

## Excesso de Hormônio Tireoideano em Curto Prazo Afeta o Coração, mas não Afeta a Atividade Adrenal em Ratos

*Short-Term Thyroid Hormone Excess Affects the Heart but Does not Affect Adrenal Activity in Rats*

Ariani Cavazzani Szkudlarek<sup>1</sup>, Bruno Aldenucci<sup>1</sup>, Nelson Itiro Miyagui<sup>1</sup>, Ilana Kassouf Silva<sup>1</sup>, Rosana Nogueira Moraes<sup>2</sup>, Helton Estrela Ramos<sup>3</sup>, Rosalva Tadeu Hochmuller Fogaça<sup>1</sup>

Universidade Federal do Paraná<sup>1</sup>, Curitiba, PR; Pontifícia Universidade Federal do Paraná<sup>2</sup>, Curitiba, PR; Universidade Federal da Bahia<sup>3</sup>, Salvador, BA - Brasil

### Resumo

**Fundamento:** O hipertireoidismo (Hi) exerce um amplo leque de influências em diversos parâmetros fisiológicos. Seu efeito perturbador sobre o sistema cardiovascular é um de seus impactos mais importantes. Além disso, o Hi foi clinicamente associado com o estresse induzido pela hiperativação do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal.

**Objetivo:** Avaliar o impacto do Hi de curto prazo sobre o desempenho cardíaco e a atividade adrenal de ratos.

**Métodos:** A indução de Hi em ratos Wistar através de injeções de T3 (150 µg/kg) por 10 dias (grupo com hipertireoidismo – GH) ou veículo (grupo controle). O desempenho cardiovascular foi avaliado por: ecocardiograma (ECO); razão peso do coração/peso corporal (mg/gr); contratilidade de músculos papilares isolados (MPI) e mensuração direta da pressão arterial. A atividade adrenal foi avaliada pela razão peso adrenal/ peso corporal (mg/gr) e níveis de 24 horas de corticosterona fecal (CF) no 1º, 5º e 10º dias de tratamento com T3.

**Resultados:** No GH, o ECO mostrou redução dos Volumes Finais Sistólico e Diastólico, Tempos de Ejeção, Relaxamento Isovolumétrico e Diastólico Total, Áreas Sistólicas e Diastólica e razão E/A. Aumentaram a frequência cardíaca, a fração de ejeção e o débito cardíaco. A razão peso corporal/peso do coração foi maior. Da mesma forma, nos MPI, a taxa máxima de degradação da força durante o relaxamento foi maior em todas as concentrações extracelulares de cálcio. Os níveis de pressão arterial sistólica (PAS) foram maiores. ( $p \leq 0,05$ ). Por outro lado, não houve diferença na razão peso das adrenais/peso corporal ou níveis de 24 horas de CF.

**Conclusões:** O Hi induz efeitos inotrópicos, cronotrópicos e lusitrópicos positivos no coração através de efeito direto do T3, e aumenta a PAS. Essas alterações não estão correlacionadas com as alterações na atividade adrenal. (Arq Bras Cardiol. 2014; 102(3):270-278)

**Palavras-Chave:** Hormônios tireóideos; Hipertireoidismo / complicações; Glândulas suprarrenais; Ratos; Doenças cardiovasculares.

### Abstract

**Background:** Hyperthyroidism (Hy) exerts a broad range of influences on a variety of physiological parameters. Its disruptive effect on cardiovascular system is one of its most remarkable impacts. Moreover, Hy has been clinically associated with stress – induced hyperactivation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis.

**Objective:** Evaluate the impact of short-term Hy on cardiac performance and adrenal activity of rats.

**Methods:** Induction of Hy in Wistar rats through injections of T3 (150 µg/kg) for 10 days (hyperthyroid group - HG) or vehicle (control group). The cardiovascular performance was evaluated by: echocardiography (ECHO); heart weight/body weight (mg/gr) ratio; contractility of isolated papillary muscles (IPM) and direct measurement of blood pressures. Adrenal activity was evaluated by adrenal weight/body weight (mg/gr) ratio and 24-hour fecal corticosterone (FC) levels on the, 5<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> days of T3 treatment.

**Results:** In HG, the ECHO showed reduction of the End Systolic and End Diastolic Volumes, Ejection, Total Diastolic and Isovolumic Relaxation Times, Diastolic and Systolic Areas and E/A ratio. Heart Rate, Ejection Fraction and Cardiac Output increased. The heart weight/body weight ratio was higher. Similarly, in IPM, the maximum rate of force decay during relaxation was higher in all extracellular calcium concentrations. Systolic blood pressure (SBP) levels were higher. ( $p \leq 0.05$ ). On the other hand, there was no difference in the adrenal weight/body weight ratio or in the 24-hour FC levels.

**Conclusions:** Hy induces positive inotropic, chronotropic and lusitropic effects on the heart by direct effects of T3 and increases SBP. Those alterations are not correlated with changes in the adrenal activity. (Arq Bras Cardiol. 2014; 102(3):270-278)

**Keywords:** Thyroid hormones; Hyperthyroidism / complications; Adrenal glands; Rats; Cardiovascular diseases.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Ariani Cavazzani Szkudlarek •

Alameda Prudente de Moraes, 732, apto. 54, Centro. CEP 80430-220, Curitiba, PR - Brasil

E-mail: arianiinaira@yahoo.com.br

Artigo recebido em 18/06/13; revisado em 12/08/13; aceito em 19/09/13.

DOI: 10.5935/abc.20140014

### Introdução

Os hormônios tireoidianos (HT) induzem mudanças acentuadas no funcionamento de diversos sistemas fisiológicos, incluindo os sistemas cardiovascular e de estresse. Na verdade, a maioria dos estudos tem se concentrado nas alterações da função cardíaca e vasos sanguíneos em presença de hipo e hipertireoidismo (Hi). Em geral, os HT aumentam o metabolismo basal e o consumo de oxigênio atuando diretamente sobre o coração e os vasos sanguíneos<sup>1-4</sup>. As avaliações clínicas e experimentais são frequentemente baseadas na demonstração, por um lado, do aumento na contratilidade miocárdica e da frequência cardíaca (FC), e por outro, a redução da resistência total vascular periférica (RTVP) seguida por uma diminuição da eficiência cardíaca em longo prazo. Bases moleculares revelaram esse fenômeno, demonstrando a regulação de genes relacionados com o acoplamento excitação-contração (AEC) do coração, que se sabe estar associado com o aumento dos efeitos inotrópicos, cronotrópicos e lusitropicos positivos. Além disso, o excesso de HT também foi clinicamente associado com o aumento da atividade do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA). A razão é que os pacientes com hipertireoidismo necessitam receber cortisol, indicando uma diminuição da reserva adrenal<sup>5</sup>. Embora os HT pareçam interagir com o eixo HPA, poucos estudos têm abordado se essa associação é verdadeira em humanos e animais<sup>5-9</sup>. Além disso, existe uma falta de conhecimento do papel dos HT e os efeitos do Hi na secreção de corticosterona. Os efeitos do Hi *in vivo* (Ecocardiografia - ECO) e *in vitro* (músculos papilares isolados - MPI) nas funções sistólica e diastólica e na função adrenocortical nunca foram confirmados em quaisquer estudos. Além disso, medimos a corticosterona nas fezes (concentração de Corticosterona Fecal - CF), permitindo o monitoramento das concentrações de corticosterona através de uma técnica livre de retroalimentação.

