio tireoideano (HT) em excesso pode promover esses dois padrões de hipertrofia acima descritos (hipertrofia cardíaca mista). Esta resposta parece decorrer, em parte, da sobrecarga de volume em função do aumento do retorno venoso produzido pelo HT. Em certas circunstâncias, porém, o HT pode causar também hipertrofia concêntrica e insuficiência cardíaca (IC) (KLEIN; OJAMAA, 2001; DILLMANN, 2010).

Os mecanismos de sinalização envolvidos na HC, na falência de bomba ventricular e na morte celular (necrose e apoptose) têm naturezas diversas (bioquímica, mecânica ou iônica). Estes mecanismos envolvidos na HC ativam receptores no sarcolema que, ao traduzir e amplificar os sinais, envolvem a participação de segundos mensageiros que funcionam como intermediários na comunicação entre os estímulos extracelulares e os fatores de transcrição específicos modificando a síntese proteica e conduzindo à hipertrofia. (FRANCHINI, 2002; SCHLUTER; WOLLERT, 2004; ROHINI, AGRAWAL *et al.*, 2010).

Fica evidente, portanto, que existem múltiplos fatores extracelulares e vias de sinalização envolvidas na HC.

1.2 Exercício Físico e Resposta Cardiovascular

Como visto anteriormente, a HC pode apresentar padrões fisiológicos ou patológicos. O treinamento físico, dentro de limites razoáveis, induz HC do tipo fisiológica. Esta adaptação melhora o desempenho do sistema cardiovascular que permite ao coração suportar aumentos da demanda durante o exercício e é acompanhada por incremento do tempo de enchimento ventricular e da fração de ejeção com consequente diminuição da FC de repouso (VASSALO; LIMA, 1993; MCARDLE *et al.*, 1998; MEDEREIROS *et al.*, 2000; EVANGELISTA *et al.*, 2003).

A pressão arterial (PA) é componente importante na regulação hemodinâmica e sofre influência direta do DC e da resistência vascular periférica. Quaisquer alterações nestes fatores interferem, por sua vez, na resposta pressórica. Em indivíduos com hipertensão arterial, o controle barorreflexo da FC e da atividade simpática estão diminuídos, o que leva à menor eficiência dos mecanismos regulatórios e piora a modulação reflexa da PA (LATERZA *et al.*, 2008).

Já foi relatado que o exercício físico desenvolvido a 55% do $\text{VO}_2\text{máx}$ reduz a pressão arterial em ratos hipertensos. O principal mecanismo hemodinâmico envolvido nesta resposta é a redução do DC em função da diminuição da FC de repouso (GAVA *et al.*, 1995). Além disso, o treinamento físico restaura a sensibilidade do reflexo pressorreceptor e cardiopulmonar que se encontra reduzida em indivíduos hipertensos (SILVA *et al.*, 1997).

Embora estas respostas ocorram em indivíduos hipertensos, elas ainda não estão totalmente demonstradas em normotensos (NEGRÃO *et al.*,

1994). Medeiros *et al.*, (2000) estudaram o efeito do treinamento físico (natação) sobre o sistema cardiovascular em ratos normotensos. Os animais foram treinados durante oito semanas com uma sobrecarga de trabalho correspondente a 5% do peso corporal, em sessões com duração de 60 minutos. Nestas condições experimentais não foi observada redução da PA. Este mesmo padrão de resposta da PA foi observado em outro estudo no qual se utilizou treinamento físico com regimes de duração, intensidade e frequência variadas (EVANGELISTA *et al.*, 2003).

Existe uma relação inversa da capacidade funcional com a morbidade e mortalidade de causa cardiovascular. Pessoas fisicamente ativas têm menor risco cardiovascular uma vez que o exercício físico atua na melhora do perfil lipídico, na redução do peso corporal, da pressão arterial, da frequência cardíaca de repouso, da agregação plaquetária e na função cardíaca. (SECCARECCIA; MENOTTI, 1992; LEE *et al.*, 1995; BARENGO *et al.*, 2004).

Outra adaptação hemodinâmica observada com o treinamento físico é a resposta da FC. A verificação da resposta cronotrópica de repouso e durante o exercício pode ser importante na determinação do risco cardiovascular. A diminuição da FC pode ocorrer tanto em indivíduos e animais normais como em hipertensos, em diversas intensidades, durações e modalidades de treinamento físico. A bradicardia de repouso é uma importante variável hemodinâmica, sendo considerada um eficiente marcador do efeito do treinamento físico (MEDEREIROS *et al.*, 2000; EVANGELISTA *et al.*, 2003).

1.3 Exercício e Hipertrofia Cardíaca

O treinamento físico induz HC podendo resultar em modificações descritas como “coração de atleta”. Nestas condições, a hipertrofia é, em geral, do tipo fisiológico, e beneficia o sistema cardiovascular ocorrendo, concomitantemente, diminuição da FC de repouso e aumento do tempo de enchimento ventricular com consequente aumento do VS. Esses ajustes ajudam o coração manter as exigências derivadas do exercício físico (MCARDLE *et al.*, 1998; IEMITSU *et al.*, 2001)

O treinamento do tipo aeróbio ocasiona HC excêntrica devido à sobrecarga de volume provocada pelo aumento da pré-carga que ocorre em consequência do aumento do retorno venoso. Este fato gera um pico elevado de tensão diastólica. Para tentar normalizar o estresse no miocárdio provocado por tal evento, ocorre crescimento dos cardiomiócitos por adição de sarcômeros em série e aumento de miofibrilas (MAGALHÃES *et al.*, 2008).

Em contrapartida, em corações de atletas que realizam treinamento de força, ocorre aumento da pós- carga com consequente elevação do pico de tensão sistólica caracterizando a sobrecarga de pressão. A resposta subsequente é a HC concêntrica por adição de sarcômeros em paralelo (MAGALHÃES *et al.*, 2008).

Portanto, observa-se que os fatores que desencadeiam a HC fisiológica estão normalmente relacionados às sobrecargas, tanto de volume quanto de pressão, impostas pela modalidade do treinamento. Além disso, no entanto, ocorre envolvimento de fatores endócrinos e parácrinos que, estimulados pelo exercício, também estão associados ao aumento da massa

cardíaca (NERI SERNERI *et al.*, 2001; OLIVEIRA; KRIEGER, 2002; IEMITSU *et al.*, 2006).

É importante salientar que tanto no treinamento físico aeróbico como no anaeróbico ocorre HC do tipo fisiológica com características diferentes, portanto, das observadas na hipertrofia patológica. A principal diferença que determina o padrão de hipertrofia é o tipo e a duração de estímulo que o coração recebe. Em situações nas quais os atletas recebem sobrecargas de pressão apenas durante a atividade física, a HC é, em geral, fisiológica. Contrariamente, em situações patológicas o coração está exposto continuamente à sobrecarga funcional que ocorre por longo tempo.

Não são apenas os fatores hemodinâmicos aqueles capazes de promover HC. Também mecanismos de sinalização extracelulares que geram mensagens intracelulares contribuem para o remodelamento cardíaco. Embora tais interações ainda não sejam totalmente conhecidas, algumas delas podem ser parcialmente explicadas e serão comentadas a seguir por suas prováveis implicações no modelo em estudo.

O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) é um dos principais reguladores do crescimento e metabolismo, com importante ação no crescimento e regeneração teciduais. Sua expressão está relacionada com a ativação de vias intracelulares PI3K/AKT/mTOR promovendo aumento de síntese proteica e HC (NERI SERNERI *et al.*, 2001; MCMULLEN *et al.*, 2003; DEBOSCH *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2008; MAGALHÃES *et al.*, 2008; IKEDA *et al.*, 2009)

Scheinowitz *et al.*, (2003), demonstraram, em ratos normais, que a expressão de IGF-I no miocárdio está aumentada após duas semanas de

natação com elevação continuada em até seis semanas. Tal fato demonstra que o exercício físico incrementa a expressão desse fator. Além disso, o treinamento físico aumenta o número de receptores de IGF-I (KIM *et al.*, 2008).

Em outra vertente, o estiramento celular proporcionado pelo exercício físico é um mecanismo ativador de canais de Ca^{++} tipo L (LTCC), de Na^+ e das bombas de Na^+/H^+ alterando o funcionamento dos canais iônicos do sarcolema. Esta modificação ativa a enzima serina/treonina quinase, MAPK (proteína quinase ativado por mitógenos) que proporciona o crescimento dos cardiomiócitos através da transmissão de sinais da superfície para o núcleo celular (GARCIA, 2008; MAGALHÃES *et al.*, 2008).

Dentre as proteínas ancoradas à membrana plasmática localizadas entre a matriz celular e o complexo de proteínas que formam a linha Z do sarcômero, estão as integrinas. Sua estimulação pelo estiramento celular ativa genes hipertróficos através do complexo Src-Fak-Shc-Grb-p130, o qual leva à ativação da MAPK que induz as respostas hipertróficas já descritas (AIKAWA *et al.*, 2002; SELVETELLA; LEMBO, 2005).

Todo este complexo bioquímico ativador da HC ainda representa simplificação do processo que precisa ser melhor elucidado.

1.4 Hipertireodismo

Os hormônios tireoideanos (HT) representados pela triiodotironina (T3) e tetraiodotironina (T4) são produzidos, armazenados e secretados pela glândula tireoide. São controlados tanto pela disponibilidade de iodo, através

do mecanismo autorregulatório de seus níveis, quanto pela estimulação do hormônio tireo-estimulante (TSH). (CORVILAIN *et al.*, 1988; CORVILAIN *et al.*, 2000; SAAD *et al.*, 2007).

A atuação dos HT acontece a nível tecidual aumentando o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. Estes hormônios estão envolvidos no desenvolvimento fetal atuando no processo de maturação cerebral e pulmonar e a sua participação é também fundamental na regulação do desenvolvimento de outros componentes do sistema endócrino, tais como o do hormônio de crescimento (YEN, 2001; BLEICHER, 2005).

Os sinais e sintomas provenientes do hipertireoidismo incluem aumento da FC e do DC, diminuição da resistência vascular sistêmica (RVS), perda de peso, sensação de calor, nervosismo, entre outros (KLEIN; OJAMAA, 2001; SAAD *et al.*, 2007).

De acordo com Roffi *et al.*, (2003), a síndrome clínica relacionada ao excesso do HT é a tireotoxicose que, além dos efeitos já descritos acima, inclui outras respostas cardíacas sendo observados quadros de arritmias, HC, cardiomegalia e insuficiência cardíaca.

Estados hiperdinâmicos da circulação estão associados à ação do HT sobre a transcrição gênica promovendo a síntese de proteínas regulatórias e estruturais do coração e aumento do consumo de oxigênio em decorrência do metabolismo elevado dos tecidos (KINUGAWA *et al.*, 2001; KAHALY; DILLMANN, 2005). Esta última ação está vinculada à resposta hiperdinâmica.

Os principais mecanismos pelos quais o HT ocasiona alteração nos cardiomiócitos incluem interações com receptores nucleares específicos modificando e ampliando a transcrição gênica. Estes receptores são fatores de

transcrição ativados por ligantes, sendo que, recrutados, interagem com a maquinaria transcricional celular aumentando a expressão de genes específicos. Um atributo dos receptores de T_3 é que eles residem no núcleo e estão associados ao elemento responsivo de T_3 (TRE) do DNA (KAHALY; DILLMANN, 2005; DILLMANN, 2010). Das isoformas dos receptores tireoideanos nucleares, tanto a α quanto a β regulam a transcrição gênica da cadeia pesada de miosina (α e β), da Ca^{2+} -ATPase (SERCA2) e de fosfolambam (CINI *et al.*, 2009). Portanto, esses receptores alteram a função cardíaca e a ablação deles provoca anormalidade contrátil (DILLMANN, 2010).

Algumas ações do HT no sistema cardiovascular não são dependentes do complexo intranuclear T_3 -TR, mas originam-se de mecanismo não genômico que interage com receptores presentes na membrana celular e no citoplasma, ativando vias de sinalização intracelulares (DAVIS; DAVIS, 2002).

1.5 Hipertireoidismo e Hipertrofia Cardíaca.

Como foi relatado anteriormente, a sobrecarga funcional e estímulos neuro-humorais desencadeiam adaptações do coração (MORGAN; BAKER, 1991). Essa adaptação cardíaca ocorre com o objetivo de compensar o estresse inicialmente imposto ao coração (MILL; VASSALO, 2001).

Assim como o exercício físico, os hormônios tireoideanos induzem HC com característica fisiológica que inclui o aumento da síntese de proteínas contráteis, ativação adicional das vias metabólicas e mudanças na geometria

das câmaras cardíacas, neovascularização proporcional com redução de fibrose (OJAMAA, 2010). Sua ação ocorre, portanto, por efeitos diretos sobre os cardiomiócitos e por ações indiretas através da modificação da carga imposta ao coração (CINI *et al.*, 2009).

Segundo Kenessey; Ojamaa (2006), apenas as ações do HT sobre a expressão gênica e a síntese proteica não explicariam os efeitos observados no crescimento dos cardiomiócitos. A redução da resistência vascular periférica, o aumento do volume sanguíneo e do DC também contribuem para a HC.

A hipertrofia dos cardiomiócitos induzida pelo HT resulta também da ativação diferencial de vias de sinalização intracelular com envolvimento de proteínas sinalizadoras de crescimento/sobrevivência as quais são relacionadas com a HC fisiológica. Em contrapartida, as vias que promovem crescimento e morte celular são referidas à HC do tipo patológica (KENESSEY; OJAMAA, 2006; OJAMAA, 2010).

Como se percebe, as vias de transdução de sinais são complexas e abundantes e ainda não são completamente conhecidas. Estudos em diversos modelos de animais tem mostrado a participação da via PI3K/AKT/mTOR. O T₃ liga-se aos receptores de HT (TR α) e ativa esta via gerando uma cascata de sinalização que acaba produzindo HC (KUZMAN *ET AL.*, 2005; KENESSEY; OJAMAA, 2006; DILLMANN, 2010).

