SEVERINO DENICIO GONÇALVES DE SOUSA

EFEITO DO HIPOTIROIDISMO E DA OOFORECTOMIA NA FUNÇÃO CARDÍACA DE RATAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Drª. Maria Luiza Morais Barreto de Chaves

São Paulo
2017

SEVERINO DENICIO GONÇALVES DE SOUSA

EFEITO DO HIPOTIROIDISMO E DA OOFORECTOMIA NA FUNÇÃO CARDÍACA DE RATAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Drª. Maria Luiza Morais Barreto de Chaves

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD);

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Sousa, Severino Denicio Gonçalves de Sousa
EFEITO DO HIPOTIROIDISMO E DA OOFORECTOMIA NA FUNÇÃO CARDÍACA DE RATAS / Severino Denicio Gonçalves de Sousa Sousa; orientador Maria Luiza Morais Barreto de Chaves . -- São Paulo, 2017.
84 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. . I. , Maria Luiza Morais Barreto de Chaves, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a):

Titulo da Dissertação:

Orientador:

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão publica realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **036** nas fls.**31** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Maria Luiza Morais Barreto de Chaves,** Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeito do hipotiroidismo subclínico na função cardiovascular de ratas submetidas ou não à ooforectomia*" do qual participam o(s) aluno(s) **Severino Denicio Gonçalves de Sousa** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **24.03.2015, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 24 de março de 2015.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador- CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Aos meus pais, Antônio e Laís, por toda força e incentivo para minha educação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as dádivas recebidas. Obrigado por estar sempre ao meu lado, dando forças para seguir em frente.

Gostaria de agradecer de modo especial à minha orientadora, Prof[a]. Dra. Maria Luiza Morais Barreto de Chaves, que foi a pessoa com quem conversei, em março de 2014 falando do meu desejo de fazer Pós-graduação em Anatomia, que me concedeu a oportunidade e abriu as portas para eu vir para São Paulo tentar realizar o meu sonho. Sou grato também pelo modo gentil, paciente e humano com que me recebeu no laboratório. Pelas dicas, cobranças, diálogos, confiança depositada, ensinamentos, e especialmente pela experiência de vida e profissional que emitiu e emite todos os dias. Tenho uma grande gratidão, respeito e carinho pelo senhora. Muito grato!

À Gabriela Placoná Diniz, pelo uso do laboratório, pela simplicidade, amizade, conselhos e por todo carinho.

Ao Prof. Júlio Orlando Tirapegui Toledo por autorizar a utilização dos serviços e equipamentos de seu laboratório.

Às professoras Luciana Venturini Rossoni, Renata Frazão e à Dra.Cintia Bagne Ueta, pela participação nos meus exames de qualificação e pelas valiosas sugestões.

À Ivanir, técnica do laboratório do Prof. Júlio Orlando Tirapegui, pela boa vontadee prontidão demonstrados no auxílio de alguns experimentos.

À técnica do laboratório LBCAF e amiga Marina Fevereiro, um ser humano sensacional que sempre me incentivou e torceu por mim. Além de me auxiliar em praticamente todos os experimentos. Sou muito grato por tudo o que me fez. Você também faz parte dessa conquista.

Aos técnicos do didático, Adão, Carlinhos, Edinho, Everton e Milton pela amizade, disponibilidade das peças anatômicas, quando solicitadas.

Aos meus pais, Antônio e Laís, pelas orações realizadas e por sempre me apoiarem em busca da realização dos meus sonhos. Obrigada por compreenderem minha ausência e por acreditarem em minha capacidade de vencer. Vocês são os meus maiores exemplos!

Aos meus Irmãos Damiana, Danúbio e Dairla pelo incentivo e por todo carinho.

À minha namorada Vanessa, pelo carinho, afeto, amor, companheirismo e compreensão. Você é importantíssima em minha vida.

Aos meus amigos Dr. Ivson e sua esposa Cinthya, pessoas humanas, capazes de abrir as portas da sua própria casa para me receber mesmo sem me conhecer. Ivson foi fundamental para os meus primeiros passos dentro do laboratório. Muito obrigada pelos ensinamentos, pela paciência, parceria, e pela disposição em me ajudar sempre! Sinto muito orgulho de termos trabalhado juntos.

À minha amiga Sônia Soto, uma pessoa maravilhosa, que está sempre disposta a ajudar os amigos. Uma amiga de verdade! Foi a primeira a me dar a mão quando mais precisei. Obrigado pelo colo, pelas risadas e pelas ajudas. Ganhei uma grande amiga aqui em São Paulo e tenho certeza que é muito verdadeira a nossa amizade.

Aos colegas e amigos do laboratório, Aline, Beatriz, Caroline Lino, Leticia, Nathalia Senger, Renata, Vanessa Lima, pelo companheirismo, apoio na realização dos experimentos e amizade que cativamos durante este período de convívio.

Aos amigos de outros laboratórios: Luciano, Victoria, Ligia, Rudá, Marcio, Luana, Diego, Miguel, Jéssica, Mirela, João, Wiliam, André, Marcos, Flavia, Bárbara, pela amizade, conversas, convívio e companheirismo.

Aos amigos do CRUSP: José, Cristiano, Thatiane, Pedro, Cesar, Juliam, Felipe, Carlos, Otávio, Bruno, Iuri, Alexandro, Alex, Oscar, Michele pela convivência, respeito e amizade construída.

Ao Phablo Abreu, com quem moro e divido momentos de alegria, angústia e incertezas. Obrigado pelos conselhos, ajudas e parceria; você é uma pessoa especial.

À secretária da pós-graduação Patrícia, pela atenção, compreensão e disponibilidade em todas as situações.

Aos funcionários e professores do Departamento de Anatomia, pelo convívio e momentos compartilhados, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Biotério, Renaide, Renivaldo, Rodrigo e Fábio, que sempre nos receberam com disponibilidade. Obrigado pelo apoio para a realização deste trabalho.

Aos funcionários da Biblioteca do ICB que colaboraram na correção e formatação do texto.

A todos cujos nomes não foram mencionados, mas que, de alguma forma, cooperaram para a concretização deste trabalho.

Ao Professor Gilberto Oliveira, pela simplicidade, amizade, pelo encanto de ver sua aula, por todo o que aprendi e continuo aprendendo dentro da anatomia com o senhor.

Ao Professor Eduardo Guimarães, um ser humano sensacional que sempre me incentivou e torceu por mim. Por toda a amizade e prazer de acompanhar suas aulas. Sou muito grato e tenho muito carinho e respeito pelo senhor.

Aos Professores Marta Kerntopf e Irwin Rose que contribuíram das mais diferentes maneiras para minha formação (aulas, palestras, conversas, concelhos...).

Gostaria de à minha ex-orientadora, Profa. Dra. Roseli Barbosa, que foi a pessoa que muito contribuiu para o meu crescimento.