Usando um modelo animal de Hi, no qual as alterações cardíacas puderam ser confirmadas e o estado de estresse não foi alterado por manipulações ou técnicas invasivas, nosso objetivo foi realizar uma análise plena do desempenho cardíaco, tanto "*in vivo*" quanto "*in vitro*", assim como verificar o impacto do Hi de curto prazo sobre a função adrenocortical.

### Métodos

#### Animais

Ratos Wistar machos de dois meses de idade, pesando cerca de 250 gramas, foram separados aleatoriamente em dois grupos: grupo controle (GC, n = 12) e grupo com hipertireoidismo (GH, n = 12).

Ratos do GH foram injetados (*i.p.*) com T3 (150 µg/kg) (Sigma Aldrich Chemicals, St. Louis, MO)<sup>10</sup> diariamente, durante 10 dias. Os ratos do GC receberam diariamente injeções *i.p.* do veículo. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais sob um ciclo claro/escuro de 12 horas. O Comitê de Ética em Experimentação Animal da Seção de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná

aprovou todos os protocolos experimentais utilizados nesse estudo.

#### Níveis hormonais basais

Foram medidos os níveis de concentração de T4 e T3 em ambos os grupos de animais, utilizando um ensaio imunométrico em fase sólida quimioluminescente de duas voltas, realizada com o analisador Immulite 2000.

#### Ecocardiografia

A ECO foi realizada em animais anestesiados (50 mg/kg de cetamina - Fort Dodge, Iowa, EUA e de 10 mg/kg de xilazina - Bayer, Alemanha, intramuscular)<sup>11</sup>. A análise funcional foi realizada por um dispositivo bidimensional para ecocardiografia transtorácica (Sonus 5500, Hewlett Packard) com transdutores S12 (5-12 MHz) e 15L6 (7-15 MHz), o que permitiu a análise de até 160 MHz. O transdutor foi colocado na região anterior lateral esquerda do tórax. Os corações foram visualizados em duas dimensões com uma vista axial do ventrículo esquerdo, inclusive as válvulas mitral e aórtica e o ápice na mesma imagem. A conversão digital da imagem foi realizada com a delimitação do septo ventricular e da parede posterior do ventrículo esquerdo. As medidas do volume diastólico final (VDF) do ventrículo esquerdo, volume sistólico final (VSF) do ventrículo esquerdo, tempo de ejeção (TE), tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) e o tempo diastólico total (TDT) foram registrados em cinco ciclos cardíacos consecutivos. O VDF, o VSF e a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) foram medidos utilizando o método de Simpson. O débito sistólico (DS) foi estimado pela subtração do VSF do VDF. O TDT foi medido a partir do início do fechamento da válvula aórtica até o fechamento da válvula mitral. O TE foi medido desde a abertura até o fechamento da válvula aórtica. O TRIV foi medido a partir do intervalo de tempo entre o fechamento da válvula aórtica e o começo do fluxo mitral. O tempo de contração isovolúmica (TCI) foi obtido pela medição do intervalo de tempo do início do fechamento da válvula mitral até a sua reabertura (FMRM) e subtraindo-a do resultado medido da soma do TRI e TE. O padrão de enchimento do ventrículo esquerdo foi avaliado pela razão E/A, a qual foi calculada dividindo-se a velocidade de pico do enchimento diastólico precoce (E) pela velocidade de pico do fluxo sistólico atrial (A). A FC foi calculada como o inverso do período entre dois picos do complexo QRS do eletrocardiograma (ECG). O índice de Tei, que indica a função ventricular diastólica e sistólica global<sup>12</sup>, foi calculado pela soma do tempo de contração isovolúmica e tempo de relaxamento isovolúmico dividido pelo tempo de ejeção, como descrito anteriormente<sup>13</sup>. A variável A (VA) foi calculada pela soma do tempo sistólico e o TRIV. A razão VDF/peso corporal foi calculada como um índice do desempenho ventricular intrínseco de acordo com o peso do animal. O trabalho sistólico (TS) avalia o desempenho ventricular através da multiplicação do DS e da pressão arterial média (PAM). A variabilidade do observador foi registrada para duas medidas em uma amostra aleatória de ratos. O coeficiente de correlação e padronização do erro estimado foi calculado de acordo com método de Bland e Altman.

### Pressão arterial, razão peso do coração/peso corporal, razão peso Adrenal/peso corporal e medidas de contração do músculo papilar isolado

Após 24 horas, os animais foram anestesiados conforme descrito acima. A pressão arterial foi medida através da colocação de uma cânula ligada a um transdutor de pressão (WPI-World Precision Instrument, modelo BLPR) no interior da artéria carótida direita, alimentando um registrador de gráficos e um conversor analógico/digital (Data Translation 2821) ligado a um PC para aquisição e análise de dados, usando o software Lab Pro Tech. Após 15 minutos de estabilização, medimos a pressão arterial sistólica (PAS), a diastólica (PAD) e a PAM. A resistência vascular periférica total (RVPT) foi calculada dividindo a PAM pelo DC. Usando a mesma cânula, amostras de sangue foram separadas em alíquotas de soro, centrifugadas e congeladas a -200 °C para posterior dosagem hormonal.

O coração e a suprarrenal direita foram então removidos e o seu peso úmido medido e expresso em mg/gr de peso corporal. A seguir, o coração foi perfundido com uma solução de Tyrode continuamente borbulhada com 95 % de O<sub>2</sub> e 5 % de CO<sub>2</sub>, através de uma cânula inserida na aorta. Os músculos papilares do ventrículo direito foram removidos e suas extremidades foram fixadas com grampos em O. Os músculos foram transferidos para uma câmara muscular de 10 mL, onde uma extremidade foi fixada a um braço móvel e a outra a um transdutor de força (WPI, F10). Eles foram então superfundidos com solução de Tyrode. A saída do transdutor de força alimentou o registrador de fita (Lafayette Instruments Company) e o sistema digital de aquisição de dados. Os músculos papilares foram estimulados eletricamente a 0,5 Hz com pulsos quadrados supramáximos através de eletrodos de placa de platina paralelos usando um gerador de pulso isolado. Todos os músculos foram esticados até o comprimento no qual obtemos a sua força de contração máxima. O comprimento e os diâmetros das preparações foram medidos sob o microscópio. Após os experimentos, determinou-se o peso muscular úmido. Assumindo uma área de secção transversal uniforme e densidade muscular de 1,06 g/cm<sup>3</sup>, a área da secção transversal (AST em mm<sup>2</sup>) foi calculada dividindo-se o peso úmido pelo produto do comprimento e densidade dos músculos:  $AST = \text{massa (mg)} / (\text{comprimento (mm)} \times \text{densidade (1,06 g/cm}^3\text{)})$ . Em todos os casos, os músculos papilares foram estimulados durante um período de equilíbrio de 45 min. Então, a concentração de cálcio da solução de Tyrode foi consecutivamente alterada para 1,0; 2,0; 3,0; 5,0 e 10,0 mM. A taxa máxima de desenvolvimento de força durante a contração ( $dF/dt_{\text{max}}$ ) e a taxa máxima de degradação da força durante o relaxamento ( $dF/dt_{\text{min}}$ ) foram medidas em todas as concentrações de cálcio. Para avaliar a dependência do tempo de repouso na força contrátil gerada pelos músculos papilares, a potenciação pós-pausa (PPP) foi medida através da interrupção da estimulação eléctrica em 1, 3, 5, 10 e 20 segundos<sup>14</sup>. Para medir a quantidade de potenciação, a força produzida pela primeira contração depois do período de repouso foi considerada como a PRP e normalizada para o estado de contração estável anterior.