Além da PI3K/AKT/mTOR, outra importante família de proteínas que tem um papel fundamental sobre os cardiomiócitos são as MAPKs. Estas proteínas estão presentes tanto na hipertrofia fisiológica quanto na patológica. A sua ativação se dá através da ligação do hormônio T₄ com proteínas da

membrana plasmática, as integrinas, promovendo inclusive angiogênese (BERGH *et al.*, 2005; OJAMAA, 2010)

1.6 Justificativa

A hipertrofia cardíaca é um importante fator de risco para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca sendo esta um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Estima-se que existam 6,5 milhões de pessoas com insuficiência cardíaca no Brasil sendo registrados, em 2001, 1,2 milhões de internações no SUS com 260 mil mortes naquele ano (DATASUS, 2002).

Tanto o hormônio tireoideano quanto o exercício físico causam hipertrofia cardíaca e vários autores consideram esta HC como sendo de padrão fisiológico. Apesar destes fatos, nenhum estudo verificou as alterações cardiovasculares que ocorrem quando o HT e o exercício físico são administrados simultaneamente e nem qual é o padrão de HC assim obtido. Estes fatos tornam importante a análise das características das respostas hemodinâmicas e hipertróficas nas condições experimentais de hipertireoidismo, exercício físico e de sua associação.

2 OBJETIVO GERAL

Analisar as respostas cardiovasculares no hipertireoidismo experimentalmente induzido, no treinamento físico aeróbico e na sua associação em ratos Wistar.

2.1 Objetivos Específicos

- Verificar o comportamento da frequência cardíaca e da pressão arterial em ratos que receberam hormônio tireoideano, treinamento físico aeróbico e a associação destas duas condições;
- Identificar padrões de hipertrofia analisando-se o peso do coração e do VE e medindo-se o menor diâmetro transversal dos cardiomiócitos nos ratos que receberam hormônio tireoideano, exercício físico e a associação destas condições.

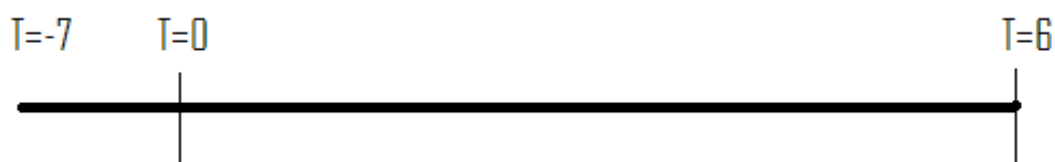
3 DELINEAMENTO DO ESTUDO

3.1 Animais

Foram utilizados 38 ratos da linhagem Wistar, machos, adultos (média de peso de 350 g), provenientes do CEBEA da UFU. Após 15 dias de adaptação no laboratório, os ratos foram pesados e distribuídos aleatoriamente nos grupos identificados como controle (C), exercício (E), hormônio tireoideano e exercício (HTE) e hormônio (HT). Os três primeiros grupos contaram com 10 animais e o último com 8 animais.

As condições ambientais do laboratório foram mantidas as mesmas durante todo o período experimental no que se refere à temperatura, umidade relativa do ar, nível de ruído e luminosidade, reproduzindo-se o ciclo claro e escuro a cada 12 horas. Os animais foram alimentados com ração e água “*ad libitum*”.

3.2 Desenho esquemático do protocolo experimental



T= - 7 (dias): Adaptação dos animais ao ambiente aquático

T= 0: Início da intervenção. Foram realizadas a pesagem dos animais e as mensurações da FC e PA.

T= 6 (semanas): Final da intervenção. Foi realizada a pesagem dos animais, coleta de sangue para dosagens hormonais, sacrifício dos animais e retirada do coração para pesagem e análise histológica.

3.3 Adaptação ao treinamento físico e ao Power Lab.

O treinamento físico efetuado empregou a natação e foi realizado em um tanque medindo 20 cm de largura, 50 cm de altura e 40 cm de profundidade, com a temperatura da água mantida entre 30 e 32°C.

A adaptação ao ambiente aquático ocorreu no período de 5 dias ininterruptos e os animais foram exercitados com aumento gradual no volume até que se alcançasse 30 minutos de duração.

A adaptação ao PowerLab para verificação da PA e da FC aconteceu antes do início da intervenção, concomitante à adaptação ao ambiente aquático e foi realizada durante duas semanas, três vezes por semana.

3.4 Protocolo Experimental

O presente estudo foi aprovado no comitê de ética na utilização de animais (CEUA) e recebeu o protocolo de número 118/10.

Os animais foram divididos em quatro grupos e submetidos ao experimento da seguinte forma: os animais do grupo C não foram submetidos a nenhuma intervenção, os do HTE receberam treinamento físico e hormônio tireoidiano, os do E realizaram apenas treinamento físico e os do HT receberam apenas o hormônio tireoidiano.

No dia anterior à intervenção foi realizada a aferição da pressão arterial sistólica (PAS) e da FC pelo esfigmomanômetro de cauda adaptado para ratos (Power Lab- ADInstrument). Para o registro dessas variáveis, os ratos foram aquecidos em gaiolas individuais e colocados dentro de um contêiner (Imagem 1).

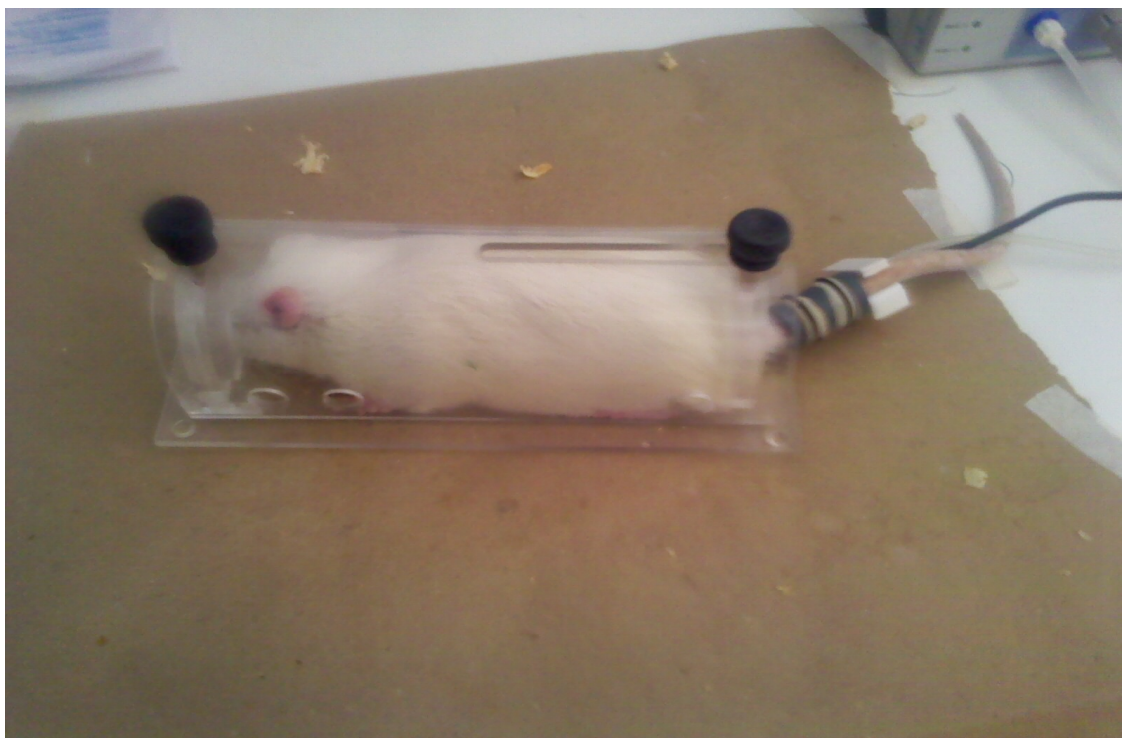


Imagem 1: Aferição da PA e FC no esfigmomanômetro adaptado para ratos.

Posteriormente colocou-se o esfigmomanômetro na cauda do animal e o manguito foi insuflado até que o fluxo sanguíneo fosse ocluído. Ao ser

desinsuflado, os primeiros picos de pulso foram visualizados no computador e no mesmo instante foi registrada a pressão arterial sistólica e a frequência cardíaca, conforme demonstrado na Imagem 2, 3 e 4.

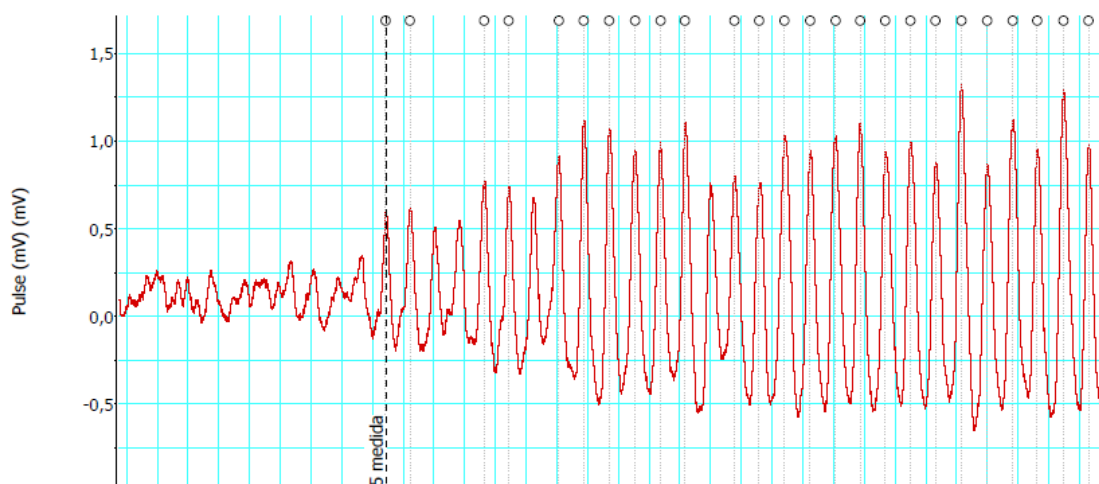


Imagem 2: Pressão de pulso obtida através do esfigmomanômetro de cauda adaptado para ratos.

(----) Demarcação da primeira pressão de pulso após a artéria ser desobstruída.

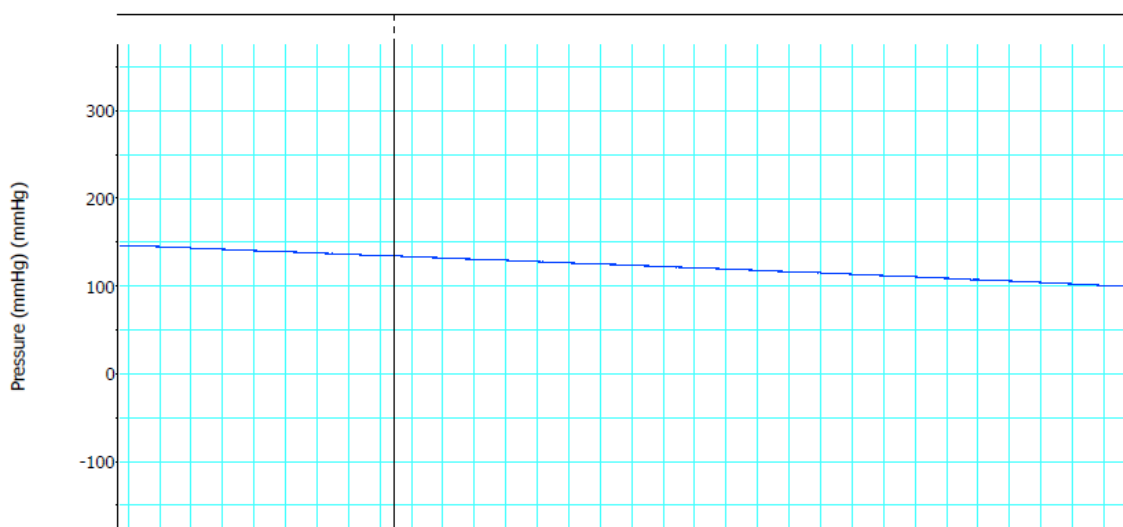


Imagem 3: Pressão arterial obtida em imagem através do esfigmomanômetro de cauda adaptado para ratos

(____) Demarcação da pressão arterial após a artéria ser desobstruída e é compatível com a demarcação da pressão de pulso.

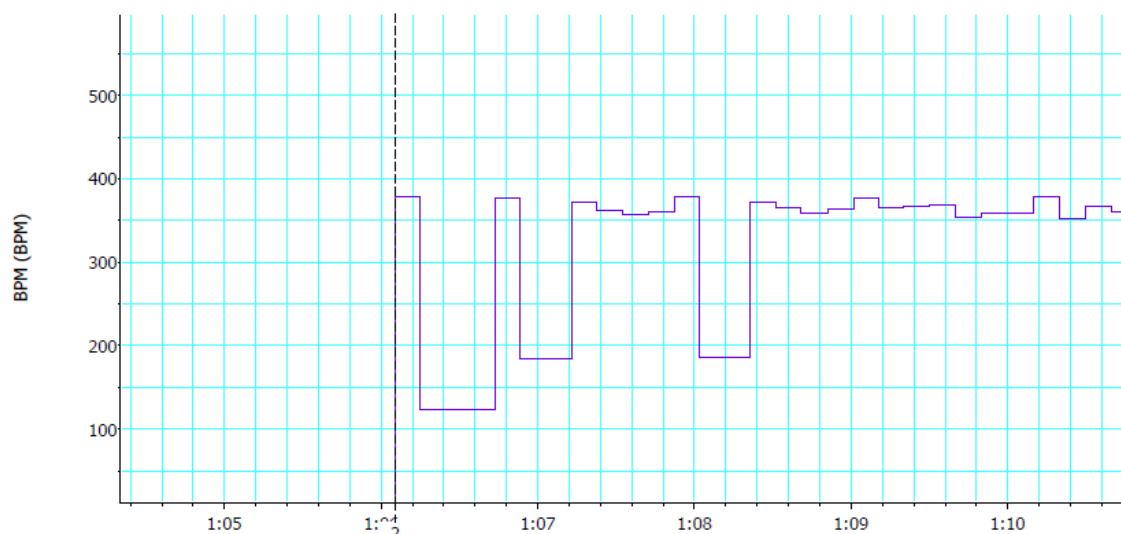


Imagem 4: Frequência cardíaca obtida em imagem através do esfigmomanômetro de cauda adaptado para ratos.

(----) Demarcação da frequência cardíaca arterial após a artéria ser desobstruída e é compatível com a demarcação da pressão de pulso.