Aos amigos da URCA: Maria Ivaneide, Andressa Alencar, Andreza Guedes, Luiz Jardelino, Fernando, Marcos, Leda, seu Luiz, Daniele Oliveira, Laura Hevila, Luiz Pereira, Valter Sales, Renata Sampaio, Rayane Oliveira, Álefe Brito, Anita Oliveira, Ana Luiza, Datiane Morais, Emmily Sales, Poliana Moreira, Renata Rodrigues, André Macêdo, Tiago Ribeiro, Gyllyandeson Delmondes, Demontier, Saulo Relison, Luzia Paulo, Érika Amaro, Gerlânia Oliveira, Larissa Rolim, Rodolpho Sobreira, Thales Coutinho, Tania Maria, Camila Caetano, Micilania Vieira, Maria Audilene. Gratidão a cada um de vocês pelo convívio, pelos momentos maravilhosos que compartilhamos e pelo amor, que tenho a cada um em reciprocidade, o qual me fez ter inspiração para realização deste trabalho.

Ao Professor Edson Aparecido Liberti, pela pessoa, didática, motivação, pelo encanto de ver sua aula e por tudo que tenho aprendido.

A amiga Maria Karolyna Ferreira de Oliveira por todo o apoio, deposição e prontidão em ajudar. Meu muito obrigado.

Agradecimento ao Conselho Nacional de Pesquisa – **CNPq**

Pela bolsa concedida e pelo suporte financeiro do projeto e outros projetos desenvolvidos em nosso laboratório.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas
lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser,
mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Martin Luther King

RESUMO

SOUSA, S. D. G. **Efeito do hipotiroidismo e da ooforectomia na função cardíaca de ratas.** 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Este trabalho avaliou, em corações isolados de ratas Wistar, através do sistema de perfusão ex vivo - Langendorff, diferentes parâmetros de função cardíaca, frente a um evento de Isquemia e reperfusão. Foram estabelecidas duas situações experimentais: a primeira avaliou o efeito do hipotireoidismo na condição clínica (Hipo) e no hipotireoidismo subclínico (HTS) sobre os parâmetros de função cardíaca. O segundo avaliou o efeito da ooforectomia sobre os mesmos parâmetros (OO). Após a realização dos protocolos experimentais, os animais foram decapitados, o coração rapidamente retirado e perfundido com solução de Krebs-Henseleit durante 30 min de estabilização. Após esse período os parâmetros de Pressão Desenvolvida pelo Ventrículo Esquerdo (LVDP),Pressão Diastólica Final (EDP) e Pressão de Perfusão foram similares entre os grupos. Porém, a Primeira Derivada Positiva das Pressões (+dP/dt), Primeira Derivada Negativa das Pressões (-dP/dt) e frequência cardíaca foram menores no grupo Hipo, em relação ao controle. Após o período de estabilização, os corações foram submetidos a um período de 20 min de isquemia (fluxo zero), com posterior restauração do fluxo (período de reperfusão). Após a reperfusão, os corações Hipo apresentaram EDP, +dP/dt e -dP/dt mais próximos aos encontrados no respectivo período de estabilização, quando comparados as demais grupos. Os grupos HTS ou OO não apresentaram diferenças significativas quanto a esses parâmetros, indicando que essas duas condições foram insuficientes para alterar a recuperação cardíaca após um evento isquêmico.

Palavras-chave: coração isolado, isquemia e reperfusão, hipotireoidismo, hipotireoidismo subclínico e ooforectomia.

ABSTRACT

SOUSA, S. D. G. 2017.Effect of hypothyroidism and oophorectomy in the cardiac function of female rats. 84 p. Master thesis (Morphological Sciences) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

This work evaluated, in isolated hearts of Wistar rats, through the perfusion system ex vivo - Langendorff, different parameters of cardiac function, after Ischemia-reperfusion (I-R). Two experimental situations were established: the first evaluated the effect of hypothyroidism on the clinical condition (Hypo) and subclinical hypothyroidism (HTS) on the parameters of cardiac function. The second evaluated the effect of oophorectomy on the same parameters (OO). After performing the experimental protocols, the animals were decapitated, the heart rapidly withdrawn and perfused with Krebs-Henseleit solution for 30 min of stabilization. After this period the parameters of Left Ventricle Developed Pressure (LVDP), Final Diastolic Pressure (EDP) and Perfusion Pressure were similar between groups. However, the First Positive Pressure Derivative (+ dP / dt), First Negative Derivative Pressures (-dP / dt) and heart rate were lower in the Hipo group, in relation to the control group. After the stabilization period, the hearts were submitted to a 20 min period of ischemia (zero flow), with subsequent flow restoration (reperfusion period). After 35 min reperfusion, Hipo hearts presented EDP, + dP / dt and -dP / dt closer to those found in the respective stabilization period, when compared to the other groups. The HTS or OO groups did not present significant differences in these parameters, indicating that these two conditions were insufficient to alter the cardiac recovery after an ischemic event.

Key words: isolated heart, ischemia and reperfusion, hypothyroidism, subclinical hypothyroidism and oophorectomy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico representativo das distribuições hormonais nas diferentes condições de hipotireoidismo 28

Figura 2. Pipeta com ponta romba 35

Figura 3. Coleta do lavado vaginal 35

Figura 4. Fotomicrografia demonstrando os tipos de células encontradas em cada fase do ciclo estral: (A) proestro, (B) estro, (C) metaestro e (D) diestro . 36

Figura 5. Exposição do ovário direito 37

Figura 6. Sutura com pontos simples 37

Figura 7. Efeito da ooforectomia no trofismo uterino 38

Figura 8. Extração do lobo esquerdo da glândula tireoide 39

Figura 9. Sutura da região cervical 39

Figura 10. Desenho experimental 40

Figura 11. Sistema de perfusão de coração isolado – Langendorff 42

Figura 12. Coração de rato canulado no sistema de perfusão 42

Figura 13. Registro gerado pelo software LabChart 8 43

Figura 14. Análise plasmática da dosagem do T3 sérico total 45

Figura 15. Análise plasmática da dosagem do T4 sérico total 46

Figura 16. Análise plasmática da dosagem do TSH sérico total 47

Figura 17. Análise plasmática da dosagem do Estradiol sérico total 49

Figura 18. Análise da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP), no período de estabilização nas diferentes fases do ciclo estral 51

Figura 19. Análise da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP), exibido como % em comparação ao controle (período de estabilização), aos 35 minutos de reperfusão, referentes às diferentes fases do ciclo estral..... 51

Figura 20. Análise da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP), em milímetros de mercúrio (mmHg), no período de estabilização 52

Figura 21. Análise da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP), exibido como % em comparação ao controle (período de estabilização), aos 35 minutos de reperfusão 53

Figura 22. Análise da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (EDP) em mmHg, no período de estabilização 54

Figura 23. Análise da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (EDP), exibido como % em comparação ao controle (período de estabilização), aos 35 minutos de reperfusão 54

Figura 24. Análise da primeira derivada positiva das pressões (+dP/dt) em mmHg no período de estabilização 55

Figura 25. Análise da primeira derivada positiva de pressão por tempo (+dP/dt), exibida como % em comparação ao controle (período de estabilização), aos 35 minutos de reperfusão 56

Figura 26. Análise da primeira derivada negativa de pressão por tempo (-dP/dt) em mmHg, no período de estabilização 57

Figura 27. Análise da primeira derivada negativa de pressão por tempo (-dP/dt), exibido como % em comparação ao controle (período de estabilização), aos 35 minutos de reperfusão 58

Figura 28. Análise da frequência cardíaca (em batimentos por minuto, BPM), no período de estabilização 58