### Avaliação da influência do Hi na CF

Para monitorar a influência do Hi na atividade adrenocortical, fizemos a extração e medição da concentração de CF, de acordo com o peso fecal, conforme descrito<sup>15,16</sup>. As amostras de fezes de 24 horas de ambos os grupos de animais foram recolhidas no primeiro, quinto e décimo dias do tratamento. Elas foram secas, pesadas e armazenadas a -20 °C. A obtenção das amostras foi efetuada às 13:00 hs e nos dias em que as gaiolas não eram limpas<sup>15,17</sup>. Além disso, a razão peso adrenal/peso corporal foi usada para combinar a análise de dados, uma vez que esse parâmetro é alterado apenas em condições de aumento da estimulação da pituitária no córtex adrenal<sup>7</sup>.

### Análises estatísticas

Duas amostras foram comparadas pelo teste *t* de Student. A análise de variância com um fator foi aplicada para comparações múltiplas seguida pelo teste de Tukey, utilizando os softwares SigmaPlot 9.0 e Sigma Stat 2.0. Para garantir um melhor controle do erro tipo I, para amostras repetidas foi aplicado o pós-teste de Bonferroni, que é mais preciso do que o pós-teste de Tukey quando há um pequeno número de grupos, já que o nível de significância é dividido pelo número total de grupos utilizados ( $\alpha/n$ ). Os dados foram expressos como média  $\pm$  EP de pelo menos 8 observações. A significância estatística foi assumida para  $p \leq 0,05$ .

## Resultados

### Níveis hormonais basais

Os níveis de T4 foram ligeiramente inferiores no grupo tratado com T3:  $2,54 \pm 0,4$  mg/dL e  $2,1 \pm 0,47$  mg/dL, respectivamente ( $p > 0,05$ ). Os níveis de T3 sérico foram significativamente mais elevados no grupo tratado com T3:  $35 \pm 11,3$  ng/dL e  $103 \pm 16,4$  ng/dL, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ).

### Ecocardiografia

Os dados da ECO são mostrados nas Tabelas 1 e 2. No GH a ECO mostrou redução do VSF, VDF, TDT, TE, TRIV, Área Diast., Área Sist., VA e razão E/A; a FC, FE e DC aumentaram. Em ambos os grupos, não houve alteração entre os grupos em relação ao TCI, DS, índice de Tei e TD. A razão VDF/peso corporal não foi diferente entre os grupos (GC:  $0,002$  mL/g  $\pm$   $0,0001$  e GH:  $0,0018$  mL/g  $\pm$   $0,0001$ ) e o TS foi maior no GH (GC:  $33,792$  mL/mmHg  $\pm$   $1,11$  e GH:  $38,11$  mL/mmHg  $\pm$   $1,36$ ).

Pressão arterial, Razão peso do coração/peso corporal e medições das contrações papilares

Os níveis de PAS foram maiores no HG. Os valores da PAS, PAD e PAM ( $\pm$  EP, em mmHg) obtidos no grupo controle foram  $112 \pm 14$ ,  $97,6 \pm 11$  e  $102,4 \pm 12$ , respectivamente, enquanto nos ratos com hipertireoidismo foram  $135,4 \pm 15,0$ ,  $116,7 \pm 19$  e  $122,93 \pm 16,5$ , respectivamente. Não houve diferença na RVPT (mmHg/ml/min) entre os grupos. Os valores calculados no GC e GH foram:  $1,15 \pm 0,1$  e  $1,04 \pm 0,09$ , respectivamente.

**Tabela 1 – Dados de Desempenho Cardíaco de Animais do Grupo Controle (GC) e Grupo Hipertireoidismo (GH) obtidos por Ecocardiografia**

	VSF	VDF	TRI	TCI	TDT	FC	TE	FE
GC	0,19 ± 0,01	0,52 ± 0,02	27 ± 0,006	16 ± 0,002	131 ± 0,01	270 ± 14	84 ± 0,001	63 ± 0,5
GH	0,12* ± 0,01	0,43* ± 0,02	18* ± 0,002	15 ± 0,001	100* ± 0,004	380* ± 9,2	59* ± 0,001	72* ± 1,2

Os valores são médias ± EP de oito animais. \*  $P < 0,05$  em comparação com animais de controle. Tempo - em ms. Volume - em mL. VSF: volume sistólico final; VDF: volume diastólico final; TRI: tempo de relaxamento isovolumétrico; TCI: tempo de contração isovolumétrica; TDT: tempo diastólico total; FC: frequência cardíaca; TE: tempo de ejeção; FE: fração de ejeção.

**Tabela 2 – Dados de Desempenho Cardíaco de Animais do Grupo Controle (GC) e Grupo Hipertireoidismo (GH) obtidos por Ecocardiografia**

	DS	DC	VA	TD	Área diast.	Área Sist.	Índice Tei	E/A
GC	0,33 ± 0,01	89 ± 7,98	127 ± 0,002	45 ± 0,002	0,99 ± 0,014	0,54 ± 0,01	0,5 ± 0,03	1,9 ± 0,24
GH	0,31 ± 0,02	118* ± 6,82	92* ± 0,002	43 ± 0,002	0,9* ± 0,02	0,42* ± 0,01	0,54 ± 0,02	1,57* ± 0,35

Os valores são médias ± EP de oito animais. \*  $P < 0,05$  em comparação com animais de controle. Tempo - em ms. Volume - em mL. Área - em  $cm^2$ . DS: Débito sistólico; DC: débito cardíaco; área diast.: área diastólica; área sist.: área sistólica; VA: variável A; TD: tempo de desaceleração da onda E; E/A: razão E/A.

O peso corporal (g) foi de  $309 \pm 19$  no GC e  $296 \pm 25$  no GH. A razão peso do coração/peso corporal (mg/gr) foi maior no GH. Os valores ( $\pm$  EP) foram  $3,3 \pm 0,16$  no GC e  $5,1 \pm 0,36$  no GH ( $p \leq 0,05$ ).

A AST papilar do GC e GH foram  $0,42 \pm 0,16$  e  $1,05 \pm 0,6$   $mm^2$ , respectivamente. Como mostrado na Figura 1, os grupos não mostraram diferenças estatísticas na força de contração máxima ( $mN/mm^2$ ) (GC:  $62 \pm 28,7$ ; GH:  $56,3 \pm 22,1$ ) e na PPP (1, 3, 5, 10 e 20 segundos), em quaisquer das concentrações de cálcio extracelular utilizadas como mostrado na Figura 1, para a concentração de cálcio de 2 mM. Um registro original de 3 seg de PPP de MPI sendo estimulado eletricamente em 0,5 Hz do GH é mostrado na Figura 2. No entanto, a concentração de cálcio externo necessária para produzir 50% da força máxima foi estatisticamente diferente entre os grupos. Essa concentração (mM) foi de  $0,85 \pm 0,25$  no GC e  $0,66 \pm 0,2$  no GH.