Para o registro da PAS e da FC foram realizadas cinco medidas consecutivas considerando-se como real a média dos valores obtidos. Estes procedimentos foram repetidos ao final da fase experimental.

O HT utilizado foi a levotiroxina sódica em solução a 0,01% obtida a partir de 10 comprimidos de 100 µg cada diluídos em 10 ml de água destilada (ENGELMAN *et al.*, 2001).

A administração de 20 µg de HT/100g de peso corporal foi realizada todos os dias, durante seis semanas, no período noturno e antes do treinamento físico. O método de administração utilizado foi a sondagem oro-gástrica (gavagem) utilizando-se uma agulha de raquianestesia nº6 com uma esfera soldada na ponta para evitar traumatismos.

O treinamento físico foi realizado ao longo de seis semanas e consistiu em cinco sessões semanais de natação no período noturno/madrugada conforme demonstrado nas Imagens 5 e 6. A duração e

intensidade do treinamento (expressa em minutos e % do peso corporal respectivamente) seguiram a periodização abaixo.

SEMANA	DIAS					
	SEG	TER	QUA	QUI	SEX	
1	0	0	0	0	0	%PC
	30	40	50	60	60	DURAÇÃO
2	3	4	4	5	5	%PC
	40	40	50	50	60	DURAÇÃO
3	5	5	5	5	5	%PC
	60	60	60	60	60	DURAÇÃO
4	5	5	5	5	5	%PC
	60	60	60	60	60	DURAÇÃO
5	5	5	5	5	5	%PC
	60	60	60	60	60	DURAÇÃO
6	5	5	5	5	5	%PC
	60	60	60	60	60	DURAÇÃO



Imagem 5: Treinamento físico na água.



Imagem 6: Treinamento físico na água

Este protocolo foi adotado para induzir atividade aeróbica para ratos. Em estudos publicados, a estabilização do lactato sanguíneo ocorre quando a intensidade do exercício atinge 5% do peso corporal (MANCHADO *et al.*, 2006).

Ao final do experimento os ratos foram anestesiados com cetamina na dose de 0,1 ml/100g de peso, via intramuscular, associada ao cloridrato de xilazina na dose de 0,1 ml/100g de peso em injeção intramuscular. Foram colhidos 4 ml de sangue através de punção cardíaca antes do sacrifício do animal. O sangue foi depositado em tubos com gel separador para coleta capilar. As amostras de sangue foram utilizadas para determinação das dosagens de T_3 e T_4 pelo método Elisa.

3.5 Pesagem dos animais e do coração

Os animais foram colocados dentro de uma caixa, e em seguida colocados sobre uma balança de alta precisão. Esse procedimento ocorreu no início e no final do experimento conforme já citado na sessão 3.2.

Ao final do experimento, os animais foram sacrificados e o coração foi retirado e pesado em balança de alta precisão. Posteriormente, foram separados os átrios dos ventrículos e lavados com solução de soro fisiológico e inserido em formol a 10%.

3.6 Preparação histológica

O processo de formolização teve duração de 72 horas e, após, foi separado o VE com o septo interventricular e novamente foi pesado e posteriormente retornou à solução de formol por mais 24 horas.

A preparação histológica foi feita incluindo-se o material em parafina e, posteriormente, procedendo-se à hidratação (desparafinização), sendo, por fim, o material desidratado (Diafanização). O passo-a-passo de toda a preparação está disponível no Anexo A.

3.7 Análises microscópicas da fibra muscular cardíaca.

Foram obtidos cinco cortes de cada ventrículo e medidos os menores diâmetros de cinco células cortadas perpendicularmente e identificadas em cinco campos microscópicos diferentes. É importante salientar que essas medidas foram realizadas sempre pelo mesmo pesquisador e em condições que não permitiam a identificação prévia a qual grupo o corte pertencia. A medida dos diâmetros das células foi realizada utilizando-se imagens digitalizadas capturadas em microscópio binocular Olympus BX40 com objetiva de 40x, acoplado a câmera Olympus OLY-200 ligada a um computador PC através de placa digitalizadora Data Translation 3153. As mensurações foram realizadas utilizando o software HL Image (Western Vision) e as imagens dos cortes estão disponíveis no anexo B.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com o objetivo de verificar a existência ou não de diferenças entre os resultados obtidos nos grupos E, HTE, HT e C na situação pré e pós-intervenção foi aplicada o teste t de Student às medidas de PA cuja distribuição foi normal e o teste de Wilcoxon às medidas de PC e FC, cujas distribuições foram não normais.

Para comparação entre os grupos, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) complementada pelo teste de Tukey para as variáveis T3, T4, PA, peso ventricular e diâmetro transversal dos cardiomiócitos. Para as comparações do peso do coração, FC e PC foram utilizadas a análise de Kruskal-Wallis complementada pelo método de Dunn.

O nível de significância foi estabelecido em 0,05 em um teste bilateral.

5 RESULTADOS

Os níveis de T_3 aumentaram nos grupos E, HTE e HT em comparação ao grupo C. O comportamento do T_4 foi semelhante ao do T_3 exceto para o grupo E que não recebeu levotiroxina sódica. Estes resultados estão dispostos na Tabela 1 e Gráfico 1.

Tabela 1: Concentração dos níveis plasmáticos de T_3 e T_4 após seis semanas de intervenção

Variável analisada	C($\bar{x} \pm DP$)	HTE($\bar{x} \pm DP$)	HT($\bar{x} \pm DP$)	E($\bar{x} \pm DP$)
T_3 (ng/mL)	0,7 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,3*	1,23 $\pm$ 0,2*	1,21 $\pm$ 0,2*
T_4 (μ g/dL)	8,9 $\pm$ 1,0	14,6 $\pm$ 2,5 [†]	15,7 $\pm$ 3,7 [†]	8,4 $\pm$ 1,5

Tabela 1: Média e desvio padrão (DP) da concentração plasmática de T_3 e T_4 após seis semanas de intervenção. Os grupos E, HTE e HT(*) apresentaram valores de T_3 maiores que os do grupo C; os valores de T_4 foram maiores nos grupos HT e HTE ([†]).

C (controle); HTE (hormônio tireoideano e treinamento físico); HT (hormônio tireoideano); E (exercício).

* $p < 0,05$ C vs HTE, HT e E (ANOVA-Tukey); [†] $p < 0,05$ HTE e HT vs C e E (ANOVA-Tukey).

Gráfico 1: Níveis plasmáticos do T_3 e T_4 após seis semanas de intervenção

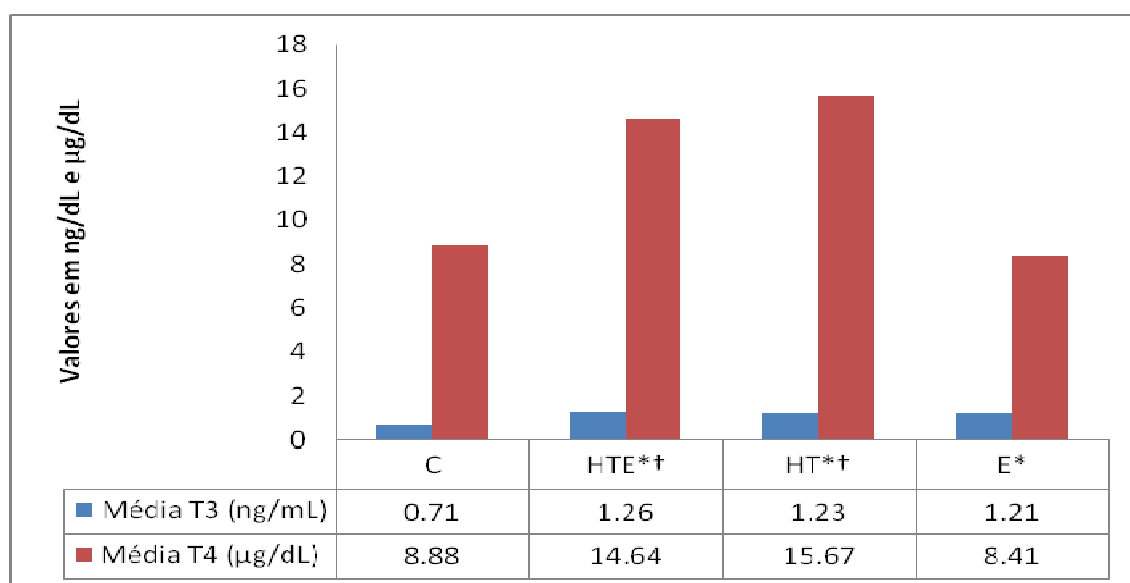


Gráfico 1. Resultado hormonal após seis semanas de intervenção. São reportados as médias dos valores. Os grupos E, HTE e HT (*) tiveram seus valores de T_3 maiores que o grupo C e os valores de T_4 foram maiores nos grupos HT e HTE ([†]).

O PC dos animais ao final do experimento foi maior em relação ao valor inicial apenas no grupo C. No grupo HTE houve diminuição do PC em relação aos valores iniciais. Ao serem comparados os grupos, o PC no HTE foi menor que o do grupo C (Tabela2 e Grafico 2).

Tabela 2: Peso Corporal antes e após seis semanas de intervenção

Variável analisada	C($\bar{x} \pm DP$)	HTE($\bar{x} \pm DP$)	HT($\bar{x} \pm DP$)	E($\bar{x} \pm DP$)
PCinicial (g)	386 $\pm$ 39	379 $\pm$ 36	404 $\pm$ 38	386 $\pm$ 46
PCFinal(g)	419 $\pm$ 36 [‡]	368 $\pm$ 31 ^{†*}	398 $\pm$ 41	392 $\pm$ 53

Tabela2: Estão reportados a média e desvio padrão (DP) do peso corporal antes e após seis semanas de intervenção. O Peso Corporal (PC) no grupo HTE diminuiu após as seis semanas de intervenção ([†]) e aumentou no grupo C ([‡]) em relação aos valores basais; quando comparados os grupos antes da intervenção, não houve diferença do PC; após o período de estudo o PC foi menor apenas no HTE em relação ao C (*).

*p<0,05 HTE vs C, HT e E (Kruskal-Wallis- Dunn); [†]p<0,05 HTE pré vs pós (Wicoxon); [‡]p<0,05 C pré vs pós (Wilcoxon).

Gráfico 2: Peso corporal antes e após seis semanas de intervenção

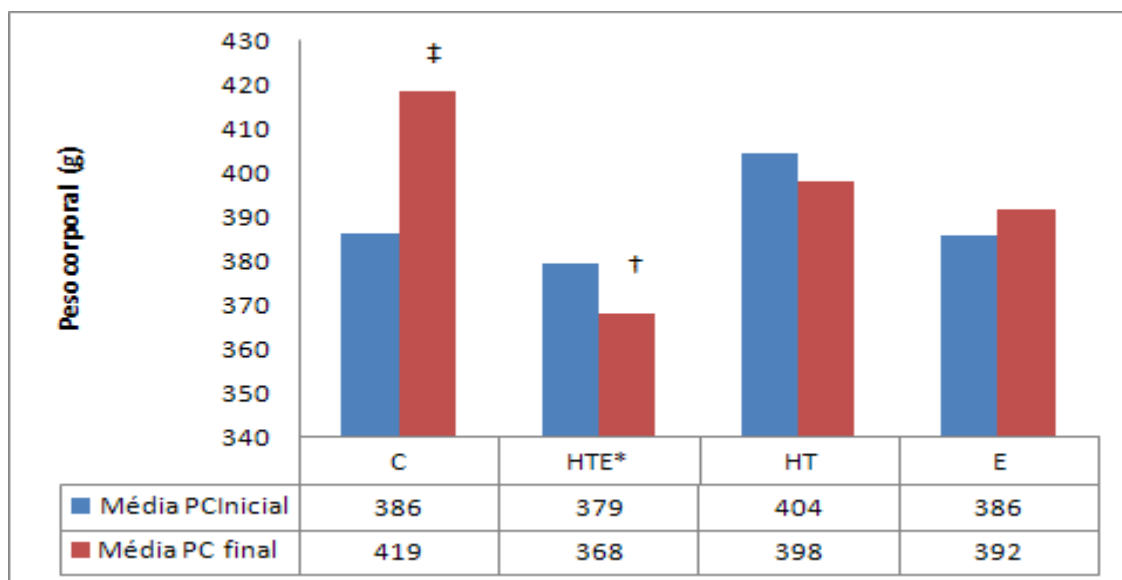


Grafico 2. Peso corporal (PC) antes e após seis semanas de intervenção. Estão reportadas as médias dos valores dos grupos. O PC no grupo HTE diminuiu após as seis semanas de intervenção ([†]) e aumentou no grupo C ([‡]) em relação aos valores basais; quando comparados os grupos antes da intervenção, não houve diferença do PC; após o período de estudo o PC foi menor apenas no HTE em relação ao C (*).

Os valores da PA e da FC estão demonstrados na Tabela 3 e nos Gráficos 3 e 4. Não foi observada alteração na PA após a intervenção em nenhum dos grupos e nem houve diferença na comparação entre os grupos, tanto antes como após a intervenção. A FC após intervenção foi menor no grupo E. Houve diminuição da FC no final das seis semanas no grupo E em comparação com todos os outros grupos.

Tabela 3: Valores da pressão arterial e da frequência cardíaca antes e após seis semanas de intervenção.

Variável analisada	C($\bar{x} \pm DP$)	HTE($\bar{x} \pm DP$)	HT($\bar{x} \pm DP$)	E($\bar{x} \pm DP$)
PASinicial (mmHg)	112 $\pm$ 2	120 $\pm$ 2	117 $\pm$ 2	118 $\pm$ 2
PASFinal (mmHg)	112 $\pm$ 4	121 $\pm$ 18	126 $\pm$ 16	114 $\pm$ 3
FCinicial (bpm)	351 $\pm$ 22	350 $\pm$ 9	349 $\pm$ 2	347 $\pm$ 9 [‡]
FCfinal (bpm)	386 $\pm$ 14 [†]	398 $\pm$ 18 [†]	398 $\pm$ 28 [†]	318 $\pm$ 33 [*]

Tabela3: Estão reportados a média e desvio padrão (DP) da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) antes e após seis semanas de intervenção. Não houve diferença da PA na comparação dos grupos no início e no final da intervenção e entre os grupos antes e após o estudo. Com relação a FC, não houve diferença entre os grupos antes da intervenção porém, após a mesma, o grupo E apresentou redução em comparação a HTE, HT e C(*). A FC final em HTE, HT e C foram maiores que os valores iniciais ([†]); a FC foi mais elevada antes da intervenção no grupo E ([‡]).