Figura 29. Análise da frequência cardíaca, apresentada em batimentos por minuto (BPM), a como % em comparação ao controle (período de estabilização), aos 35 minutos de reperfusão 59

Figura 30. Análise da pressão de perfusão no período de estabilização 59

Figura 31. Análise da pressão de perfusão em (mmHg), exibida como % em comparação ao controle (período de estabilização), aos 35 minutos de reperfusão 60

Figura 32. Análise da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP), em milímetros de mercúrio (mmHg), no período de estabilização 61

Figura 33. Análise da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP), exibido como % em comparação ao controle (período de estabilização), aos 35 minutos de reperfusão 61

Figura 34. Análise da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (EDP) em mmHg, no período de estabilização 62

Figura 35. Análise da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (EDP), exibido como % em comparação ao controle (período de estabilização), aos 35 minutos de reperfusão 62

Figura 36. Análise da primeira derivada positiva das pressões (+dP/dt) em mmHg no período de estabilização 63

Figura 37. Análise da primeira derivada positiva de pressão por tempo (+dP/dt), exibida como % em comparação ao controle (período de estabilização), aos 35 minutos de reperfusão 63

Figura 38. Análise da primeira derivada negativa de pressão por tempo (-dP/dt) em mmHg, no período de estabilização 64

Figura 39. Análise da primeira derivada negativa de pressão por tempo (-dP/dt), exibido como % em comparação ao controle (período de estabilização), aos 35 minutos de reperfusão 64

Figura 40. Análise da frequência cardíaca (em batimentos por minuto, BPM), no período de estabilização 65

Figura 41. Análise da frequência cardíaca, apresentada em batimentos por minuto (BPM), a como % em comparação ao controle (período de estabilização), aos 35 minutos de reperfusão 65

Figura 42. Análise da pressão de perfusão no período de estabilização 66

Figura 43. Análise da pressão de perfusão em (mmHg), exibida como % em comparação ao controle (período de estabilização), aos 35 minutos de reperfusão 66

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Análise do peso corpóreo inicial e final nos diferentes grupos experimentais, controle, Hipo e Hts.....48

Tabela 2. Análise do peso corpóreo inicial e final nos diferentes grupos experimentais, controle e ooforectomia 50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA. Análise de Variância
AR. Receptores de andrógenos
ATP. Trifosfato de adenosina
CEEA. Comissão de Ética em Experimentação Animal
COBEA. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
EDP. Pressão Diastólica Final
ER. Receptores de estrogênio
FC. Frequência Cardíaca
FNA. Fator natriurético atrial
GnHR. Hormônio de liberação de gonadotrofina
GPER. Receptor de estrogênio, acoplado a proteína G
Hipo. Hipotireoidismo
HT. Hormônio tireoidiano
HTS. Hipotireoidismo subclínico
HTs. Hormônios tireoidianos
I. Isquemia
IAM. Infarto agudo do miocárdio
ICB. Instituto de ciências biomédicas
LBCAF. Laboratório de biologia celular e anatomia funcional
LVDP. Pressão Desenvolvida pelo Ventrículo Esquerdo
LVEDP. Pressão Diastólica Final do Ventrículo Esquerdo
LVSP. Pressão Sistólica
MHC. Miosina de cadeia pesada
MHCα. Cadeia pesada de miosina do tipo alfa
OO. Ooforectomia
PKa. Proteína cinase A
PLN. Fosfolamban
PR. Receptores de progestina
R. Reperfusão
SERCA. Retículo sarcoplasmático C^+ ATPase
TRH. Hormônio liberador da tirotrofina
TRS. Receptores de hormônios tireoidianos
TSH. Hormônio tireotrófico
TSH-R. Receptor de TSH
TSHRs. Receptores de TSH
T4. Tiroxina
T3. Triiodotironina
-dP/dt. Primeira Derivada Negativa das Pressões
+dP/dt. Primeira Derivada Positiva das Pressões

LISTA DE SÍMBOLOS

Alfa ..... α
Beta ..... β

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 22

1.1Isquemia/Reperfusão (I/R) 22

1.2 Hormônios tireoidianos..... 23

1.3 Hormônios tireoidianos e função cardíaca 25

1.4 Hormônios ovariano 28

1.5 Hormônios sexuais e a função cardíaca 30

2. OBJETIVOS 31

3 MATERIAL E MÉTODOS 32

3.1 Animais experimentais 34

3.1.1 Grupos experimentais 34

3.1.2.1 Avaliação do ciclo estral 34

3.1.2.2 Ooforectomia..... 35

3.1.2.3 Indução ao hipotireoidismo..... 36

3.2 Dosagens hormonais 40

3.3 Desenho experimental..... 40

3.4 Preparação do coração isolado..... 41

3.5 Aquisição dos dados 43

3.6 Análise estatística 43

4. RESULTADOS 45

4.1 Caracterização dos modelos experimentais..... 45

4.1.1 Quantificação dos níveis séricos de T3 total 45

4.1.2 Quantificação dos níveis séricos de T4 total 45

4.1.3 Quantificação dos níveis séricos de TSH total 46

4.2 Efeito do Hipotireoidismo subclínico e do Hipotireoidismo sobre o peso corporal 47

4.3 Caracterização da ooforectomia 48

4.3.1 Quantificação dos níveis séricos de estradiol total..... 48

4.4 Efeito da ooforectomia sobre o peso corporal 49

4.5 Diferentes fases do ciclo estral e função cardíaca 50

4.6 Efeito do Hipotireoidismo subclínico, Hipotireoidismo, Ooforectomia e do Hipotireoidismo subclínico + Ooforectomia sobre parâmetros da função cardíaca em corações isolados de ratas submetidas à situação de isquemia e reperfusão 52

4.6.1 Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP)..... 52

4.6.2 Pressão diastólica final (EDP) 53

4.6.3 Primeira derivada positiva das pressões (+dP/dt) 55

4.6.4 Primeira Derivada Negativa das Pressões (-dP/dt) 56

4.6.5 Frequência Cardíaca 58

4.6.6 Pressão de perfusão 59

4.7 Efeito da ooforectomia, sobre parâmetros da função cardíaca em corações isolados de ratas submetidas à situação de isquemia e reperfusão 60

5. DISCUSSÃO 67

5.1 Confirmação e caracterização do modelo experimental de (1) hipotireoidismo, (2) hipotireoidismo subclínico, (3) diminuição dos níveis de hormônios ovarianos e (4) hipotireoidismo subclínico e diminuição dos níveis de hormônios ovarianos 67

5.2 Efeito do hipotireoidismo sobre parâmetros cardíacos após um evento de isquemia e reperfusão 70

5.3 Efeito das diferentes fases do ciclo estral sobre os parâmetros cardíacos, após evento de isquemia e reperfusão 71

5.4 Efeito da ooforectomia sobre parâmetros cardiacos após um evento de isquemia e reperfusão 72

6. CONCLUSÃO..... 74

7. REFERENCIAS 75

1. INTRODUÇÃO

O coração corresponde a uma bomba contrátil propulsora que, frente a um sistema fechado formado pela rede vascular, gera uma pressão sanguínea, a qual é necessária para o estabelecimento de um fluxo sanguíneo, e com ele, a adequada perfusão de tecidos e órgãos. O bombeamento efetivo de sangue depende de um conjunto de forças, entre elas a força contrátil exercida a cada ciclo cardíaco pela musculatura ventricular, a qual no nível celular é absolutamente dependente das concentrações intracelulares do íon cálcio.