No GH, a  $dF/dt_{max}$ , que indica a velocidade de contração do MPI, foi maior somente com 2 mM de  $Ca^{2+}$  (Figura 3). No entanto, a  $dF/dt_{min}$ , que indica a velocidade de relaxamento do MPI foi superior com 1, 2, 3 e 5 mM de  $Ca^{2+}$  (Figura 4).

#### Influência do Hi de curto prazo na razão peso adrenal/peso corporal e CF

Não houve diferença na razão peso adrenal/peso corporal (mg/gr). Os valores ( $\pm$  EP) foram  $0,091 \pm 0,01$  no GC e  $0,1 \pm 0,013$  no HG. Em contraste, houve uma diferença na CF no quinto dia de tratamento. No entanto, não houve diferença no dia 10, quando as experiências foram efetuadas (Tabela 3).

#### Discussão

Muitos estudos têm mostrado as interações entre os HT e o sistema cardiovascular<sup>1-3,6,18-20</sup>.

Embora poucos estudos tenham abordado o efeito do excesso de HT no eixo HPA de seres humanos e animais<sup>5-7,9</sup>, o fato de que existe um impacto tem sido clinicamente aceito. No entanto, segundo o nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo a demonstrar as consequências do Hi de curto prazo sobre a função do córtex adrenal na presença de alterações fisiologicamente analisadas do desempenho cardíaco tanto “*in vivo*” quanto “*in vitro*”. Utilizamos um modelo animal e, através de diferentes abordagens, mostramos os efeitos diretos (hipótese do miocárdio) e hemodinâmicos (hipótese vascular – Lei de Frank Starling) dos HT no DC. Também demonstramos que as influências do Hi de curto prazo no sistema cardiovascular não resultam em alterações da função do córtex adrenal, isto é, as alterações observadas nos ratos com hipertireoidismo de curto prazo são independentes dos efeitos dos HT no córtex adrenal.

Tem sido demonstrado que o Hi induz a hipertrofia cardíaca e intolerância ao exercício. Além disso, Hi resulta em insuficiência cardíaca em longo prazo<sup>21-24</sup>. Também foi sugerido<sup>25</sup> que o Hi é um fator de risco independente para isquemia do miocárdio. Além disso, os achados clínicos têm mostrado uma forte correlação entre a função da tireoide, a massa cardíaca e a hipertrofia ventricular em indivíduos com idades entre 45 e 79 anos<sup>22</sup>. Diferente do que se poderia esperar de uma hipertrofia chamada de “fisiológica”, também foram encontradas alterações histológicas, ou seja, discos intercalares não organizados, FC alta em repouso e diminuição da eficiência cardíaca<sup>22,23</sup>. Com efeito, a taquicardia em repouso, bem como um risco aumentado de desenvolver arritmias<sup>24</sup>, são alguns dos efeitos eletrofisiológicos comumente encontrados no Hi. Em apoio à essa hipótese, os nossos dados em ratos com Hi de curto prazo também mostraram FC alta. A esse respeito, a FC pode ser alterada através da modificação direta das propriedades elétricas, ou pela alteração dos níveis dos fatores neuro-humorais que modulam a atividade do nódulo sinusal<sup>26</sup>. A base molecular do efeito cronotrópico

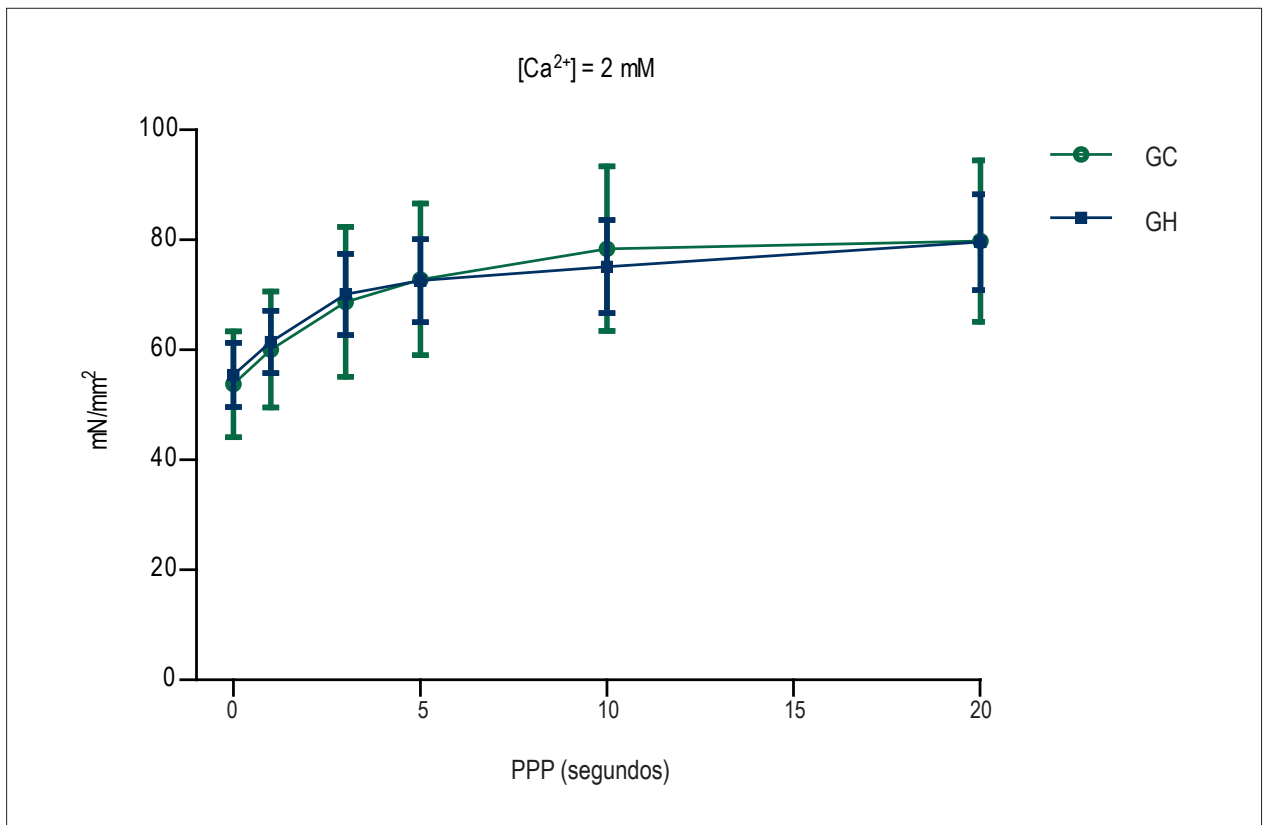


Figura 1 – PPP do MPI do GC e GH em  $[Ca^{2+}]_i$  de 2 mM. Os valores são médias  $\pm$  EP de oito animais. GC: Grupo controle; GH: Grupo Hipertireoidismo.