*p<0,05 E vs HTE, HT e C (Kruskal-Wallis- Dunn); [†]p<0,05 HTE, HT e C pré vs pós (Wicoxon);

[‡]p<0,05 E pré vs pós (Wilcoxon).

Gráfico 3: Valores da pressão arterial antes e após seis semanas de intervenção

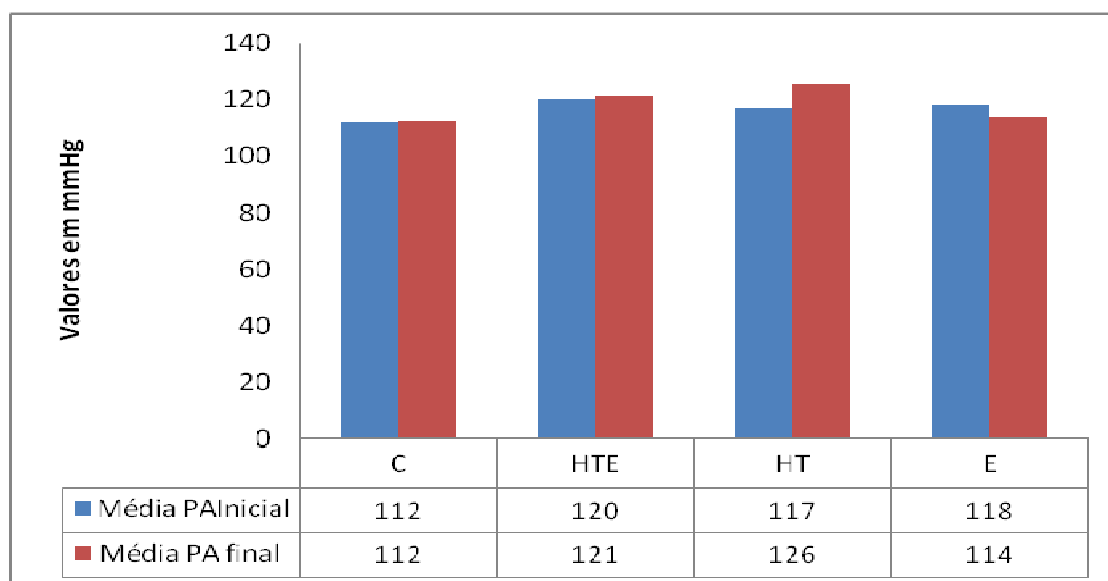


Gráfico 3. Valores da pressão arterial (PA) antes e após 6 semanas de intervenção. Estão reportados as médias dos valores dos grupos. Não houve diferença da PA na comparação dos grupos no início e no final da intervenção e entre os grupos antes e após o estudo.

Gráfico 4: Valores da frequência cardíaca antes e após seis semanas de intervenção

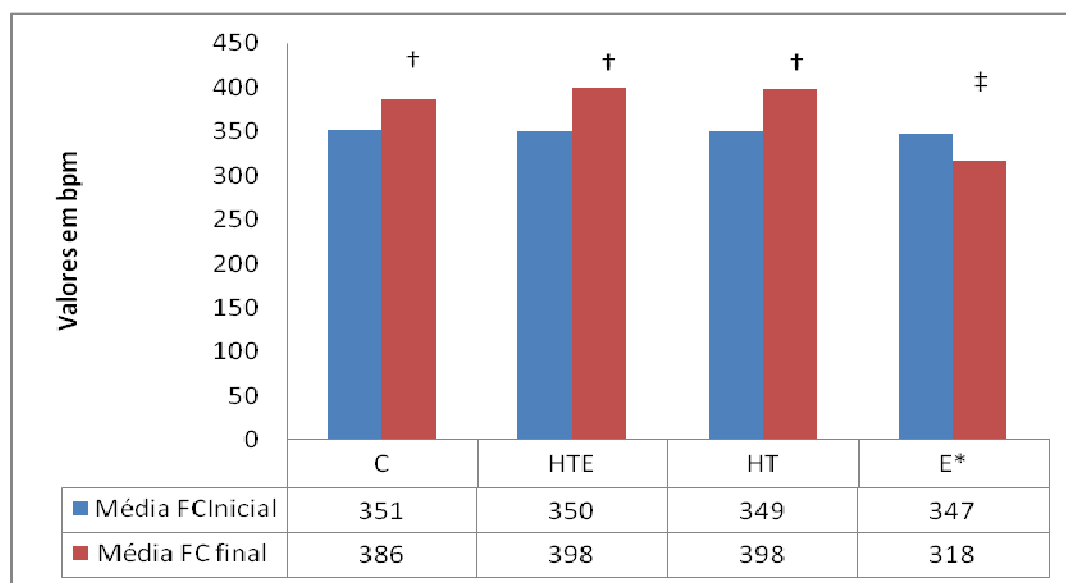


Gráfico 4. Alterações da FC antes e após seis semanas de intervenção. Estão reportadas as médias dos valores nos grupos. Não houve diferença entre os grupos antes da intervenção porém, após a mesma, o grupo E (*) apresentou redução da FC em comparação a HTE, HT e C. A FC final em HTE, HT e C foram maiores que os valores iniciais (†); a FC foi menor após a intervenção no grupo E (‡).

O diâmetro transversal dos cardiomiócitos foi maior nos grupos E, HTE e HT, em relação ao grupo C (Tabela 4 e Gráfico 5).

Tabela 4: Diâmetro dos cardiomiócitos após seis semanas de intervenção

Variável analisada	C($\bar{x} \pm DP$)	HTE($\bar{x} \pm DP$)	HT($\bar{x} \pm DP$)	E($\bar{x} \pm DP$)
Diâmetro cardiomiócitos (μm)	9,7 $\pm$ 3,1*	11,8 $\pm$ 0,3*	12,6 $\pm$ 0,6*	12,4 $\pm$ 0,6*

Tabela 4. Análise histomorfométrica dos cardiomiócitos após seis semanas de intervenção.

Estão reportadas as médias dos valores dos grupos. Os grupos E(*), HTE(*) e HT(*) apresentaram maiores diâmetros dos cardiomiócitos em comparação com o grupo C.

*p<0,05 C vs HTE, HT e E (ANOVA- Tukey).

Gráfico 5: Diâmetro dos cardiomiócitos após seis semanas de intervenção

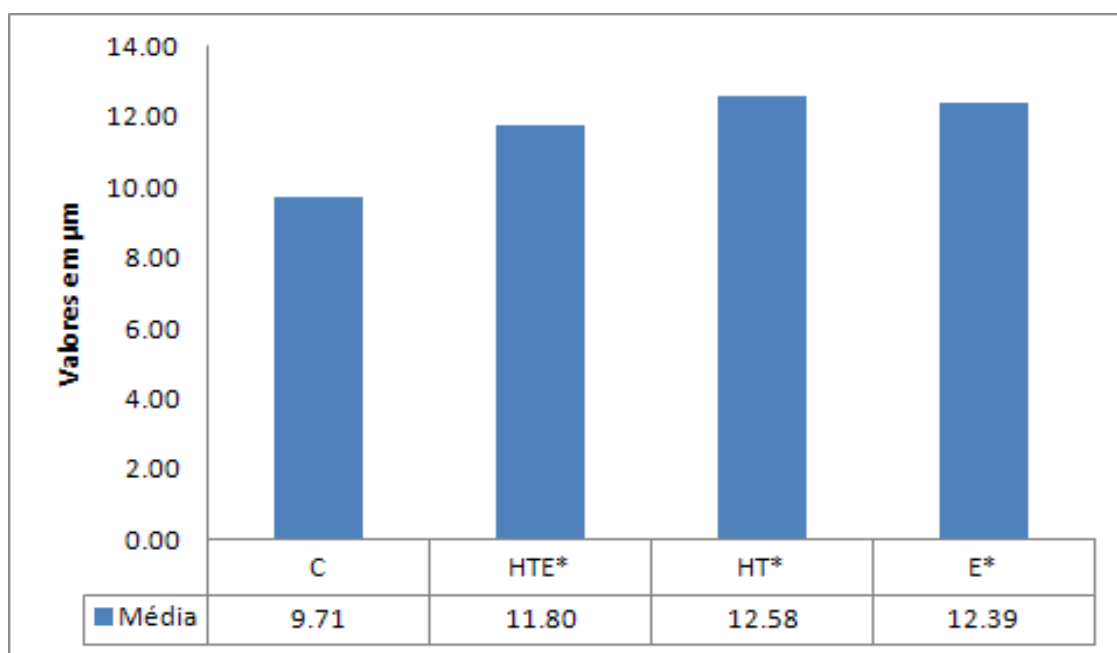


Gráfico 5. Análise histomorfométrica dos cardiomiócitos após seis semanas de intervenção. Estão reportadas as médias dos valores dos grupos. Os grupos E, HTE e HT (*) apresentaram maiores diâmetros dos cardiomiócitos em comparação com o grupo C.

O peso do coração e o peso do ventrículo esquerdo estão demonstrados na tabela 5 e no gráfico 6. O peso do coração foi menor nos grupos E e HT em comparação ao grupo C. O peso ventricular esquerdo foi menor no grupo E em comparação ao grupo C.

Tabela 5: Peso total do coração e o peso do ventrículo esquerdo após seis semanas de intervenção

Variável analisada	C($\bar{x}$ ±DP)	HTE($\bar{x}$ ±DP)	HT($\bar{x}$ ±DP)	E($\bar{x}$ ±DP)
Peso total do coração (mg)	1330±126	1261±178	1048±396*	1148±121*
Peso do ventrículo esquerdo (mg)	985±109	895±117	894±132	867±74 [†]

Tabela5. Peso total do coração e ventrículo esquerdo após seis semanas de intervenção. Estão reportadas as médias dos valores dos grupos. Os grupos E(*) e HT(*) apresentaram menores peso do coração em comparação com o grupo C. O grupo E ([†]) menor peso do VE em comparação ao controle.

*p<0,05 HT e E vs C (Kruskal Wallis).

[†]p<0,05 E vs C (ANOVA- Tukey).

Gráfico 6: Peso total do coração e do ventrículo esquerdo após seis semanas de intervenção

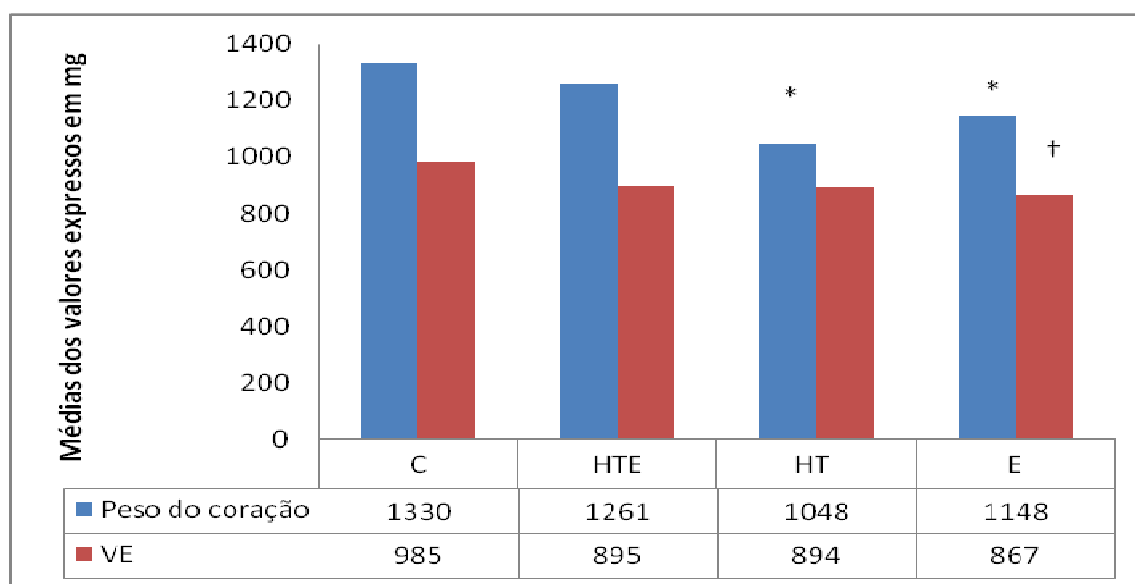


Gráfico 6. Análise do peso do coração e do ventrículo esquerdo após seis semanas de intervenção. Estão reportadas as médias dos valores dos grupos. Os grupos E, e HT (*) apresentaram pesos menores em comparação ao grupo C. O grupo E ([†]) apresentou peso ventricular menor em comparação ao grupo C.

6 DISCUSSÃO

Os animais apresentaram boa tolerância aos procedimentos experimentais e ocorreram três mortes no grupo HT. O comportamento dos animais que receberam HT foi considerado normal até a quarta semana mas ao longo das semanas seguintes eles apresentaram irritação com a administração do hormônio. Em contrapartida, os animais que realizaram treinamento físico tiveram boa adaptação aquática ao longo das seis semanas, sendo observada inclusive melhora da técnica do nado.

Para a medida da PA e da FC utilizando-se o PowerLab, os animais foram colocados em caixa especial após um período de aquecimento. O procedimento foi bem tolerado e as variáveis facilmente aferidas, fato que pode se dever ao período prévio de adaptação.

Com relação aos níveis plasmáticos dos hormônios tireoideanos ao final do período experimental, observou-se uma diferença de comportamento entre o T_3 e o T_4 . Os níveis de T_4 foram significativamente mais elevados nos grupos HTE e HT (64% e 75%, respectivamente) em comparação com o C. Tal fato indica que o estado de hipertireoidismo foi induzido nos animais com a administração da levotiroxina sódica na dose de 20ug/100g de peso corporal. Os níveis de T_3 foram mais elevados em todos os grupos (77% HTE, 73% HT e 70% E) quando comparados ao grupo controle. A alteração nos níveis de T_3 nos grupos HT e HTE pode ser justificada devido à maior concentração de T_4 causada pela administração de hormônio e sua conversão em T_3 mas, curiosamente, no grupo E, que não recebeu a levotiroxina sódica, também houve elevação dos níveis de T_3 . Este comportamento do T_3 pode ser explicado

pela intensidade de esforço utilizada no treinamento físico, pois sabe-se que os níveis deste hormônio são mais elevados em indivíduos que executam exercícios próximos ao limiar anaeróbio. Este nível de treinamento é conseguido quando se utilizam protocolos semelhantes aos deste estudo e equivale ao emprego, em natação de ratos, de um peso próximo a 5% do PC (GOBATTO *et al.*, 2001; CILOGLU *et al.*, 2005; MANCHADO *et al.*, 2006).