Muitos hormônios atuam sobre o coração, modulando o seu trofismo, o seu metabolismo e a sua função contrátil. Assim, alterações nas concentrações plasmáticas de glicocorticóides, noradrenalina, angiotensina II, insulina, hormônios sexuais masculinos e femininos, além dos hormônios tiroideanos atuam diretamente no tecido cardíaco, podendo trazer repercussões funcionais marcantes, tanto em situações normais como após processos de injúria resultantes de Isquemia (I), acompanhados ou não por Reperfusão (R).

1.1- Isquemia/Reperfusão (I/R)

Doenças cardiovasculares, entre elas aquelas que culminam com a deficiência de irrigação do tecido levando ao infarto do miocárdio, correspondem ainda nos dias de hoje a uma das principais, se não a principal, causa de óbitos na população em geral.

A isquemia miocárdica é resultante de um comprometimento do fluxo sanguíneo coronariano, gerado a partir de um desequilíbrio entre a oferta e a demanda de oxigênio. No entanto, se a isquemia decorrente da falta de irrigação pode levar ao infarto, a injúria tecidual que se desenvolve como consequência a episódios de isquemia-reperfusão (I/R), nos quais ocorre a restauração do fluxo sanguíneo aos tecidos ou órgãos isquêmicos, pode levar a efeitos até mais deletérios do que aqueles decorrentes da própria isquemia. Assim, embora a ausência de fluxo sanguíneo contribua para a fisiopatologia de diversas doenças, como o infarto do miocárdio e a insuficiência vascular periférica, a restauração do fluxo sanguíneo ou a reperfusão, mesmo que

necessária, pode por si só agravar o dano celular isquêmico (SILVA JR et al., 2002).

Entre vários fatores que contribuem para essa injúria celular encontra-se o fato do restabelecimento do fluxo sanguíneo após um evento isquêmico ocorrer de modo não-uniforme para todo o tecido, resultando na restauração "caótica" do fluxo tissular, o que pode levar a um círculo vicioso de disfunção endotelial vascular, com redução da perfusão local, edema, entre outras complicações (EVORA et al., 1996). Em teoria o processo é muito simples, a falta de oxigenação e de substratos metabólicos adequados diminui rapidamente a energia disponível para a célula, levando à lesão celular, que pode ser de natureza reversível ou irreversível. Na prática, o processo é muito complexo, uma vez que a extensão da lesão é determinada por vários fatores, como: gravidade da isquemia (baixo fluxo *vs* fluxo zero), duração da isquemia, sequência temporal da isquemia (isquemia curta seguida de isquemia longa), mudanças no ambiente físico e metabólico (normotermia *vs* hipotermia; conteúdo de glicogênio no miocárdio antes da isquemia, composição do perfusato), bem como a resposta inflamatória (PANTOS, 2006).

Ao longo dos últimos anos, os estudos sobre fenótipos de maior tolerância contra a isquemia e reperfusão tornou-se uma importante ferramenta na busca de evidências sobre a resposta adaptativa do coração a um estresse isquêmico. Vários paradigmas de cardioproteção foram identificados e são extensivamente estudados na esperança de encontrar novos alvos terapêuticos para o miocárdio isquemiado. Sabe-se que alguns hormônios desempenham um papel importante na resposta do coração à isquemia. Neste contexto, as alterações hormonais têm sido investigadas na tolerância do miocárdio ao estresse isquêmico (PANTOS et al., 2004).

1.2 Hormônios Tiroideanos

Doenças da glândula tireoide, associadas a alterações das concentrações plasmáticas de hormônios tiroideanos, estão entre as mais frequentes doenças endócrinas encontradas no mundo. Estimativas indicam que essas doenças atingem entre 9% e 15% das mulheres adultas, e em menor porcentagem os homens (CANARIS et al., 2000). Ainda, dados de 2010 indicam que aproximadamente 15% da população brasileira é acometida por

doenças que afetam a glândula tireoide (IBGE, 2010), sendo que alterações das concentrações desses hormônios são capazes de aumentar o fator de risco para o desenvolvimento e progressão das doenças cardiovasculares (SCHMIDT-OTT; ASCHEIM, 2006). Desta forma, fica evidente a importância de se investigar com maior profundidade a ação desses hormônios sobre o coração.

A tireóide é uma glândula localizada na região cervical, anteriormente à traquéia, acima da cartilagem cricóide e inferiormente à cartilagem tiroidea. Esta glândula, que se apresenta dividida em dois lobos, direito e esquerdo, unidos por um istmo, é constituída principalmente por dois tipos de células com origem embriológica distinta: as células C ou parafoliculares - produtoras de calcitonina, que compreendem pouco mais de 1% das células da tireoide, e as células foliculares - produtoras de tiroxina (T4), que se apresentam em maior número. As células folicularesse organizam de forma circular, o folículo, o qual envolve uma matriz gelatinosa denominada de coloide. É no coloide o local onde ocorre a ligação do iodeto aos aminoácidos de tirosina, processo denominado de iodinação (incorporação de iodo). Conforme o conteúdo e distribuição de iodeto, uma série de iodotironinas, a partir dos aminoácidos de tirosina, podem ser formadas, das quais a tiroxina (T4) possui quatro iodos ligados ao seu anel benzênico e a triiodotironina (T3) com somente três iodos.

A síntese e secreção dos hormônios tireoidianos (HTs) é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-tireóide.Em resumo, o hipotálamo sintetiza e secreta o hormônio liberador da tireotrofina (TRH), que alcança a região anterior da hipófise (adenohipófise) e estimula a síntese do hormônio tireotrófico (TSH), que se liga aos receptores de TSH (TSH-R) presentes nas células foliculares da tireoide, ativando a síntese e secreção dos HTs.

Cerca de 80% dos hormônios tireoideanos secretados pela glândula tireóide apresentam-se como T4 e os 20% restantes como T3, o qual é considerado o hormônio tireoidiano biologicamente ativo (SAPIN; SCHLIENGER 2003). O T4 é convertido a T3 por ação de enzimas denominadas deiodinases ou desiodases, localizadas em diversos tecidos do organismo. Assim, embora o T4 esteja presente em maior quantidade, é o T3 o responsável pela maioria das atividades biológicas, agindo em praticamente todas as células do organismo, nas quais modula diretamente a expressão de

diferentes genes e proteínas com funções estruturais, funcionais, metabólicas. Embora hoje sejam já bem reconhecidas ações não-genômicas dos HTs, rapidamente ativadas, as ações genômicas clássicas são mediadas pela ligação a receptores nucleares (TRs), sendo o T3 a principal isoforma responsável por estes efeitos, uma vez que este apresenta uma afinidade de ligação maior quando comparada à do T4 (BEN SANDLER et al., 2004).