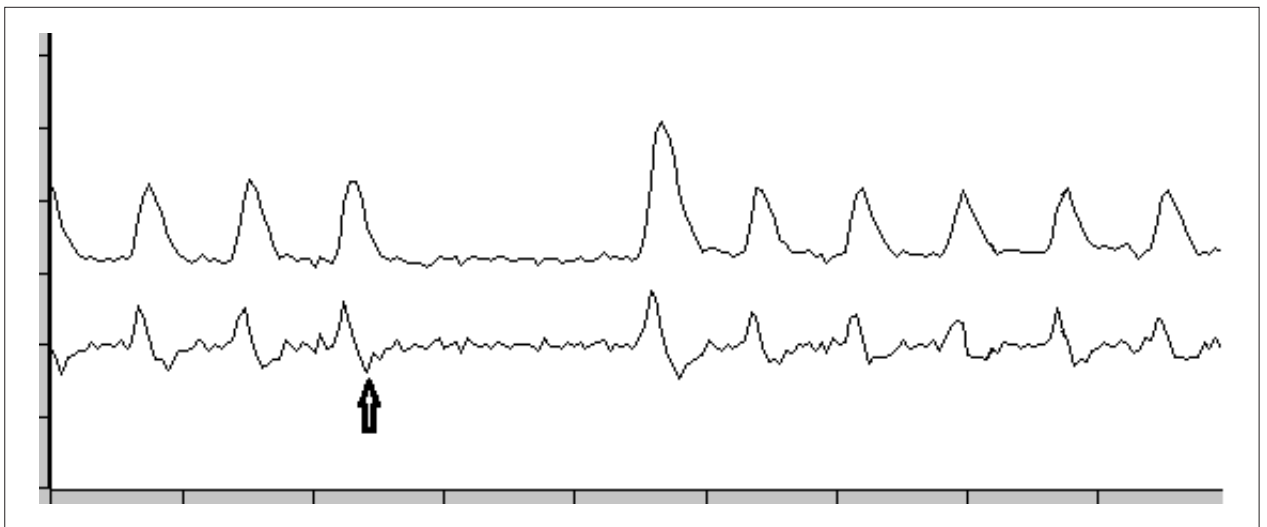


Figura 2 – Registro Original de 3 seg de PPP do MPI eletricamente estimulado a 0,5 Hz do GH.  $[Ca^{2+}]_i$  = 2 mM. Observe o período de pausa entre as contrações de 3 segundos após a seta.

positivo do T3 não está completamente esclarecida. As alterações podem estar na expressão dos dois genes responsáveis pela codificação de canal para  $I_f$  (corrente hiperpolarizante) e  $I_{Ca,T}$  (corrente transitória de cálcio),

embora a  $I_{Ca,T}$  pareça ser a principal e, provavelmente, a mais afetada pelo Hi<sup>27,28</sup>.

Embora o impacto do Hi sobre o sistema cardiovascular tenha sido amplamente estudado, nós contribuimos fortemente para

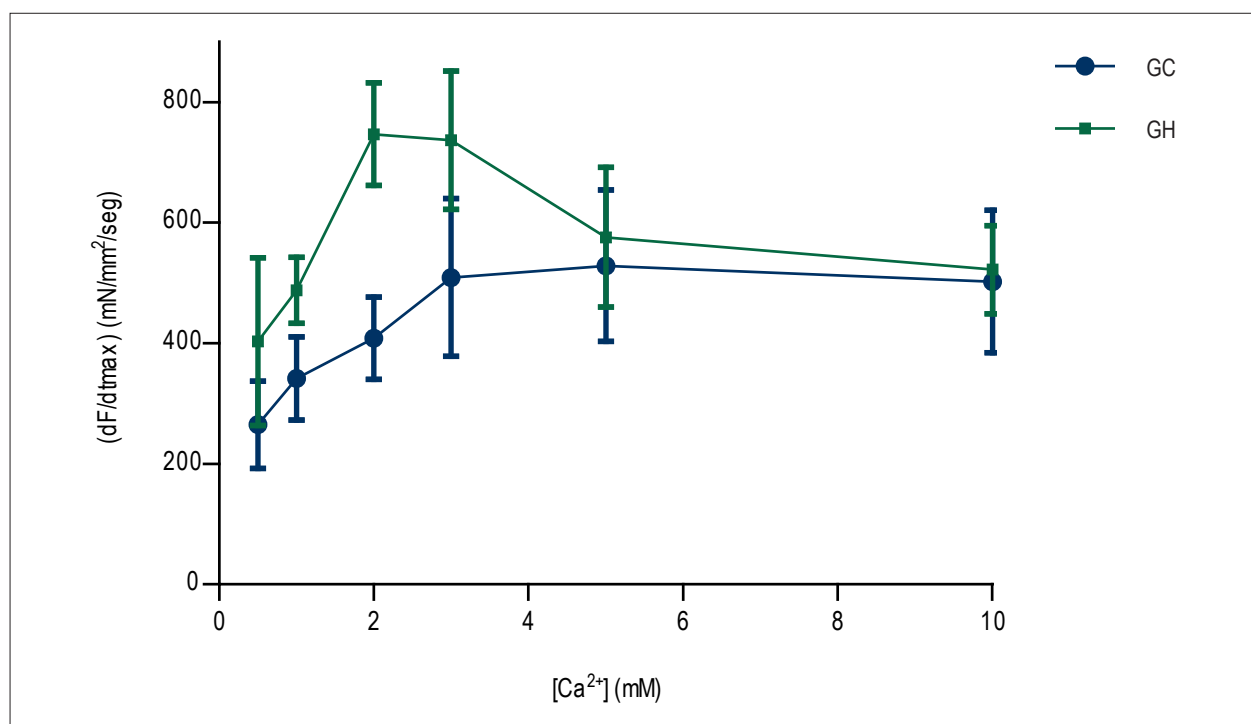


Figura 3 – Taxa máxima de desenvolvimento de força durante a contração ( $dF/dt_{max}$ ) do MPI do GC e GH. GC: Grupo controle; GH: Grupo Hipertireoidismo.