Com relação ao PC, nota-se que somente o grupo HTE apresentou diferença significativa em relação ao controle. O menor peso dos animais deste grupo pode ser explicado pelo acréscimo de gasto calórico determinado pelo treinamento físico em associação com o HT (GUYTON; HALL, 2002; TORTORA; GRABOWSKI, 2002; BLEICHER, 2005). Entretanto, não foi verificado neste estudo qual foi a qualidade do peso perdido pelo grupo HTE, ou seja, se teria ocorrido perda de massa gorda.

O comportamento da PA não diferiu antes e após a intervenção em cada grupo nem na comparação entre os grupos. Em estados de hipertireoidismo ocorre aumento do consumo de oxigênio nos tecidos periféricos e produção de metabólitos que provocam vasodilatação periférica. O HT, principalmente devido ao efeito do T_3 , também diminui a resistência periférica por sua ação vasodilatadora direta nas células musculares lisas dos vasos. Esta ação diminui a pressão arterial diastólica, e consequentemente, a pressão arterial média, o que é parcialmente compensado pela ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona que aumenta a resistência periférica por ação direta nos vasos e a volemia por induzir maior reabsorção de sódio e água. O componente celular do sangue também aumenta na presença de T_3 devido à hiperestimulação da síntese de eritropoetina, fato que induz

hematopoiese. Estas combinações resultam em aumento da PA na presença de hipertireoidismo (KLEIN; OJAMAA, 1998; FOMMEI; IERVASI, 2002; VARGAS *et al.*, 2006; CINI *et al.*, 2009). Apesar destas considerações, o modelo experimental utilizado no presente estudo não reproduziu este achado. A ausência de resposta hipertensiva pode estar ligada ao curto tempo de exposição dos animais à levotiroxina sódica, mas a completa explicação para este fato precisa ser melhor avaliada.

A FC apresentou elevação nos grupos estudados após a intervenção em comparação com os valores iniciais, exceto no grupo E no qual houve redução tanto na comparação com os valores basais quanto entre os grupos. Os grupos com hormônio tireoideano (HTE e HT) apresentaram os efeitos cronotrópicos positivos típicos da tireotoxicose. Isto pode ter ocorrido, em parte, devido ao aumento da atividade adrenérgica, da expressão de α MHC, da SERCA e da diminuição de fosfolambam. Esta combinação de ações está associada ao aumento da FC (KLEIN; OJAMAA, 1998; KLEIN; OJAMAA, 2001; DANZI; KLEIN, 2002; CINI *et al.*, 2009).

As ações do HT sobre o ciclo cardíaco podem interferir na frequência cardíaca e merecem destaque especial. A contração cardíaca depende do efluxo de cálcio do retículo sarcoplasmático aumentando a concentração deste íon no citosol. Esse ajuste promove a ligação actina-miosina nos filamentos iniciando a contração muscular. Por sua vez, o relaxamento miocárdico depende do sequestro de cálcio ativado pelas ATPases do retículo sarcoplasmático (SERCA) e pela modulação da fosfoproteína conhecida como fosfolambam que, ao ser fosforilada, reduz a inibição sobre o SERCA acelerando a remoção citosólica do cálcio. Esta

mesma proteína, em seu estado desfosforilado, inibi a afinidade da SERCA pelo cálcio resultando em lentidão do relaxamento miocárdico. (CARR; KRANIAS, 2002). O HT atua aumentando a expressão de SERCA e diminuindo a atividade do fosfolambam como descrito acima. Desta maneira acelera-se o ciclo de contração-relaxamento aumentando a FC.

De forma interessante, observou-se uma diminuição da FC de repouso no grupo E. Esta resposta parece demonstrar que houve um ajuste fisiológico relacionado ao efeito cronotrópico negativo decorrente do treinamento físico (MEDEREIROS *et al.*, 2000; EVANGELISTA *et al.*, 2003). Vários estudos indicam que essa redução da FC ocorre por aumento da atividade vagal, diminuição da atividade das terminações neurais simpáticas e dos níveis plasmáticos de noradrenalina circulantes. Este fato ocorre tanto em humanos quanto em animais (GOLDSMITH *et al.*, 1992; La ROVERE *et al.*, 1992; GAVA *et al.*, 1995; ANGELIS *et al.*, 2004; MEDEIROS *et al.*, 2004).

Este efeito modulador do exercício físico em relação à FC foi anulado pelo HT (grupo HTE). Uma provável explicação para tal fato pode ser o efeito do hormônio tireoideano aumentando a atividade cronotrópica do coração mesmo na presença de treinamento físico, conforme discutido anteriormente. A incapacidade do treinamento físico em diminuir a resposta cronotrópica positiva decorrente da ação do hormônio tireoideano pode ser explicada tanto pela forte resposta da ação genômica quanto pela ação não genômica do HT. A ação nuclear do hormônio tireoideano aumenta a expressão da α MHC e diminui a expressão de β MHC, o que provoca aumento da FC. A sua ação não nuclear altera o comportamento dos canais iônicos de sódio, potássio e cálcio da membrana do cardiomiócito, fato que resulta em cronotropismo e inotropismo

positivos do HT. Talvez essas respostas diretas e indiretas provenientes da ação do hormônio sejam predominantes em relação àquelas oriundas do treinamento físico explicando assim a perda do controle da FC pelo exercício físico. (KLEIN; OJAMAA, 2001; KAHALY; DILLMANN, 2005)

O peso total do coração e do VE no grupo E foram menores em relação ao grupo C. O peso total do coração também foi menor no grupo HT em relação a C mas o mesmo não aconteceu com o ventrículo esquerdo que parece ter sido preservado na presença do hormônio. Esta observação é reforçada analisando-se o resultado similar do HTE onde o peso total e do VE são similares aos do controle. Estes achados reproduzem, inclusive, os obtidos em estudo prévio de nosso grupo utilizando o mesmo modelo experimental (FERNANDES *et al.*, 2007).

A hipertrofia cardíaca (HC) é uma resposta do miocárdio a vários estímulos, tanto fisiológicos quanto patológicos e uma das formas de avaliá-la é pelo peso do coração e do VE. O exercício físico e o hormônio tireoideano induzem esta hipertrofia que assume característica próxima à resposta fisiológica a qual se caracteriza pela manutenção ou melhora da função cardíaca (KENESSEY; OJAMAA, 2006; MAGALHÃES *et al.*, 2008; OJAMAA, 2010). Analisando-se apenas o grupo E verifica-se que, pela avaliação do peso total do coração e do VE, o treinamento não foi capaz de produzir hipertrofia. A explicação para este fato pode estar relacionada com a intensidade e duração do esforço imposto aos animais. Sabe-se que exercícios aeróbicos parecem promover maior retorno venoso e diminuição da resistência periférica (MCARDLE *et al.*, 1998). Quanto à ausência de perda do peso do VE nos grupos que receberam hormônio (HT e HTE), é possível que ela esteja

vinculada, pelo menos em parte, ao aumento do diâmetro transversal dos cardiomiócitos.

Outra maneira de estimar a HC é verificar o diâmetro dos cardiomiócitos. Para isso seleciona-se aquelas células que foram seccionadas perpendicularmente e mede-se o seu menor diâmetro. Este é um método confiável e facilmente reproduzido (FERNANDES, 1999; FERREIRA, 2001; SANTOS, 2009). No presente estudo, os grupos E, HT e HTE apresentaram aumento dos diâmetros das células musculares cardíacas do VE (28%, 30% e 22%, respectivamente) em relação ao grupo C.

Vários experimentos têm demonstrado as principais vias sinalizadoras da hipertrofia cardíaca. Sabe-se que tanto o exercício físico quanto o hormônio tireoideano induzem HC e os mecanismos envolvidos nesta resposta hipertrófica estão sendo progressivamente entendidos (MILL; VASSALO, 2001; OLIVEIRA; KRIEGER, 2002; MCMULLEN *et al.*, 2003; MAGALHÃES *et al.*, 2008; CINI *et al.*, 2009; OJAMAA, 2010). Como já mencionado, o estresse mecânico da atividade física induz a hipertrofia por impor sobrecarga cardíaca decorrente do aumento do retorno venoso (exercícios aeróbicos) ou da resistência periférica aumentada (exercícios resistidos). A tradução da tensão mecânica muscular desencadeada pelo esforço físico em estímulo hipertrófico cardíaco está relacionada à ação de algumas proteínas ancoradas à membrana plasmática que são conhecidas como integrinas. Estas integrinas estão localizadas entre a matriz extracelular e o complexo de proteínas que forma a linha Z do sarcômero. Nesta malha são encontradas proteínas sinalizadoras como as tirosinas-quinases coativadoras de receptores esteroidais (Src), a quinase de adesão focal (Fak) e o complexo

p130, as quais têm papel crucial na rápida fosforilação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), quinase reguladora de sinais extracelulares (ERK 1/2) e p38 e não são ativadas pela estimulação de angiotensina II (SELVETELLA; LEMBO, 2005; GARCIA; INCERPI, 2008; MAGALHÃES *et al.*, 2008). A excitação desses sinais bioquímicos leva à transcrição gênica nuclear e, no citoplasma, aumenta a velocidade de tradução ribossomal para a produção de proteínas ao mesmo tempo em que diminui a degradação delas no citosol. Estes efeitos devem estar vinculados ao aumento do diâmetro transversal dos cardiomiócitos no grupo E.

Evidências mostram que os HT também funcionam na tradução proteica e atuam sobre os processos de sinalização iniciados na membrana plasmática e no citoplasma os quais resultam em respostas biológicas (DAVIS DAVIS, 2002). A ativação intracelular das cascatas de sinalização independentes dos receptores clássicos dos hormônios tireoideanos foi recentemente descrita evidenciando a existência de outro receptor específico do hormônio tireoideano na superfície celular denominado integrina $\alpha V\beta 3$ (BERGH *et al.*, 2005). A interação se dá principalmente através da ligação T_4 - $\alpha V\beta 3$ que promove a fosforilação do MAPK/ERK1/2 e favorece a translocação do receptor tireoideano $\beta 1$ (TR $\beta 1$) para o núcleo levando ao aumento da transcrição gênica e culminando na neovascularização (angiogênese) (OJAMAA, 2010). A inativação da integrina $\beta 1$ altera a integridade da membrana dos cardiomiócitos e da estrutura do sarcômero e causa disfunção sistólica. Isso demonstra o papel crucial das integrinas no processo de HC (SELVETELLA; LEMBO, 2005).

Os diâmetros celulares aumentados nos grupos que receberam levotiroxina podem ser explicados, portanto, pelas ações do HT. Estas ações são variadas e induzem modificação do fenótipo da célula mediada pelos receptores (TRs) localizados no núcleo. Os TRs (TR α 1 e TR β 1) são fatores transcricionais que regulam a expressão de genes por meio de interações com sequências específicas de DNA. O T₃, ao entrar no núcleo, liga-se aos seus receptores nucleares que estão conectados a genes-alvo e codificam proteínas estruturais e regulatórias, incluindo proteínas miofibrilares como a MHC, SERCA2 e o fosfolambam. Com essas alterações há modificação da função cardíaca sistólica e diastólica aumentando a contratilidade e a frequência cardíaca e melhorando o relaxamento das fibras (DILLMANN, 2002; KAHALY; DILLMANN, 2005).

No citosol, os TRs participam na sinalização citoplasmática e iniciam processos que resultam em respostas biológicas. O T₃ liga-se aos TRs, principalmente o TR α 1, e media a ativação da via de transdução PI3K/AKT/mTOR o que resulta em aumento da síntese proteica e ativação de genes hipertróficos (KUZMAN *et al.*, 2005; HIROI *et al.*, 2006; OJAMAA, 2010). Todos estes efeitos apontam no sentido de existir maior quantidade acumulada de miofibrilas e de outros eventuais componentes proteicos que podem ser os responsáveis pelo diâmetro celular aumentado nestes animais dos grupos HT e HTE.

A análise detalhada dos resultados da hipertrofia obtida no grupo que associou o exercício físico e o HT, desperta duas questões. A primeira delas diz respeito ao modelo de hipertrofia e a segunda se refere à ausência de efeito hipertrófico somatório.

Como já comentado, as hipertrofias fisiológicas mantêm equilibradas as relações existentes entre as fibras musculares, a estrutura de colágeno e a vascularização miocárdica. Este parece ser o padrão mais encontrado nas HC derivadas do exercício físico e do excesso de HT (OJAMAA, 2010).

Algumas vias que ativadas produzem HC fisiológica estão envolvidas nas ações cardiovasculares do exercício físico e do HT. Uma delas é a que envolve o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) que se liga ao seu receptor de tirosina quinase (IGF-IR) ativando e autofosforilando resíduos de tirosina que promovem o recrutamento e ativação de uma lipídeo quinase, PI3K (fosfatidilinositol-3 quinase). Esses processos iniciam a ativação de vias intracelulares que produzem o aumento da síntese proteica e consequente HC (NERI SERNERI *et al.*, 2001; PAEZ; SELLERS, 2003; KIM *et al.*, 2008; IKEDA *et al.*, 2009). A via da PI3K tem um papel crítico na HC dependente de volume e a sua interrupção inibe a síntese proteica impedindo a resposta hipertrófica mesmo na presença de exercício físico aeróbico e de HT. Curiosamente isto parece não ocorrer nas sobrecargas de pressão (MCMULLEN *et al.*, 2003; LUO *et al.*, 2005; HIROI *et al.*, 2006) como ocorre no exercício resistido.