1.3 Hormônios Tiroideanos e função cardíaca

O tecido cardíaco corresponde a um dos principais alvos dos HTs, sendo muito sensível a alterações séricas ou locais dos mesmos (KENESSEY; OJAMAA, 2006; TAVARES et al., 2013). Os mecanismos celulares pelos quais os hormônios tireoidianos atuam sobre a função cardíaca sistólica e diastólica são complexos e em diferentes níveis. Os hormônios tireoidianos modulam a expressão e a função de várias enzimas e proteínas envolvidas no desempenho cardíaco, como o retículo sarcoplasmático Ca^{+2} ATPase (SERCA II), Na^{+}/K^{+} ATPase e as cadeias pesadas de alfa/beta-miosina. Assim, o T3 estimula a expressão do gene que codifica a cadeia pesada de miosina do tipo alfa (MHC-α) e reprime o gene da β-MHC, além de aumentar a expressão de outras proteínas contráteis que formam os filamentos finos, como a actina e a troponina I (DIECKMAN; SOLARO, 1990; SHAHRIVAR et al., 2016).

O efeito dos HT sobre a função cardíaca já tem sido intensamente explorado pela literatura. Entretanto, o papel destes hormônios em condições patológicas como aquelas que envolvem fenômenos de isquemia, infarto e insuficiência cardíaca ainda permanece a ser elucidado. Neste sentido, trabalhos realizados tanto em modelos experimentais com animais como em trabalhos clínicos, demonstram que os níveis séricos de T3 caem significativamente após uma injúria cardíaca, estando estes níveis associados a disfunção ventricular esquerda e a alteração em vários genes responsivos ao HT (OJAMAA et al., 2000; PANTOS et al., 2012). Assim, em humanos, uma queda significativa já é observada 48h após a ocorrência de infarto agudo do miocárdio (IAM) (EBER et al., 1995), como também após 6-24h a realização de cirurgia de revascularização miocárdica (HOLLAND et al.,1991).

Segundo Friberg et al. (2002), a diminuição dos níveis séricos de T3 pode então corresponder a um importante fator preditivo para mortalidade após um

IAM, sendo que o tratamento com administração de T3 por quatro semanas, por outro lado, já se mostrou eficiente na melhora da função cardíaca e na normalização da maioria das alterações da expressão de genes-alvos cardíacos dos HT (OJAMAA et al., 2000). Ainda neste contexto, em estudo realizado com grupos de pacientes que sofreram IAM, com ou sem angina pectoris prévia, os autores relatam que a angina parece promover a diminuição dos níveis de HT, representando uma vantagem uma vez que, provavelmente ocorre redução na demanda de oxigênio miocárdico e diminuição da taxa metabólica. No entanto, os mesmos autores discutem que a emergência da falência cardíaca parece ocorrer com maior frequência em pacientes hipotireoideos, quando comparados a pacientes eutireoideos (FRIBERG et al., 2002).

A razão para a diminuição dos níveis séricos dos HT ainda não é bem estabelecida. No entanto, um dos mecanismos que é diretamente influenciado pela queda dos HT em períodos pós-isquêmicos é aquele relacionado ao manejo de cálcio do cardiomiócito, o qual pode vir a contribuir para um quadro denominado de *myocardial stunning*, uma redução reversível da função contrátil do coração após a reperfusão pós-isquêmica, devido a uma sobrecarga de cálcio (KRAUSE et al., 1989).

Davis e Davis (1993) descreveram que os hormônios tireoidianos podem alterar a função ventricular por agir sobre a atividade da Ca^{2+}-ATPase do retículo sarcoplasmático. O ATP é responsável pela remoção do cálcio do citosol durante a diástole, permitindo, dessa forma, o desacoplamento do complexo actina-miosina, sendo de extrema importância para a função cardíaca diastólica (DILLMAN, 1990).

Já é bem conhecido na literatura que o excesso de HTs é capaz de elevar o débito cardíaco de 50 a 300%, aumentando a frequência cardíaca de repouso, contratilidade e fração de ejeção. Por outro lado, o hipotireoidismo apresenta manifestações cardíacas clínicas opostas às do hipertireoidismo, como bradicardia, diminuição da contratilidade cardíaca e diminuição do débito cardíaco (KLEIN; DANZI, 2007;CROWLEY et al., 1977).

Dados do nosso laboratório, utilizando modelo de perfusão de coração isolado de ratos Wistar adultos, revelaram que a recuperação funcional pós-isquêmica foi melhor em animais tratados previamente com T3, quando comparados aos

eutiroideos (TAVARES et al., 2013).Os animais tratados com T3 apresentaram um aumento da expressão do receptor AT2 e uma maior atividade da proteína quinase ativada por AMPK, os quais foram prevenidos após administração de PD123319, um antagonista do receptor AT2, havendo piora da função cardíaca. Embora os efeitos do hipertiroidismo no modelo de I-R já tenham sido previamente descritos, pouco se conhece em relação aos efeitos da deficiência de HTs sobre a função cardíaca, e é neste contexto que o nosso estudo se propõe a contribuir com o avanço do conhecimento nessa área.

O hipotireoidismo, como citado inicialmente, é uma condição relativamente comum, afetando em torno de 15% das mulheres no climatério e até 5% da população mundial (EMPSON et al., 2007). Em humanos, esta doença é classificada, de acordo com as manifestações clínicas, em hipotireoidismo propriamente dito, o qual pode se apresentar em diferentes intensidades, e hipotireoidismo subclínico, no qual as manifestações clínicas não são ainda aparentes, embora os níveis hormonais já se encontrem alterados.

O hipotireoidismo subclínico é definido como um aumento sérico dos níveis de hormônio estimulante da tiróide (TSH) acompanhado de níveis normais de T3 e T4 (Figura 1) (KARTHICK et al., 2013). Já o hipotireoidismo estabelecido, o qual tem sido bem mais estudado em relação ao primeiro, é definido por concentrações séricas de T3 e T4 abaixo dos valores normais, além dos valores de TSH também elevados.

Estimativas apontam que pelo menos 10% das mulheres após o período reprodutivo apresenta hipotireoidismo subclínico, (CANARIS et al., 2000; COOPER, 2008), mostrando ter este distúrbio uma importante relevância como fator de risco cardíaco na população em geral (MADATHIL et al., 2015). Embora esses dados sejam facilmente encontrados na literatura quando se analisa a população humana, não existem estudos em roedores mostrando a variabilidade das concentrações dos HT ao longo da vida, nem tampouco entre os gêneros.

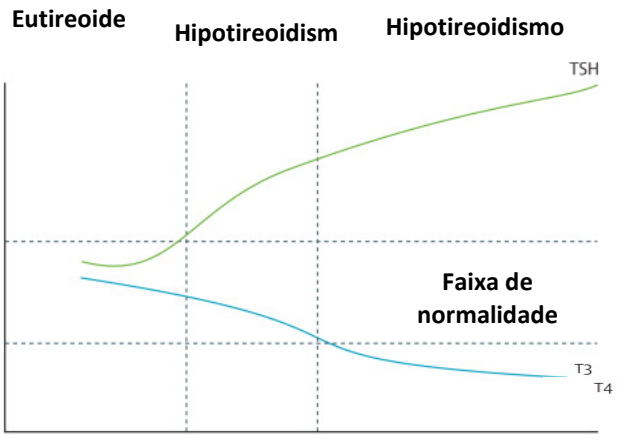

Figura 1. Gráfico representativo das distribuições hormonais nas diferentes condições de hipotireoidismo.
Fonte: Modificado de Yoshimi Ohga et al., 2002.