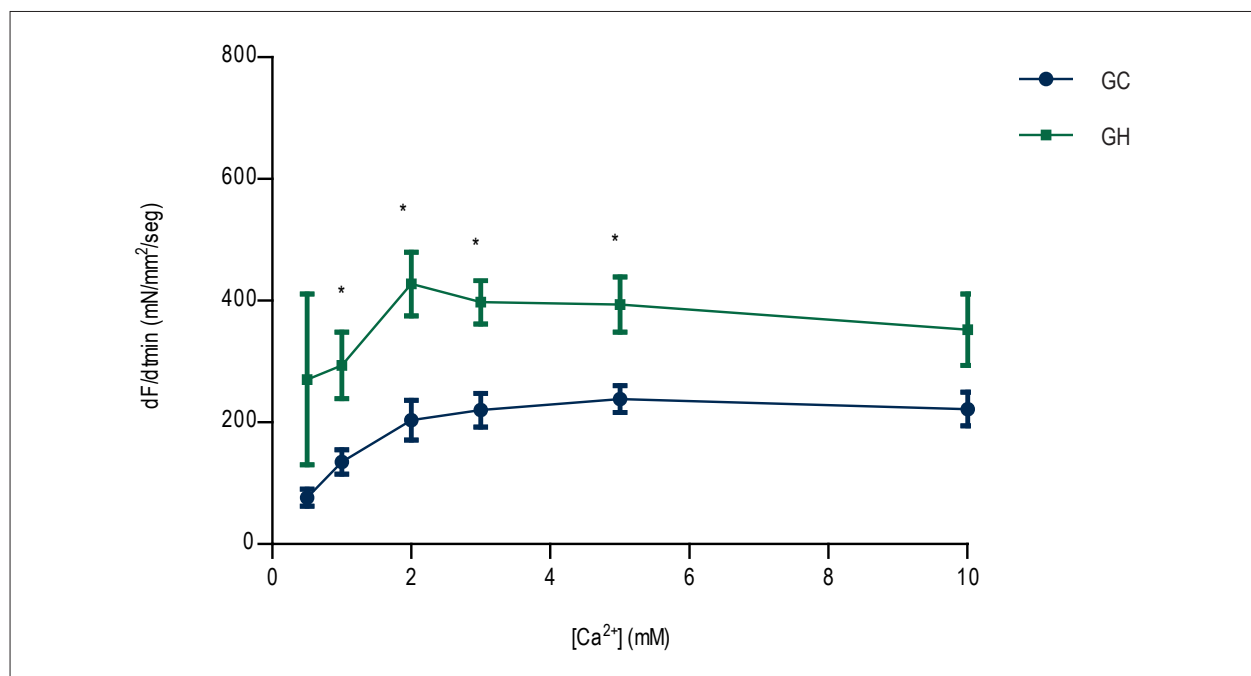


Figura 4 – Taxa máxima de degradação da força durante o relaxamento ( $dF/dt_{min}$ ) do MPI do GC e GH. GC: Grupo controle; GH: Grupo Hipertireoidismo.

uma análise detalhada. Através da combinação de experimentos "in vivo" e "in vitro", confirmamos que as alterações cardíacas observadas em vários estudos existem em ambas as situações.

Além disso, utilizamos o mesmo regime anestésico, tanto na condição "in vivo" como "in vitro", para assegurar uma correlação adequada de resultados conforme previamente estabelecido<sup>29</sup>.

Tabela 3 – Corticosterona Fecal de Animais do Grupo Controle (GC) e Grupo Hipertireoidismo (GH)

GC 1	GH 1	GC 5	GH 5*	GC 10	GH 10
273,19 ± 62,73	317,32 ± 48,96	272,94 ± 30,83	613,54 ± 104,74	305,82 ± 65,79	361,27 ± 65,99

Os valores são médias ± EP de oito animais. \*  $P < 0,05$  em comparação com animais de controle. Concentração em ng/g de fezes. 1: 1º dia de injeção, 5: 5º dia de injeção; 10: 10º dia de injeção.

Em nosso estudo, a massa cardíaca do GH aumentou, conforme mostrado pela razão peso do coração/peso corporal aumentada (mg/gr) do GH. Além disso, o aumento da morfologia hipertrófica do coração e suas alterações funcionais foram confirmados pelas experiências de ECO e PMI. Nossos dados mostraram um aumento da FC, FE, DC (*in vivo*) e  $df/dt_{min}$  (*in vitro*). Da mesma forma, nossos dados mostraram uma diminuição no VDF, VSF, TRIV, TDT, TE, VA e na razão E/A (*in vivo*), os quais em conjunto indicam efeitos positivos inotrópicos, cronotrópicos e lusitropicos. A diminuição do TE e TRIV, assim como  $df/dt_{min}$ , encontrada no GH, podem ser explicadas pelo aumento da taxa de captação de  $Ca^{2+}$  para o retículo sarcoplasmático (SR) e/ou diminuição dos níveis de fosfolambam, o que caracteriza um efeito direto sobre o mecanismo contrátil de regulação do DC. Os nossos resultados também podem explicar a intolerância<sup>3</sup> ao exercício de indivíduos hipertiroideos devido a uma incapacidade de aumentar ainda mais os parâmetros conforme exigido pelo exercício. Isso sugere que os corações dos indivíduos com Hi podem estar operando perto da sua capacidade máxima, ou seja, a reserva cardíaca é diminuída, uma vez que isso justifica a maior incidência de arritmias devido à taquicardia e, em longo prazo, disfunção ventricular e insuficiência cardíaca.

Em contraste, não houve diferença nas medições *in vitro* da força máxima de contração e a  $df/dt_{max}$ . Esses resultados sugerem que um coração com Hi não é capaz de desenvolver uma contração máxima mais forte ou mais rápida durante a sístole do que um coração normal. Por outro lado, a razão para não existirem alterações na força máxima de contração pode ser o TE reduzido *in vivo*, o que resultou em menos tempo para atingir a força máxima. Essa observação está de acordo com os resultados negativos de alterações *in vivo* no DS e TCI. Aqueles resultados correlacionados *in vitro* e *in vivo* também estão de acordo com os estudos sobre a função cardíaca observados no Hi<sup>2,3,6,18</sup>. No entanto, os índices de Tei de ambos os grupos, utilizado para detectar disfunções sistólicas e diastólicas<sup>12,13</sup>, não foram estatisticamente diferentes. Esse resultado aparentemente contraditório só ocorreu porque no GH, o TE diminuiu proporcionalmente ao TRI.

Nossos achados de não alteração no PPP de 1, 3, 5, 10 ou 20 segundos possivelmente indicam que a taxa de captação de  $Ca^{2+}$  para o retículo sarcoplasmático pelo SERCA2a pode refletir, em ambos os grupos, em um descanso longo o suficiente para captação do cálcio para o retículo sarcoplasmático. Esses resultados podem ser devidos à diminuição da expressão do trocador  $Na^+/Ca^{2+}$  no GH. De fato, mostraram que o SERCA2a e o trocador  $Na^+/Ca^{2+}$  estava aumentado e diminuído, respectivamente, em ratos com Hi<sup>30</sup>. Desse modo, uma quantidade menor de  $Ca^{2+}$  deixa as células, mantendo

uma concentração citosólica suficiente para produzir uma resposta PPP semelhante à do GC.

Em relação ao impacto do Hy na pré-carga, tem sido sugerido que a complacência venosa está aumentada no Hi. Portanto, a pré-carga aumenta<sup>26</sup>. De fato, sob condições fisiológicas (magnitude, raio, espessura da parede e complacência do ventrículo esquerdo) a pré-carga pode ser determinada pelo VDF. Portanto, podemos concluir, a partir dos nossos dados da ecocardiografia de menor VDF, que a pré-carga está reduzida no GH. No entanto, devido à hipertrofia concêntrica, a FC alta encontrada no Hi deveria induzir à diminuição no VDF caso a pré-carga não estivesse aumentada. Assim, o VDF deve ser corrigido para o peso corporal, a fim de atingir um índice de pré-carga mais confiável, uma vez que os animais com hipertireoidismo perdem peso<sup>26</sup>. Dessa forma, nossos resultados não mostram diferença no VDF/peso corporal entre o GC e o GH, indicando fortemente que a pré-carga não está aumentada em animais com hipertireoidismo. Além disso, embora o DS não seja diferente no GH, o que pode ser concluído pelo menor VDF, a FE sobe e dá uma forte evidência do efeito direto dos HT no coração, aumentando a contratilidade. Além disso, o efeito cronotrópico positivo dos HT assegura um maior DC de repouso encontrado no GH, apesar do DS inalterado.