A PI3K é uma molécula da membrana responsável por iniciar os processos de fosforilação da AKT. Essa proteína possui duas isoformas: a PI3K α (subunidade PI3K-p85 e p-110 α) e PI3K γ (subunidade PI3K-p110 γ) que estão associadas à HC fisiológica e à patológica, respectivamente (OUDIT *et al.*, 2004). Na cascata de ativação dessa via, a PI3K fosforila o segundo mensageiro PIP₂ (fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato) em PIP₃ (fosfatidil-inositol 3,4,5-bifosfato). O PIP₃ recruta a AKT para a membrana plasmática que é

ativada quando fosforilada pela PDK $\frac{1}{2}$ (fosfoinositideo dependente de cinase $\frac{1}{2}$) (TRACHOOTHAM *et al.*, 2008). A AKT, uma proteína quinase B, é uma serina/treonina e tem um papel chave na regulação de uma ampla variedade de funções em diferentes tecidos, tais como, na proliferação e crescimento celulares, na função contrátil e na angiogênese coronariana (SHIOJIMA; WALSH, 2006). Dos três membros da família AKT (AKT1, AKT2 e AKT3), as duas primeiras são bastante expressadas no coração e sua atividade está relacionada com estímulos geradores de hipertrofia fisiológica (WALSH, 2006). Recentemente, Debosch *et al.*, (2006) utilizaram camundongos nocautes de AKT1 e demonstraram que essa proteína está implicada na resposta hipertrófica dos cardiomiócitos e sua ablação gera redução de síntese proteica na HC mesmo após o treinamento físico (natação). Isso sugere a participação da AKT1 na HC induzida pelo treinamento físico.

A AKT promove a fosforilação e inibição do produto do gene TSC2 que é um inibidor do importante fator de crescimento tecidual, o mTOR (mammalian target of Rapamycin). (DEBOSCH *et al.*, 2006; MAGALHÃES *et al.*, 2008). A mTOR é uma proteína quinase que atua aumentando a síntese proteica e ativando outras proteínas quinases S6 (S6K1 e S6K2) as quais aumentam a tradução de proteínas, a biossíntese ribossomal, a divisão celular e a hipertrofia. Elas também são responsáveis por acionar a liberação da 4EBP1 que proporciona a iniciação da tradução ribossomal (MAGALHÃES *et al.*, 2008).

Fica, portanto, bastante evidente a importância da via PI3K/AKT/mTOR na hipertrofia fisiológica induzida pelo treinamento físico e pelo HT.

As evidências do envolvimento do eixo renina-angiotensina-aldosterona frequentemente relacionado a padrões de HC patológica são poucas. Na literatura científica os achados relacionados à participação da angiotensina no músculo cardíaco são controversos, pois depende do tipo celular estimulado e da concentração desta substância no tecido. Alguns estudos demonstram o papel hipertrófico da angiotensina II através da ativação de vias de crescimento celular, mas, entretanto, outros demonstraram estimulação de vias apoptóticas (AOKI *et al.*, 2000; FABRIS *et al.*, 2007). Fernandes *et al.*, (2007) descreveram que a HC induzida com a administração de HT foi menor no grupo que, além do HT, recebeu também a espironolactona. Este resultado demonstra que o sistema renina-angiotensina-aldosterona está envolvido na HC do HT embora não pareça ser esta a via mais importante no remodelamento cardíaco em estados de hipertireoidismo.

Para explicar a ausência do efeito hipertrófico somatório no grupo HTE, podemos sugerir que tanto o exercício físico quanto o hormônio tireoideano tenham induzido hipertrofia utilizando a mesma via indutora, ou seja, a da PI3K-AKT-mTOR, via esta estreitamente relacionada à HC fisiológica. O modelo experimental utilizado no presente estudo induziu hipertireoidismo por um período aproximado de 4,4% da vida esperada do animal (34 meses) e como a ativação da via da PI3K-AKT-mTOR se dá em curto prazo de tempo, esta hipótese se torna bastante plausível. Uma alternativa a esta explicação poderia ser a de que a somatória dos estímulos para a hipertrofia cardíaca tenha produzido um esgotamento dos mecanismos hipertróficos e assim, mesmo atuando por vias diferentes, eles tivessem atingido um platô de resposta impedindo um maior crescimento muscular

cardíaco no grupo HTE. Ainda, a repetição do experimento utilizando sobrecargas maiores (exercício resistido) poderá responder algumas dúvidas referentes a este tema.

Para tentar identificar a razão para este curioso comportamento do grupo HTE são necessários mais estudos, principalmente voltados ao bloqueio da via da PI3K/AKT/mTOR. Estes modelos experimentais podem ser desenhados para identificar as vias envolvidas nas respostas hipertróficas ao HT e ao exercício físico.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que:

1 - A levotiroxina sódica administrada isoladamente ou em associação com o exercício físico promove aumento da FC de repouso em ratos Wistar;

2 – O exercício físico reduz a FC de repouso;

3 – O peso total do coração foi menor com o exercício físico e com levotiroxina;

4 – O peso do VE foi reduzido no grupo E;

5 – Os grupos que receberam HT não apresentaram redução do peso do VE;

6 - Tanto o treinamento físico como levotiroxina produziram aumento do diâmetro transversal dos cardiomiócitos;

7 - Não houve efeito aditivo no diâmetro celular quando o hormônio tireoideano foi associado ao exercício físico.

REFERÊNCIAS

AIKAWA, R. *et al.* **Integrins play a critical role in mechanical stress-induced p38 MAPK activation.** *Hypertension*, v. 39, n. 2, p. 233-8, Feb 2002.

AOKI, H. *et al.* **Specific role of the extracellular signal-regulated kinase pathway in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in vitro.** *Biochem J*, v. 347 Pt 1, p. 275-84, Apr 1 2000.

BARENGO, N. C. *et al.* **Low physical activity as a predictor for total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men and women in Finland.** *Eur Heart J*, v. 25, n. 24, p. 2204-11, Dec 2004.

BERGH, J. J. *et al.* **Integrin α V β 3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis.** *Endocrinology*, v. 146, n. 7, p. 2864-71, Jul 2005.

BING, O. H. *et al.* **Studies of prevention, treatment and mechanisms of heart failure in the aging spontaneously hypertensive rat.** *Heart Fail Ver*, v. 7, n. 1, p. 71-88, Jan 2002.

BLEICHER, L. **Estudos estruturais do receptor do hormônio tireoidiano (TR) e modelagem por homologia da globulina de ligação à tiroxina (TBG).** (2005). 87 f. Dissertação de (mestrado), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

CARR, A. N.; KRANIAS, E. G. **Thyroid hormone regulation of calcium cycling proteins.** *Thyroid*, v. 12, n. 6, p. 453-7, Jun 2002.

CILOGLU, F. *et al.* **Exercise intensity and its effects on thyroid hormones.** *Neuro Endocrinol Lett*, v. 26, n. 6, p. 830-4, Dec 2005.

CINI, G. *et al.* **Thyroid hormones and the cardiovascular system: pathophysiology and interventions.** *Biomed Pharmacother*, v. 63, n. 10, p. 742-53, Dec 2009.

COHN, J. N. *et al.* **Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling.** *J Am Coll Cardiol*, v. 35, n. 3, p. 569-82, Mar 1 2000.

CORVILAIN, B. *et al.* **Stimulation by iodide of H₂O₂ generation in thyroid slices from several species.** *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 278, n. 4, p. E692-9, Apr 2000.

_____. **Inhibition by iodide of iodide binding to proteins: the "Wolff-Chaikoff" effect is caused by inhibition of H₂O₂ generation.** *Biochem Biophys Res Commun*, v. 154, n. 3, p. 1287-1292, Aug 15 1988.

DANZI, S.; KLEIN, I. **Thyroid hormone-regulated cardiac gene expression and cardiovascular disease.** *Thyroid*, v. 12, n. 6, p. 467-472, Jun 2002.

DAVIS, P. J.; DAVIS, F. B. **Nongenomic actions of thyroid hormone on the heart.** *Thyroid*, v. 12, n. 6, p. 459-466, Jun 2002.

DE ANGELIS, K. *et al.* **Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice.** *J Appl Physiol*, v. 96, n. 6, p. 2174-2188, Jun 2004.

DEBOSCH, B. *et al.* **Akt1 is required for physiological cardiac growth.** *Circulation*, v. 113, n. 17, p. 2097-2104, May 2 2006.

DILLMANN, W. **Cardiac hypertrophy and thyroid hormone signaling.** *Heart Fail Rev*, v. 15, n. 2, p. 125-132, Mar 2010.

DILLMANN, W. H. **Cellular action of thyroid hormone on the heart.** *Thyroid*, v. 12, n. 6, p. 447-452, Jun 2002.

ENGELMAN, M. F. B. *et al.* **Estudo morfométrico do fígado de ratos submetidos a doses supra-fisiológicas de tiroxina.** *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 45, p. 173-179, 2001.

EVANGELISTA, F. S. *et al.* **Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice.** *Braz J Med Biol Res*, v. 36, n. 12, p. 1751-1759, Dec 2003.

FABRIS, B. *et al.* **Dose and time-dependent apoptotic effects by angiotensin II infusion on left ventricular cardiomyocytes.** *J Hypertens*, v. 25, n. 7, p. 1481-1490, Jul 2007.

FERNANDES, M. L. M. P. **Efeito da espirolactona sobre as alterações miocárdicas induzidas pelo hormônio tireoideano em ratos.** (1999). 117 f. Dissertação de (Mestrado), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG, 1999.

FERNANDES, M. L. M. P. *et al.* **Efeitos da espironolactona sobre as alterações miocárdicas induzidas pelo hormônio tireoideano em ratos.** *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 89, p. 398-402, 2007.

FERREIRA, M. B. **Efeitos do metoprolol sobre as alterações histomorfológicas do miocardiócito produzidos pelo hipertireoidismo experimental em ratos.** (2001). 2001 f. Dissertação de (mestrado), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG, 2001.

FOMMEI, E.; IERVASI, G. **The role of thyroid hormone in blood pressure homeostasis: evidence from short-term hypothyroidism in humans.** *J Clin Endocrinol Metab*, v. 87, n. 5, p. 1996-2000, May 2002.

FRANCHINI, K. G. **Mecanismos moleculares na hipertrofia cardíaca.** *Hipertensão*, v. 5, n. 3, p. 112-117, 2002.

GARCIA, J. A. D.; INCERPI, E. K. **Fatores e mecanismos envolvidos na hipertrofia ventricular esquerda e o papel anti-hipertrófico do óxido nítrico.** *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 90, p. 443-450, 2008.

GAVA, N. S. *et al.* **Low-intensity exercise training attenuates cardiac beta-adrenergic tone during exercise in spontaneously hypertensive rats.** *Hypertension*, v. 26, n. 6 Pt 2, p. 1129-1133, Dec 1995.

GOBATTO, C. A. *et al.* **Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise.** *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, v. 130, n. 1, p. 21-27, Aug 2001.

GOLDSMITH, R. L. *et al.* **Comparison of 24-hour parasympathetic activity in endurance-trained and untrained young men.** *J Am Coll Cardiol*, v. 20, n. 3, p. 552-558, Sep 1992.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica.** Guanabara Koogan. ed. Rio de Janeiro, 2002.

HIROI, Y. *et al.* **Rapid nongenomic actions of thyroid hormone.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, n. 38, p. 14104-14109, Sep 19 2006.

IEMITSU, M. *et al.* **Time course alterations of myocardial endothelin-1 production during the formation of exercise training-induced cardiac hypertrophy.** *Exp Biol Med (Maywood)*, v. 231, n. 6, p. 871-875, Jun 2006.

_____. **Physiological and pathological cardiac hypertrophy induce different molecular phenotypes in the rat.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 281, n. 6, p. R2029-R2036, Dec 2001.

IKEDA, H. *et al.* **Interaction of myocardial insulin receptor and IGF receptor signaling in exercise-induced cardiac hypertrophy.** *J Mol Cell Cardiol*, v. 47, n. 5, p. 664-675, Nov 2009.

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

KENESSEY, A.; OJAMAA, K. **Thyroid hormone stimulates protein synthesis in the cardiomyocyte by activating the Akt-mTOR and p70S6K pathways.** *J Biol Chem*, v. 281, n. 30, p. 20666-20672, Jul 28 2006.

KIM, J. *et al.* **Insulin-like growth factor I receptor signaling is required for exercise-induced cardiac hypertrophy.** *Mol Endocrinol*, v. 22, n. 11, p. 2531-2543, Nov 2008.

KINUGAWA, K. *et al.* **Regulation of thyroid hormone receptor isoforms in physiological and pathological cardiac hypertrophy.** *Circ Res*, v. 89, n. 7, p. 591-598, Sep 28 2001.

KLEIN, I.; OJAMAA, K. **Thyrotoxicosis and the heart.** *Endocrinology & Metabolism Clinics of North America*, v. 27, n. 1, p. 51-62, 1998.

_____. **Thyroid hormone and the cardiovascular system.** *N Engl J Med*, v. 344, n. 7, p. 501-509, Feb 15 2001.

KUZMAN, J. A. *et al.* **L-Thyroxine activates Akt signaling in the heart.** *J Mol Cell Cardiol*, v. 39, n. 2, p. 251-258, Aug 2005.

LA ROVERE, M. T. *et al.* **Autonomic nervous system adaptations to short-term exercise training.** *Chest*, v. 101, n. 5 Suppl, p. 299S-303S, May 1992.

LATERZA, M. C. *et al.* **Exercício físico regular e controle autonômico na hipertensão arterial.** *Rev SOCERJ*, v. 21, n. 5, p. 320-328, 2008.

LEE, I. M. *et al.* **Exercise intensity and longevity in men. The Harvard Alumni Health Study.** *JAMA*, v. 273, n. 15, p. 1179-1184, Apr 19 1995.

LUO, J. *et al.* **Class IA phosphoinositide 3-kinase regulates heart size and physiological cardiac hypertrophy.** *Mol Cell Biol*, v. 25, n. 21, p. 9491-9502, Nov 2005.

MAGALHÃES, F. C. *et al.* **Hipertrofia cardíaca induzida pelo treinamento físico: Eventos moleculares e celulares que modificam o fenótipo.** *Rev Mackenzie de educação física e esporte*, v. 7, n. 1, p. 189-193, 2008.

MANCHADO, F. D. B. *et al.* **Máxima fase estável de lactato é ergômetro-dependente em modelo experimental utilizando ratos.** *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 12, p. 259-262, 2006.

MCARDLE, W. D. *et al.* **Fisiologia do exercício. Energia nutrição e desempenho humano.** Rio de Janeiro, 1998.