A disfunção diastólica, com maior tempo de relaxamento isovolumétrico, é a anormalidade cardíaca mais frequente em indivíduos com níveis de T3 e T4 normais e TSH sérico elevado (MONZANI et al., 2001; MEENA et al., 2012). Essas anormalidades geralmente decorrem, como já citado anteriormente, de mudanças na homeostase do cálcio, comprometendo a bioenergética cardíaca, que, no hipotireoidismo subclínico, é normalmente reversível com terapia com levotiroxina ou T4 (MADATHIL et al., 2015).

Embora os efeitos cardíacos associados às condições de hipotireoidismo subclínico ainda sejam incipientes, não se encontram dados na literatura mostrando como o coração, sob essas condições, responderia a situações de isquemia, ou seja, qual o grau de recuperação que o órgão apresentaria após eventos de isquemia, seguidos ou não de reperfusão. Isto se torna ainda mais intrigante se considerarmos a fase na qual o hipotireoidismo subclínico é mais prevalente, ou seja, após a diminuição nos níveis de hormônios sexuais femininos.

1.4 Hormônios ovarianos

Os ovários são órgãos pares em formato oval, localizados na cavidade pélvica e responsáveis pela produção dos gametas femininos. Além de seu papel na produção de gametas, os ovários também atuam como glândulas endócrinas produtoras e secretoras de hormônios esteroides, como os

estrogênios, os andrógenos e os progestágenos, sendo cada um definido por sua atividade biológica e tendo a sua síntese controlada pela liberação pulsátil do hormônio de liberação de gonadotrofina (GnRH). Quando o GnRH é liberado pelo hipotálamo, estimula a produção e secreção dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) pela adeno-hipófise, e estes irão atuar estimulando as gônadas a produzirem e a secretarem os hormônios esteroides, que por sua vez agem sobre os seus respectivos receptores, isto é, receptores de estrogênio (ER), receptores de progestina (PR), e receptores de andrógenos (AR). O grupo dos estrogênios é formado por três potentes hormônios esteroides, sendo eles a: estrona, estriol e estradiol. Os estrogênios encontram-se em níveis elevados no sexo feminino desde o inicio ao final da vida reprodutiva (KNOWLTON; KORZICK, 2014). O estradiol é o mais potente entre os estrogênios e em geral circula em maiores concentrações. Por exemplo, os ovários de ratas secretam 5 a 8 vezes menos estrona do que estradiol ao longo do ciclo estral e da gravidez (SHAIKH, 1971; BLAUSTEIN, 2008; ASARIAN; GEARY, 2013).

Os hormônios estrogênicos agem através de uma série de vias de sinalização que possibilitam efeitos genômicos e não-genômicos. Os estrogênios transmitem a maioria das suas informações ao ligar-se aos seus fatores de transcrição, receptores intracelulares de estrogênio (ERα e ERβ), sendo cada um codificado por um gene distinto (ESR1 e ESR2, respectivamente), apesar de apresentarem homologia quanto à sua sequência (HALL; COUSE; KORACH, 2001). Esses receptores são expressos em tecidos diferentes e são encontrados tanto no citosol como no núcleo. No entanto, também podem estar associados à membrana plasmática e à mitocôndria (HALL; COUSE; KORACH, 2001; LI et al., 2004). Fêmeas nocautes para esses receptores apresentam hipoplasia no trato reprodutivo, falta de desenvolvimento da glândula mamária e excesso de tecido adiposo, enquanto que machos apresentam degeneração testicular e disfunção epididimal (COUSE; KORACH; KORACH, 1999). No ano de 2005 um terceiro receptor de estrogênio, acoplado à proteína G (GPER ou GPR30) foi descrito e, assim como os demais clássicos receptores acoplados à proteína G, este apresenta 7 domínios transmembranares (REVANKAR, 2005).

Além dos efeitos sobre as funções reprodutivas, os estrogênios desempenham papel significativo na regulação da homeostase esquelética, no metabolismo de lipídios e carboidratos, no equilíbrio de eletrólitos, além de atuarem sobre a função do sistema nervoso central e do sistema cardiovascular, citado em (NILSSON; GUSTAFSSON, 2011).

Neste sentido, a diminuição dos níveis de estrógeno ao final da vida reprodutiva, aprece estar associada ao aumento da incidência das doenças cardiovasculares, podendo aumentar de duas a três vezes a incidência de doenças cardíacas coronárias, incluindo o infarto do miocárdio (KANNEL et al., 1976; ROGER et al., 2011; KORZICK; LANCASTER, 2013).

1.5 Hormônios ovarianos e função cardíaca

Em mamíferos, os efeitos dos hormônios ovarianos estão presentes em todos os níveis da fisiologia cardiovascular, desde a duração do potencial de ação, à energia mitocondrial até à função contrátil do miócito cardíaco e relaxamento do coração como um todo (BLENCK et al., 2016; PARKS; HOWLETT, 2013). Tanto os cardiomiócitos como os fibroblastos cardíacos possuem receptores funcionais para grande parte dos hormônios esteroides sexuais, permitindo que estes hormônios regulem tanto a força contrátil da célula muscular, como a produção de colágeno, em processos de remodelamento (GROHÉ et al., 1997; PARKS; HOWLETT, 2013; PUGACH et al., 2016), uma vez que os dois receptores clássicos de estrogênio, ERα e ERβ, são expressos no coração, tanto na fase adulta como na neonatal(GROHÉ et al., 1997).

A retirada dos ovários (ooforectomia) e a consequente diminuição dos níveis de estradiol podem levar a alterações importantes da função cardíaca, no que diz respeito à eletrofisiologia, contração e relaxamento do coração (PARKS; HOWLETT, 2013). Assim, estudos mostram que as propriedades elétricas do coração podem ser diretamente afetadas pela ausência do estrogênio (MCHUGH et al., 1995) contribuindo para a maior frequência de eventos arrítmicos no fim da vida reprodutiva. Neste sentido, um importante estudo mostrou que corações de cães induzidos à arritmia por isquemia e reperfusão, tiveram uma taxa significativamente menor de arritmias quando tratados previamente com estrogênio (MCHUGH et al., 1995). De modo

semelhante, o 17-beta-estradiol marcou uma atividade antiarrítmica dose-dependente, em corações de ratos, quando administrado 10 minutos antes da oclusão da artéria coronária (PHILP et al., 2006). Além disso, miócitos ventriculares, isolados de ratos, tratados com 17-beta-estradiol tiveram redução do pico de corrente de Ca^{+2}do tipo-L, de modo dependente de concentração (PHILP et al., 2006). Outros estudos mecanicistas ligaram a atividade antiarrítmica do estrogênio durante I/R à abertura de canais de K^+ e ao aumento da liberação de óxido nítrico, que inibe o trocador Na^+/H^+ no coração (OGITA et al., 2002; ANDERSON et al., 2005).

Alterações no estado contrátil do coração durante a sístole ou diástole também podem ser encontradas facilmente em ratas ooforectomizadas mostrando o impacto do estrogênio também sobre esses parâmetros cardíacos. Neste sentido, a diminuição do estrógeno em ratas ooforectomizadas promoveu uma menor resposta contrátil dos músculos papilares do ventrículo esquerdo, quando submetidos à estimulação adrenérgica, com menor expressão da proteína SERCA2 (cerca de 50%) e aumento da fosfolamban (PLB) em relação aos animais controle; parâmetros estes que foram restaurados após a reposição com estrogênio (RIBEIRO et al., 2012).