Além disso, avaliamos o efeito do Hi sobre a pressão arterial, uma vez que a disfunção da tireoide está associada à alterações na pressão sistólica e/ou diastólica<sup>4,18,31</sup>. As medidas mostraram uma PAS maior no GH. Esse achado está de acordo com estudos em humanos<sup>31</sup> e dá origem a mais uma evidência do aumento da contratilidade cardíaca no GH. Isso é corroborado pela FE mais alta (em face da diminuição do VDF e VSF), em vez de alterações da RVPT, já que as modificações na RVPT, na ausência de distúrbio da complacência, levariam a um aumento proporcional na PAS e PAD. Por outro lado, alguns estudos têm mostrado uma RVPT reduzida na presença de Hi<sup>32,33</sup>. Considerando que o nosso estudo não encontrou nenhuma diferença significativa na RVPT entre os dois grupos, o aumento da PAS poderia ser resultado do aumento da contratilidade devido à ação direta dos HT sobre o coração, levando a um aumento da força de contração e da FC.

Nossos resultados sugerem efeitos funcionais que estão de acordo com estudos biológicos sobre as ações diretas do HT em termos de expressão e da atividade dos canais iônicos relacionados com o AEC cardíaco, ou seja, a expressão aumentada do receptor de dihidropiridina, RyR, SERCA2a,  $\alpha$ -MHC, actina, troponina I, bomba de  $Na^+/K^+$  e canais de  $K^+$  dependentes de voltagem e expressão reduzida de fosfolambam,  $\beta$ -MHC e trocador  $Na^+/Ca^{2+}$  conforme descrito anteriormente<sup>2,27,30,34,35</sup>.

Por fim, em relação ao córtex adrenal, a ativação do eixo HPA do rato tem sido associada com o Hi<sup>7,9</sup>. A atividade aumentada do eixo HPA é seguida, em questão de minutos, pelo aumento dos níveis de corticosterona (principal glucocorticosteróide em ratos). No entanto, os poucos estudos que abordaram a possibilidade de correlação direta entre a disfunção da tireóide e glândulas adrenais foram realizados através de medições de concentração plasmática basal de ACTH e corticosterona, ambos os quais estão elevados em tireotoxicose<sup>6,36,37</sup>.

Tem sido demonstrado que a concentração de glicocorticoides no sangue não é um indicador apropriado de um evento estressante, porque é influenciado pela amostragem estressante e reflete uma situação transitória<sup>38,39</sup>. Na verdade, a coleta de sangue aumenta os níveis de corticosterona se não for terminada em um período de dois minutos e se o animal estiver sendo manuseado pela primeira vez. Para os ratos, a captura, o tratamento e a coleta de sangue são eventos estressantes. Portanto, eles interferem com as concentrações de glicocorticoide<sup>17</sup>. Em contraste, a coleta de amostra fecal é fácil e permite o monitoramento das concentrações de corticosterona sem estressar o animal. É uma técnica não invasiva para estudar o impacto das diferentes abordagens sobre a atividade adrenal.

Em nosso estudo, foram coletadas amostras fecais de 24 horas para monitorar as influências do Hi no eixo HPA. Seguiram-se injeções de T3 sempre no mesmo horário, ou seja, às 13:00 hrs, uma vez que a interferência do tempo pode influenciar os níveis de corticosterona<sup>16</sup>. Além disso, a coleta de fezes foi feita apenas nos dias em que as gaiolas não eram limpas, pois a defecação aumenta nos dias de substituição da gaiola e este aumento poderia interferir com o CF<sup>17</sup>. Nós medimos a CF no 1º, 5º e 10º dia de tratamento com T3, já que 15% a 25 % de corticosterona é excretada nas fezes. Dessa forma, eliminamos o componente de estresse que acompanha a medição plasmática de corticosterona. A CF foi maior no GH no quinto dia. Mas não houve diferença no décimo dia de tratamento. Fomos capazes de excluir a possibilidade de uma CF maior, encontrada no GH, devido à resposta ao estresse inicial para as injeções, seguidas de adaptação a esse estímulo, porque também aplicamos injeções de veículo no GC. Em vez disso, esse achado mostra que o Hi inicialmente altera a taxa metabólica do córtex adrenal. No entanto, a alteração cessa enquanto se mantém o estado de hipertireoidismo e o feedback negativo do glicocorticoide-ACTH fica intacto<sup>39,40</sup>. Esse achado está de acordo com a razão inalterada do peso adrenal/peso corporal. O crescimento da adrenal está geralmente associado com uma maior estimulação pituitária do córtex adrenal, produzindo hipercortisolismo<sup>7,9</sup>. Esse fato sugere

fortemente que os efeitos do Hi são independentes da ativação do eixo HPA pelos HT. A última afirmação sugere que estudos adicionais com humanos, experimentais e clínicos, são necessários para determinar o impacto do Hi sobre o sistema cardiovascular, bem como a sua interação com a glândula adrenal e, portanto, a necessidade de intervenção clínica na glândula adrenal na tireotoxicose.

## Conclusão

Em conclusão, o presente estudo mostra que o Hi de curto prazo aumenta o DC devido a um aumento na FC. Além disso, aumenta a contratilidade – como demonstrado pela redução na VDF, VSF, TRI, TE e TDT e FE. Finalmente, ele acelera o relaxamento, conforme mostrado pela maior  $dF/d_{tmin}$  do MPI e TRI e reduções do TDT (isto é, o Hi induz efeitos positivos inotrópicos, cronotrópicos e lusitropicos sobre o coração, como mostrado *in vivo* e *in vitro*) e aumenta a PAS. Tais efeitos não estão correlacionados com a hiperativação do eixo HPA. O Hi não aumenta o peso da glândula adrenal ou CF em condições em que o estado de estresse não é alterado por manipulação ou técnicas invasivas. Esses resultados devem ser levados em consideração para investigações clínicas futuras.

## Agradecimento

Gostaríamos de agradecer à CAPES pelo apoio financeiro para esse trabalho.

## Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Szkudlarek AC, Aldenucci B; Obtenção de dados: Szkudlarek AC, Aldenucci B, Miyagui NI; Análise e interpretação dos dados: Szkudlarek AC, Moraes RN; Análise estatística: Silva IK, Fogaça RTH; Obtenção de financiamento: Szkudlarek AC, Silva IK; Redação do manuscrito: Szkudlarek AC; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual: Szkudlarek AC, Fogaça RTH; Supervisão: Ramos HE, Fogaça RTH.

## Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes

## Fontes de Financiamento

O presente estudo foi parcialmente financiado pela CAPES

## Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Ariani Cavazzani Szkudlarek pela Universidade Federal do Paraná.

## Referências

1. Klein I, Ojamaa K. Thyroid hormone-targeting the heart. *Endocrinology*. 2001;142(1):11-2.
2. Kahaly GJ, Dillmann WH. Thyroid hormone action in the heart. *Endocr Rev*. 2005;26(5):704-28.
3. Klein I, Danzi S. Thyroid disease and the heart. *Circulation*. 2007;116(15):1725-35. Erratum in *Circulation*. 2008;117(3):e18.
4. Ferreira MM, Teixeira PF, Mansur VA, Reuters VS, Almeida CP, Vaisman M. Monitorização ambulatorial da pressão arterial em pacientes normotensos com hipotireoidismo subclínico. *Arq Bras Cardiol*. 2010;94(6):806-12.