MCMULLEN, J. R.; JENNINGS, G. L. **Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure.** *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v. 34, n. 4, p. 255-262, Apr 2007.

MCMULLEN, J. R. *et al.* **Phosphoinositide 3-kinase(p110 α) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n. 21, p. 12355-12360, October 14, 2003.

MEDEIROS, A. *et al.* **Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats.** *Braz J Med Biol Res*, v. 37, n. 12, p. 1909-1917, Dec 2004.

MEDEREIROS, A. *et al.* **Efeito do treinamento físico com natação sobre o sistema cardiovascular em ratos normotensos.** *Revista Paulista de Educação Física*, v. 14, n. 1, p. 7-15, 2000.

MILL, J. G.; VASSALO, D. V. **Hipertrofia Cardíaca.** *Revista Brasileira de Hipertensão*, v. 8, n. 1, p. 63-75, 2001.

MORGAN, H. E.; BAKER, K. M. **Cardiac hypertrophy. Mechanical, neural, and endocrine dependence.** *Circulation*, v. 83, n. 1, p. 13-25, Jan 1991.

NEGRÃO, C. E. *et al.* **Exercício físico e hipertensão.** *Hiperativo*, v. 1, n. 18, p. 18-22, 1994.

NERI SERNERI, G. G. *et al.* **Increased cardiac sympathetic activity and insulin-like growth factor-I formation are associated with physiological hypertrophy in athletes.** *Circ Res*, v. 89, n. 11, p. 977-982, Nov 23 2001.

OJAMAA, K. **Signaling mechanisms in thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy.** *Vascular Pharmacology*, v. 52, n. 3-4, p. 113-119, 2010/4// 2010.

OLIVEIRA, E. M.; KRIEGER, J. E. **Hipertrofia cardíaca e treinamento Físico-Aspectos moleculares.** *Hipertensão*, v. 5, n. 2, p. 73-78, 2002.

ODUIT, G. Y. *et al.* **The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease.** *J Mol Cell Cardiol*, v. 37, n. 2, p. 449-471, Aug 2004.

PAEZ, J.; SELLERS, W. R. **PI3K/PTEN/AKT pathway. A critical mediator of oncogenic signaling.** *Cancer Treat Res*, v. 115, p. 145-167, 2003.

ROFFI, M. *et al.* **Thyrotoxicosis and the cardiovascular system: subtle but serious effects.** *Cleve Clin J Med*, v. 70, n. 1, p. 57-63, Jan 2003.

ROHINI, A. *et al.* **Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy.** *Pharmacol Res*, v. 61, n. 4, p. 269-280, Apr 2010.

SAAD, M. J. A. *et al.* **Endocrinologia.** São Paulo: Atheneu., 2007.

SANTOS, R. A. R. R. **Efeitos do metoprolol sobre as alterações histomorfológicas do coração produzidos pelo decanoato de nandrolona em ratos.** (2009). 94 f. Dissertação de (Mestrado), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG, 2009.

SCHEINOWITZ, M. *et al.* **Short- and long-term swimming exercise training increases myocardial insulin-like growth factor-I gene expression.** *Growth Horm IGF Res*, v. 13, n. 1, p. 19-25, Feb 2003.

SCHLUTER, K. D.; WOLLERT, K. C. **Synchronization and integration of multiple hypertrophic pathways in the heart.** *Cardiovasc Res*, v. 63, n. 3, p. 367-372, Aug 15 2004.

SECCARECCIA, F.; MENOTTI, A. **Physical activity, physical fitness and mortality in a sample of middle aged men followed-up 25 years.** *J Sports Med Phys Fitness*, v. 32, n. 2, p. 206-213, Jun 1992.

SELVETELLA, G.; LEMBO, G. **Mechanisms of cardiac hypertrophy.** *Heart Fail Clin*, v. 1, n. 2, p. 263-273, Jul 2005.

SHIOJIMA, I.; WALSH, K. **Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway.** *Genes Dev*, v. 20, n. 24, p. 3347-3365, Dec 15 2006.

SILVA, G. J. *et al.* **Acute and chronic effects of exercise on baroreflexes in spontaneously hypertensive rats.** *Hypertension*, v. 30, n. 3 Pt 2, p. 714-719, Sep 1997.

SWYNGHEDAUW, B. **Molecular mechanisms of myocardial remodeling.** *Physiol Rev*, v. 79, n. 1, p. 215-262, Jan 1999.

TORTORA, G. J.; GRABOWSKI, S. R. **Principios de Anatomia e Fisiologia.** Guanabara Koogan, 2002.

TRACHOOTHAM, D. *et al.* **Redox regulation of cell survival.** *Antioxid Redox Signal*, v. 10, n. 8, p. 1343-1374, Aug 2008.

VARGAS, F. *et al.* **Vascular and renal function in experimental thyroid disorders.** *Eur J Endocrinol*, v. 154, n. 2, p. 197-212, Feb 2006.

VASSALO, D. V.; LIMA, E. G. **Contratilidade miocárdica: aspectos básicos e clínicos.** São Paulo, 1993.

WALSH, K. **Akt signaling and growth of the heart.** *Circulation*, v. 113, n. 117, p. 2032-4, May 2 2006.

YEN, P. M. **Physiological and molecular basis of thyroid hormone action.** *Physiol Rev*, v. 81, n. 3, p. 1097-1142, Jul 2001.

ANEXO A.

Passo-a-passo da preparação histológica.

Passo I: Inclusão do material em parafina

- Fixado o material em formol
- Cortado o músculo cardíaco e colocado em K7
- O material foi disposto em álcool a 70% por 30min
- Álcool 85% por 30min
- Álcool 95% por 30min
- Álcool absoluto I por 30 min
- Álcool absoluto II por 30 min
- Álcool absoluto III por 30 min
- Foi retirado o excesso de álcool em papel toalha
- Xilol I por 30 min
- Xilol II por 30 min
- Xilol III por 30 min
- Retirado o excesso em papel toalha
- Parafina I
- Parafina II
- Parafina III
- Inclusão em bloco de parafina.

O bloco foi cortado em micrótomo (5 micra) sendo realizados dois cortes em cada lâmina.

Passo II: Hidratar (desparafinizar)

- Xilol III por 10 min
- Xilol II por 10 min
- Xilol I por 10 min
- Retirado o excesso com papel toalha
- Álcool absoluto III por 30 seg
- Álcool absoluto II por 10 seg
- Álcool absoluto I por 10 seg

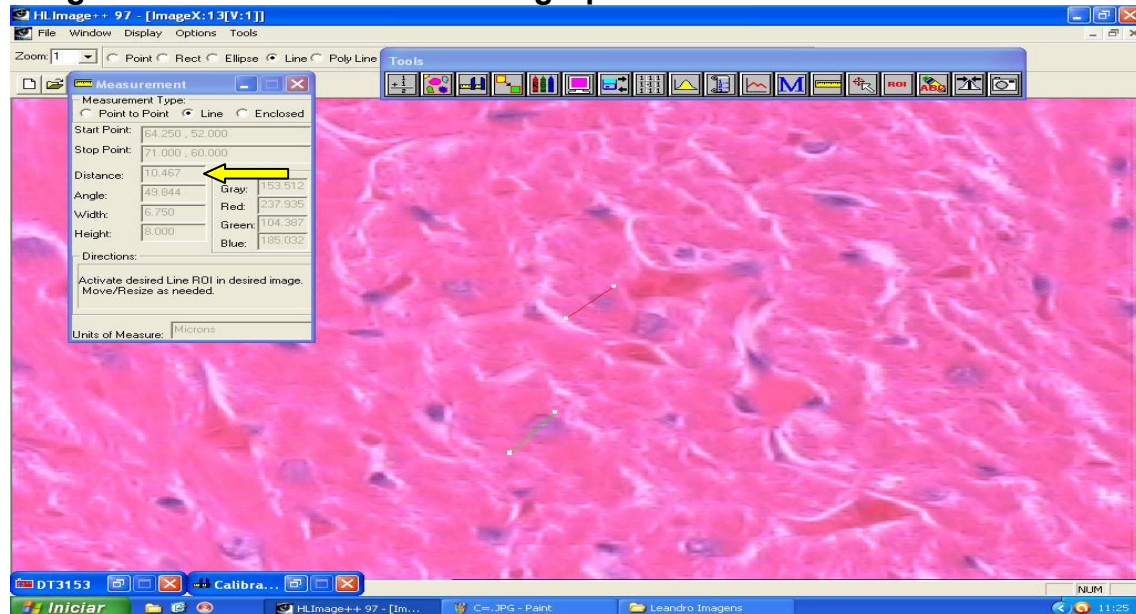
- Álcool 95% por 10 seg
- Álcool 85% por 10 seg
- Álcool 70% por 10 seg
- Água corrente por 20 min
- Água destilada por 5 min
- Clorada com hematoxilina de Harris por 30 seg
- Água corrente 20 min
- Água destilada 5 min
- Corado com eosina/floxina de 1min, 30 seg e 2min
- Água corrente para retirar o excesso de eosina
- Água destilada por 4 seg

Passo III: Desidratar (Diafanizar)

- Álcool 70% por 10 seg
- Álcool 85% por 10 seg
- Álcool 95% por 10 seg
- Álcool absoluto I por 10 seg
- Álcool absoluto II por 10 seg
- Álcool absoluto III por 10 seg
- Foi retirado o excesso de álcool em papel toalha
- Xilol I por 30 seg
- Xilol II por 30 seg
- Xilol III por 30 seg

ANEXO B.

Imagem do corte do ventrículo do grupo C.

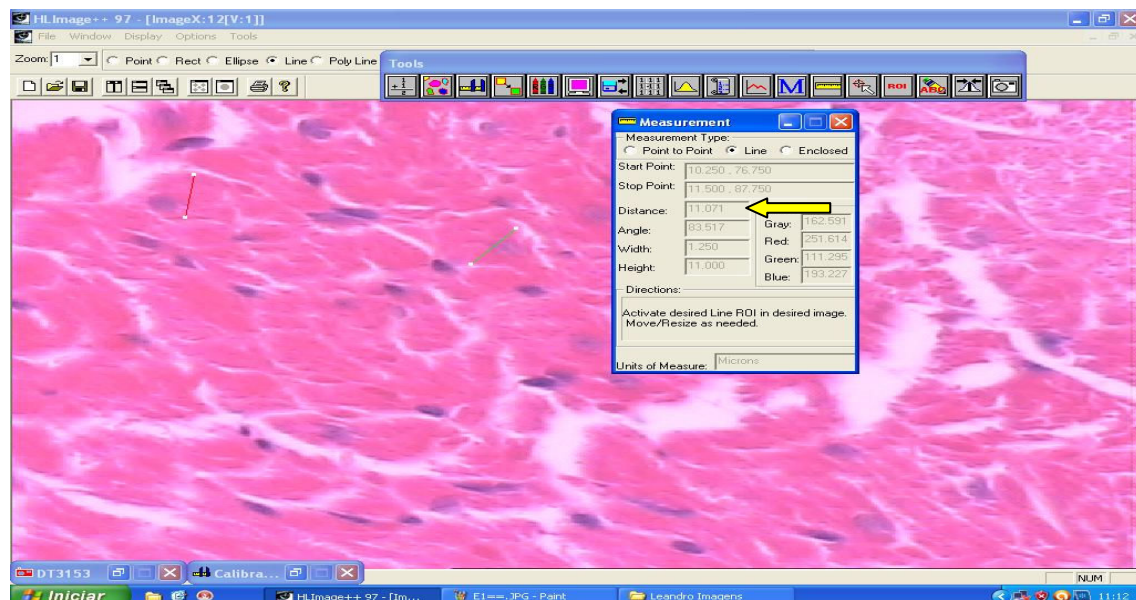


Foram medidos os menores diâmetros das células musculares cardíacas cortadas perpendiculares.

→ Valor do diâmetro da célula muscular cardíaca.

— Distância do menor diâmetro celular mensurado.

— Distância do menor diâmetro celular determinado.



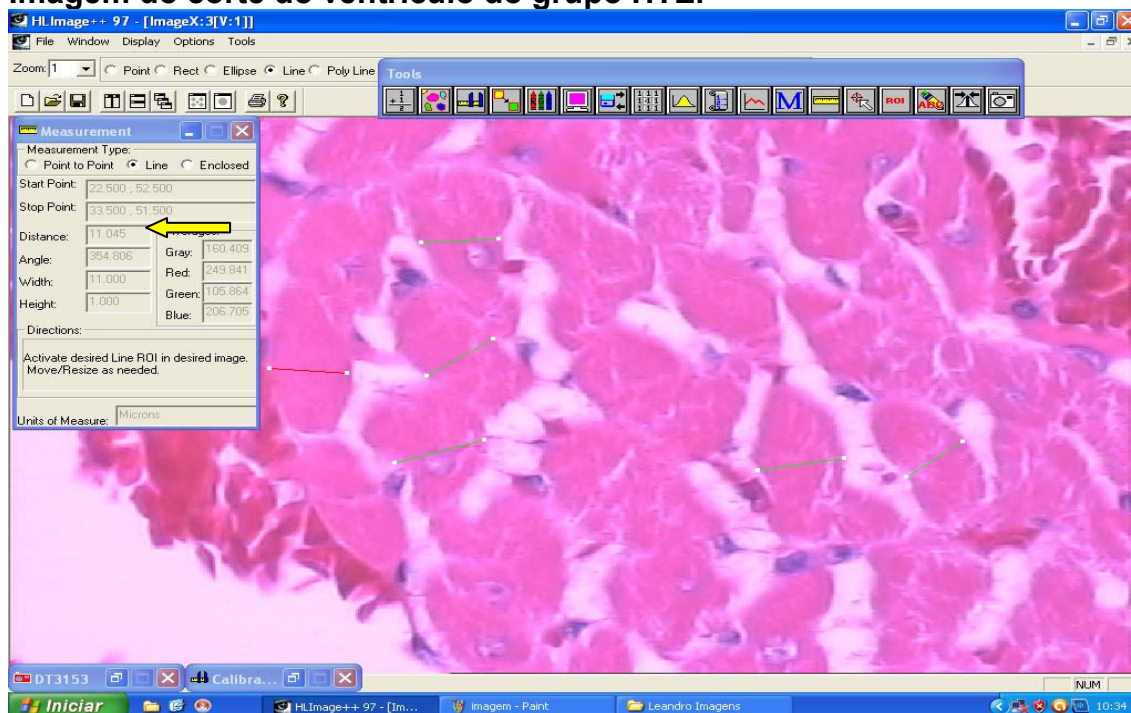
Foram medidos os menores diâmetros das células musculares cardíacas cortadas perpendiculares.