Em relação à circulação coronariana, a queda na produção de hormônios ovarianos também está associada à maior incidência de doenças coronarianas, incluindo o infarto agudo do miocárdio *(*HU et al., *1999;* HAK et al., 2000; GIUBERTI et al., 2007; ALMEIDA et al., 2014). Neste sentido, trabalhos experimentais demonstram que a ausência destes hormônios, após um evento de isquemia e reperfusão, está diretamente associado ao agravamento da disfunção autonômica, aumento do intervalo de tempo de contração e relaxamento ventricular, além de elevar a pressão diastólica final (GIUBERTI et al., 2007; LJ et al., 2010; XUE; XIAO; ZHANG, 2015). Apesar de tantas evidências quanto à importância dos hormônios ovarianos na função cardíaca, não podemos descartar o fato de, no final da vida reprodutiva, diminuições dos níveis dos hormônios ovarianos podem estar acompanhadas por outras condições, que por si só, podem também alterar a função cardíaca, como é o caso do hipotireoidismo subclínico (HAK et al., 2000; LEGRYS et al., 2013). Portanto, o desenvolvimento de trabalhos que avaliem os efeitos de cada uma dessas condições isoladamente, no intuito de descobrir qual o

impacto de cada uma delas frente a um quadro de isquemia e reperfusão, podem contribuir com o avanço do conhecimento na área.

2. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi avaliar, em corações isolados de ratas Wistar adultas, os parâmetros de função cardíaca, após indução das seguintes condições experimentais.

-Diminuição dos níveis plasmáticos de hormônios tiroideanos, simulando o hipotireoidismo.

-Diminuição dos níveis plasmáticos de hormônios ovarianos, induzidos após ooforectomia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo e procedimentos cirúrgicos utilizados no presente estudo estão de acordo com as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas (Protocolo No. 036).

3.1. Animais experimentais

Foram utilizadas ratas adultas jovens (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, com 60 dias, pesando em torno de 200g, provenientes do Biotério de Criação do Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo (USP) e mantidas no Biotério de Experimentação do Departamento de Anatomia (ICB-USP). Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas (40x33cm), sendo quatro animais por gaiola, mantidos em sala climatizada com temperatura controlada, ciclo claro/escuro de 12 horas, tendo livre acesso à ração e água.

3.1.1 *Grupos Experimentais*

Os animais foram aleatoriamente divididos em 4 grupos experimentais:

Grupo 1: Ratas eutireoideas (controle)

Grupo 2: Ratas ooforectomizadas

Grupo 3: Ratas induzidas ao hipotireoidismo (tireoidectomizadas)

Grupo4: Ratas induzidas ao hipotireoidismo subclínico (tireoidectomizadas e suplementadas com T4)

3.1.2.1 <u>Avaliação do ciclo estral</u>

O ciclo estral das ratas foi acompanhado durante duas semanas, mediante a análise de lavados vaginais, realizados entre as oito e nove horas da manhã. O ciclo compreende quatro fases distintas, onde cada fase tem duração variada, e é caracterizada pela prevalência de um tipo celular específico, que está relacionado diretamente com a flutuação dos níveis de estradiol (EVANS; LONG, 1922; MANDL, 1951).

Dois dias antes de iniciar o período de avaliação do ciclo estral, as ratas foram levadas à sala de experimentação com a finalidade de habituá-las ao

novo ambiente. Neste período, as ratas apenas foram contidas fisicamente pelo dorso, para habituar-se tanto o operador quanto os animas à técnica de contenção. Após a adaptação, em um espaço de oito dias, a cada manhã (entre 08:00h e 09:00h) a secreção vaginal foi coletada com uma pipeta de plástico adaptada (com bordas rombas para não machucar as paredes vaginais (Figura 2) contendo 1mL de solução salina (NaCl a 0,9%), por meio da inserção da ponta no orifício vaginal, com cuidado, para não estimular a cérvix uterina (Figura 3). Uma parte dessa solução foi injetada e aspirada rapidamente, e esse lavado foi cuidadosamente despejado sobre uma lâmina de vidro e levada ao microscópio de luz, sem o uso da lente condensadora, com aumento de 10 vezes. Assim, as quatro fases do ciclo estral foram reconhecidas: Proestro – as células epiteliais nucleadas predominam, Estro –as células cornificadas são mais prevalentes, Metaestro – identificam-se três tipos celulares: leucócitos, células epiteliais e células cornificadas, ao passo que é no Diestro que há uma predominância de leucócitos (Figura 4).

O ciclo estral foi considerado irregular quando as fases não estavam em sequência, ou quando uma única fase durava de 3 a 4 dias (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

Figura 2. Pipeta de ponta romba
Fonte: Sousa (2017).

Figura 3. Coleta do lavado vaginal.
Fonte: Sousa (2017).

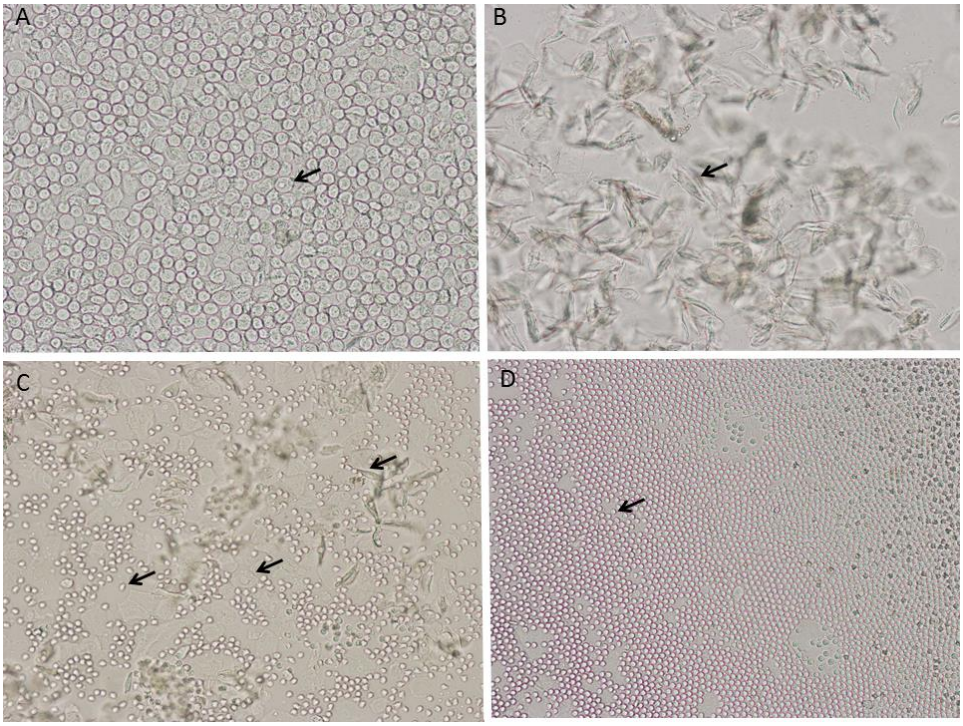

Figura 4. Fotomicrografia demonstrando os tipos de células encontradas em cada fase do ciclo estral: (A) proestro, (B) estro, (C) metaestro e (D) diestro. (Aumento 10x).
Fonte: Sousa (2017).