5. Lizcano F, Salvador J. Effects of different treatments for hyperthyroidism on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008;35(9):1085-90.
6. Tsetsoulis A, Johnson EO, Kalogera CH, Seferiadis K, Tsolas O. The effect of thyrotoxicosis on adrenocortical reserve. *Eur J Endocrinol.* 2000;142(3):231-5.
7. Johnson EO, Kamilaris TC, Calogero AE, Gold PW, Chrousos GP. Experimentally-induced hyperthyroidism is associated with activation of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Eur J Endocrinol.* 2005;153(1):177-85.
8. Gottschalk J, Einspanier A, Ungemach FR, Abraham G. Influence of topical dexamethasone applications on insulin, thyroid hormone and cortisol levels in dogs. *Res Vet Sci.* 2011;90(3):491-7.
9. Johnson EO, Calogero AE, Konstandi M, Kamilaris TC, Vignera SJ, Chrousos GP. Effects of experimentally induced hyperthyroidism on central hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in rats: in vitro and in situ studies. *Pituitary.* 2013;16(2):275-86.
10. Bachman ES, Hampton TG, Dhillon H, Amende I, Wang JF, Morgan JP, et al. The metabolic and cardiovascular effects of hyperthyroidism are largely independent of beta-adrenergic stimulation. *Endocrinology.* 2004;145(6):2767-74.
11. Pabis FC, Miyague NI, Francisco JC, Woitowicz V, Carvalho KA, Faria-Neto JR, et al. Echocardiographic assessment of myocardial infarction evolution in young and adult rats. *Arq Bras Cardiol.* 2008;91(5):321-6.
12. Tei C, Nishimura RA, Seward JB, Tajik AJ. Noninvasive Doppler-derived myocardial performance index: correlation with simultaneous measurements of cardiac catheterization measurements. *J Am Soc Echocardiogr.* 1997;10(2):169-78.
13. Grignola JC, Ginés F, Guzzo D. Comparison of the Tei index with invasive measurements of right ventricular function. *Int J Cardiol.* 2006;113(1):25-33.
14. Bocalini DS, Santos LD, Antonio EL, Santos AA, Davel AP, Rossoni LV, et al. Myocardial remodeling after large infarcts in rat converts post-rest-potential in force decay. *Arq Bras Cardiol.* 2012;98(3):243-51.
15. Young KM, Walker SL, Lanthier C, Waddell WT, Monfort SL, Brown JL. Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in carnivores by fecal glucocorticoid analyses. *Gen Comp Endocrinol.* 2004;137(2):148-65.
16. Touma C, Sachser N, Mosti E, Palme R. Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *Gen Comp Endocrinol.* 2003;130(3):267-78.
17. Saibaba P, Sales GD, Stodulski G, Hau J. Behaviour of rats in their home cages: daytime variations and effects of routine husbandry procedures analysed by time sampling techniques. *Lab Anim.* 1996;30(1):13-21.
18. Ojamaa K, Balkman C, Klein IL. Acute effects of triiodothyronine on arterial smooth-muscle cells. *Ann Thorac Surg.* 1993;56(1 Suppl):61-7.
19. Owen PJ, Sabit R, Lazarus JH. Thyroid disease and vascular function. *Thyroid.* 2007;17(6):519-24.
20. Weltman NY, Wang D, Redetzke RA, Gerdes AM. Longstanding hyperthyroidism is associated with normal or enhanced intrinsic cardiomyocyte function despite decline in global cardiac function. *PLoS One.* 2012;7(10):e46655.
21. Brown L, Fenning A, Chan V, Wilson K, Anderson B, Burstow D. Echocardiographic assessment of cardiac structure and function in rats. *Heart Lung Circ.* 2002;11(3):167-73.
22. Dorr M, Wolff B, Robinson DM, John U, Ludemann J, Meng W, et al. The association of thyroid function with cardiac mass and left ventricular hypertrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(2):673-7.
23. Hu LW, Liberti EA, Barreto-Chaves ML. Myocardial ultrastructure in cardiac hypertrophy induced by thyroid hormone - an acute study in rats. *Virchows Arch.* 2005;446(3):265-9.
24. Dillmann W. Cardiac hypertrophy and thyroid hormone signaling. *Heart Fail Rev.* 2010;15(2):125-32.
25. Casini AF, Gottlieb I, Neto LV, Almeida CA, Fonseca RH, Vaisman M. Angina pectoris em paciente com hipertireoidismo e coronárias angiograficamente normais. *Arq Bras Cardiol.* 2006;87(5):e176-8.
26. Biondi B, Klein I. Hypothyroidism as a risk factor for cardiovascular disease. *Endocrine.* 2004;24(1):1-13.
27. Le Bouter S, Demolombe S, Chambellan A, Bellocq C, Aimond F, Toumaniantz G, et al. Microarray analysis reveals complex remodeling of cardiac ion channel expression with altered thyroid status: relation to cellular and integrated electrophysiology. *Circ Res.* 2003;92(2):234-42.
28. Mangoni ME, Nargeot J. Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol Rev.* 2008;88(3):919-82.
29. 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.* 2005;22(8):665-70.
30. Jiang M, Xu A, Narayanan N. Thyroid hormone downregulates the expression and function of sarcoplasmic reticulum-associated CaM kinase II in the rabbit heart. 2006. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(3):384-94.
31. Iglesias P, Acosta M, Sánchez R, Fernández-Reyes MJ, Mon C, Díez JJ. Ambulatory blood pressure monitoring in patients with hyperthyroidism before and after control of thyroid function. *Clin Endocrinol.* 2005;63(1):66-72.
32. Diekman MJ, Harms MP, Ender E, Wieling W, Wiersinga WM. Endocrine factors related to changes in total peripheral vascular resistance after treatment of thyrotoxic and hypothyroid patients. *Eur J Endocrinol.* 2001;144(4):339-46.
33. Axelband F, Dias J, Ferrão FM, Einicker LM. Nongenomic signaling pathways triggered by thyroid hormones and their metabolite 3-iodothyronamine on the cardiovascular system. *J Cell Physiol.* 2011;226(1):21-8.
34. Brent GA. The molecular-basis of thyroid-hormone action. *N Engl J Med.* 1994;331(13):847-53.
35. Reed TD, Babu GJ, Ji Y, Zilberman A, Ver Heyen M, Wuytack F, et al. 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.* 2000;32(3):453-64.
36. Kamilaris TC, Debold CR, Johnson EO, Mamalaki E, Listwak SJ, Calogero AE, et al. Effects of short and long duration hypothyroidism and hyperthyroidism on the plasma adrenocorticotropin and corticosterone responses to ovine corticotropin-releasing hormone in rats. *Endocrinology.* 2005;128(5):2567-76.
37. Harvard CW, Saldanha VF, Bird R, Gardner R. Adrenal function in hyperthyroidism. *Br Med J.* 1970;1(5692):337-9.
38. Bamberg E, Palme R, Meingassner JG. Excretion of corticosteroid metabolites in urine and faeces of rats. *Lab Anim.* 2001;35(4):307-14.
39. Vasconcellos AS, Marie OM, Chelini RP, Marcelo ABV, Guimarães CA, Oliveira CA. Comparison of two methods for glucocorticoid evaluation in maned wolves. *Pesq Vet Bras.* 2011;31(1):79-83.
40. Pecori GF, Pesce S, Maroni P, Pagliardini L, Lasio G, Losa M, et al. Inhibitory effect of prepro-thyrotrophin-releasing hormone on adrenocorticotrophic hormone secretion by human corticotroph tumours. *J Neuroendocrinol.* 2010;22(4):294-300.