→ Valor do diâmetro da célula muscular cardíaca.

— Distância do menor diâmetro celular mensurado.

— Distância do menor diâmetro celular determinado.

Imagem do corte do ventrículo do grupo HTE.

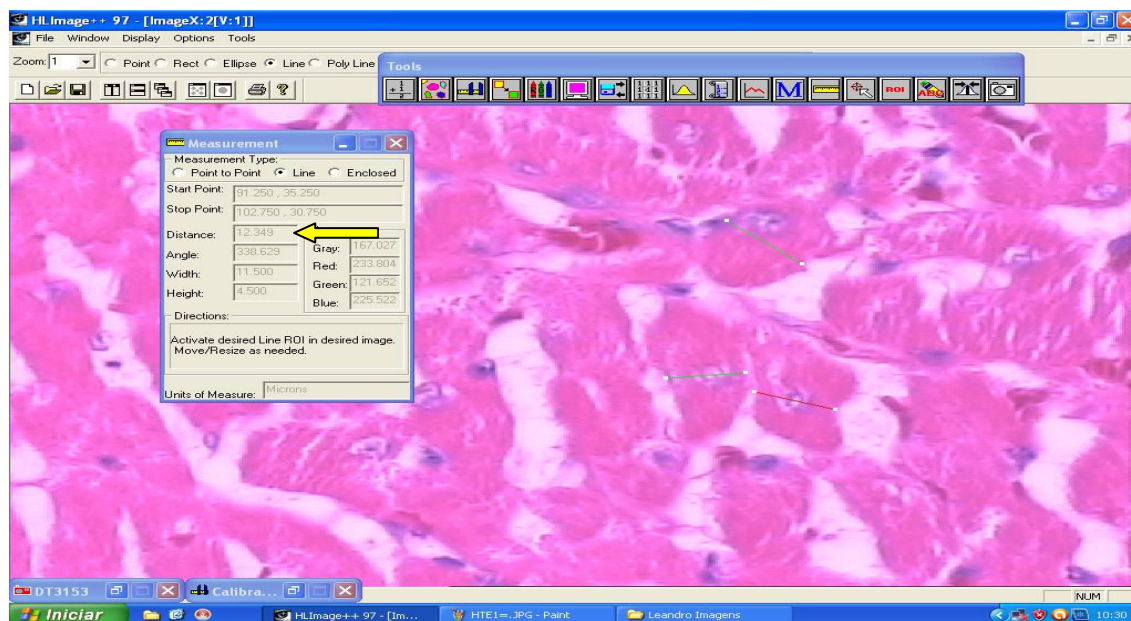


Foram medidos os menores diâmetros das células musculares cardíacas cortadas perpendiculares.

→ Valor do diâmetro da célula muscular cardíaca.

●● Distância do menor diâmetro celular mensurado.

●● Distância do menor diâmetro celular determinado.



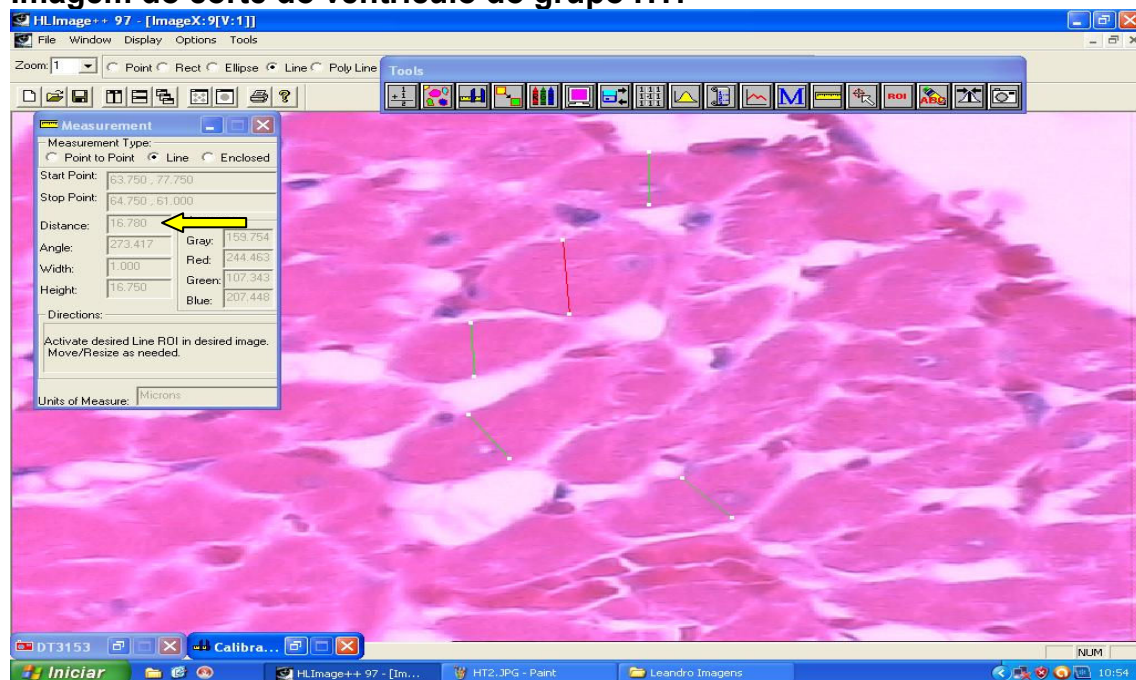
Foram medidos os menores diâmetros das células musculares cardíacas cortadas perpendiculares.

→ Valor do diâmetro da célula muscular cardíaca.

●● Distância do menor diâmetro celular mensurado.

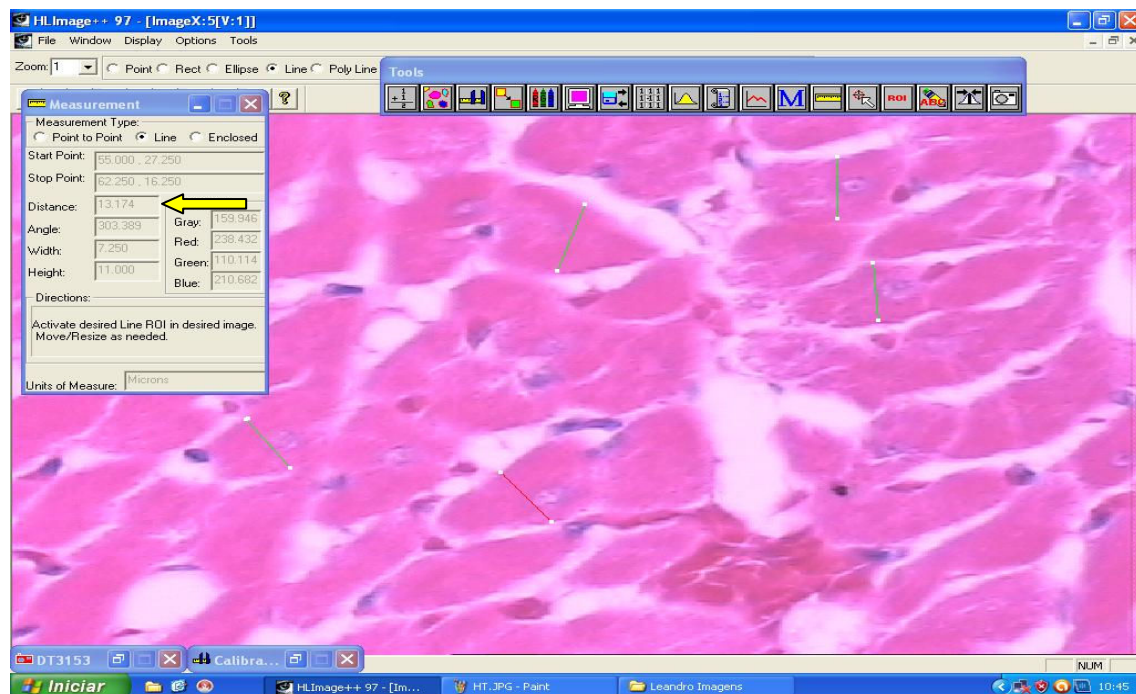
●● Distância do menor diâmetro celular determinado.

Imagem do corte do ventrículo do grupo HT.



Foram medidos os menores diâmetros das células musculares cardíacas cortadas perpendiculares.

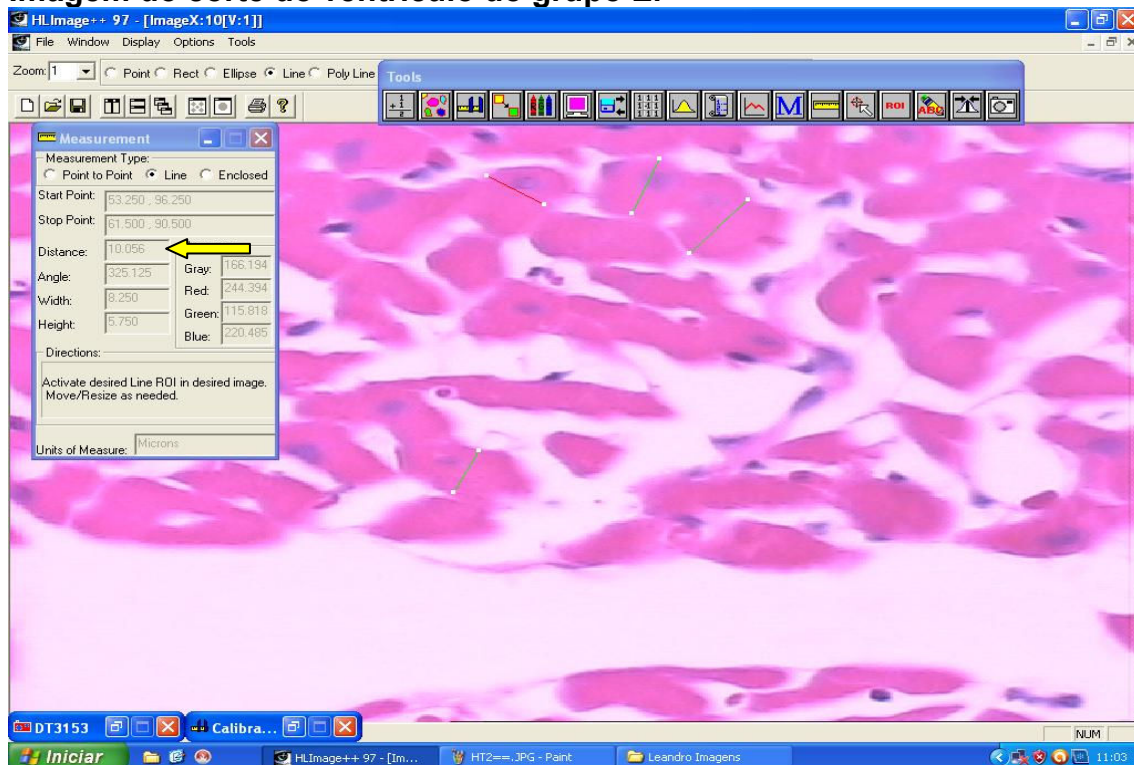
- Valor do diâmetro da célula muscular cardíaca.
- Distância do menor diâmetro celular mensurado.
- Distância do menor diâmetro celular determinado.



Foram medidos os menores diâmetros das células musculares cardíacas cortadas perpendiculares.

- Valor do diâmetro da célula muscular cardíaca.
- Distância do menor diâmetro celular mensurado.
- Distância do menor diâmetro celular determinado.

Imagem do corte do ventrículo do grupo E.

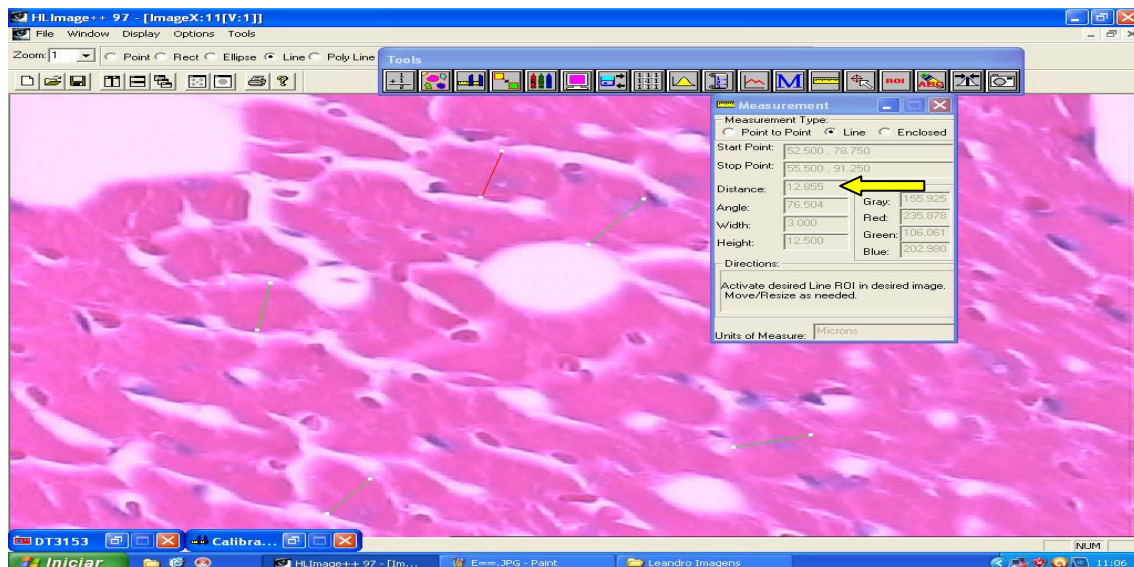


Foram medidos os menores diâmetros das células musculares cardíacas cortadas perpendiculares.

→ Valor do diâmetro da célula muscular cardíaca.

●-● Distância do menor diâmetro celular mensurado.

●-● Distância do menor diâmetro celular determinado.



Foram medidos os menores diâmetros das células musculares cardíacas cortadas perpendiculares.

→ Valor do diâmetro da célula muscular cardíaca.

●-● Distância do menor diâmetro celular mensurado.

●-● Distância do menor diâmetro celular determinado.