3.1.2.2 Ooforectomia

Em ratas adultas jovens a ooforectomia é considerada um modelo bastante útil e interessante para estudar a fase na qual a fêmea deixa de ciclar e os seus níveis de estrógeno encontram-se muito reduzidos (LEDEE et al., 2013).

A ooforectomia foi realizada conforme descrito anteriormente por MITTAL e cols (2009). Para tanto, as ratas foram inicialmente pesadas e anestesiadas com injeção intraperitoneal de Ketamina (90mg/kg) e Xilazina (13 mg/kg de peso). Uma vez constatada a anestesia por ausência de resposta à pressão da pata, os animais foram posicionados em decúbito lateral e a região abdominal lateral foi tricotomizada e assepsiada. Posteriormente, foi feita uma incisão, com extensão não superior a três centímetros, em paralelo com a linha do corpo, na pele e na musculatura. Ao seguir a direção caudal, após divulsionar os tecidos subjacentes, os ovários e as tubas uterinas foram localizados e exteriorizados com auxílio de uma pinça de dissecção sem dente, guiados pela sua localização à frente da articulação sacro ilíaca. As tubas foram então amarradas com linha (Algodão/Poliéster, 4-0, AI154, Sutucat)

evitando hemorragia, para em seguida fazer-se a remoção dos ovários (Figura 5).Ao final, a parede abdominal foi suturada com fio de Nylon monofilamentado (4-0, Ny44cT20, Sutucat) em dois planos separados, muscular e pele, mantendo a estratigrafia da região e impedindo a formação de hérnia(Figura 6). Ao término do procedimento cirúrgico, os animais foram colocados isoladamente em gaiolas, expostos a pouca luz, em ambiente silencioso e com temperatura variando entre 27°C e 30°C, até a recuperação plena do anestésico. Nesse período, a ingesta de água foi monitorada.

Para caracterização do modelo experimental, após duas semanas do procedimento cirúrgico, as ratas foram eutanasiadas e após incisão do abdome e isolamento do ovário o útero foi removido. As ratas pertencentes ao grupo controle tiveram o abdome aberto e, posteriormente, suturado, para simular o estresse cirúrgico dos animais. A razão do peso do útero pelo peso corpóreo foi avaliada, permitindo inferir o efeito da ausência dos hormônios gonadais sobre o trofismo uterino, uma vez que já é bem descrito que a condição de pós-ooforectomia diminui bruscamente este trofismo (Figura 7) (SHIBLI-RAHHAL et al., 2012).

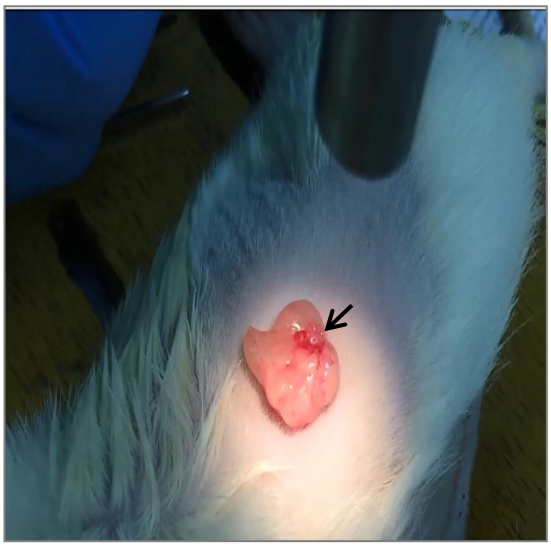

Figura 5 - Exposição do ovário direito.
Fonte: Sousa (2017).

Figura 6. Sutura com pontos simples.
Fonte: Sousa (2017).

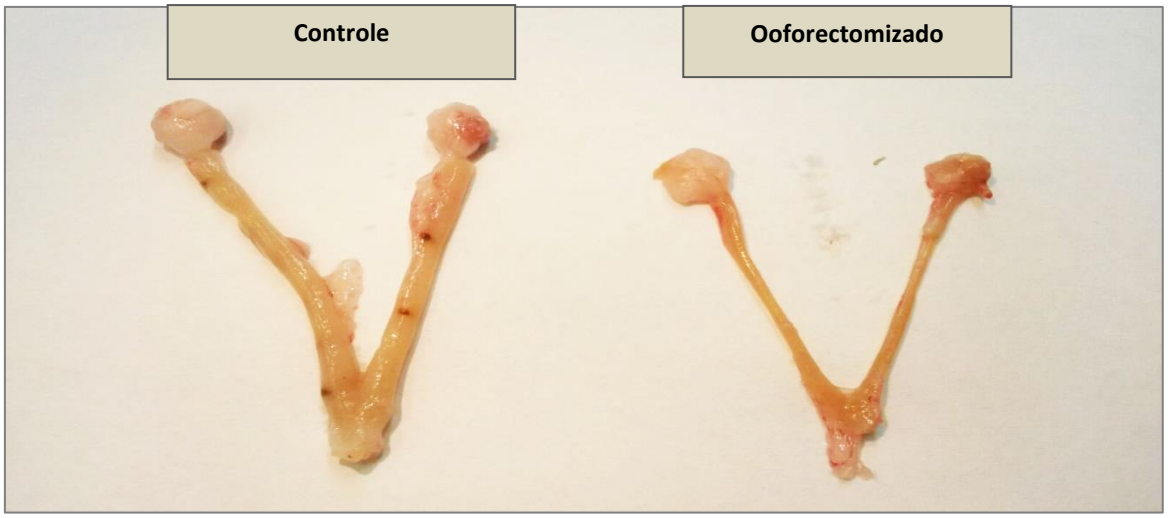

Figura 7. Efeito da ooforectomia no trofismo úterino.
Fonte: Sousa (2017).

3.1.2.3 Indução ao Hipotireoidismo

Para indução ao hipotireoidismo, as ratas foram submetidas à tireoidectomia, retirada da glândula tireoide, que é um dos métodos mais eficientes para se induzir ao hipotireoidismo. KLEIN e cols. (1996) mostraram que 14 dias após a tireoidectomia, as concentrações plasmáticas de T3 e T4 encontravam-se 85% abaixo daquelas em dos ratos controle. Para tanto, os animais foram pesados e anestesiados com injeção intraperitoneal, utilizando-se Ketamina de (90mg/kg) e Xilazina (13 mg/kg de peso) (ARAUJO et al., 2011). Após confirmar a ausência de reflexo, os animais tiveram a região cervical anterior tricotomizada. Em seguida, foram posicionados sobre mesa cirúrgica em decúbito dorsal com o pescoço em extensão e membros fixados no aparato, e procedeu-se a assepsia da região operatória com álcool a 70%. Posteriormente, realizou-se, então, uma incisão sobre a linha média da face ventral da região cervical, que se estendeu da cartilagem tireoide até a base do pescoço (fúrcula esternal). Com abertura da rafe mediana e a divulsão dos músculos pré-tireoidianos (esternocleidomastoideo, omohioideo, esternohioideo e esternotireoideo) no sentido das fibras, possibilitou-se o acesso à glândula tireoide. Após pinçamento e secção do istmo da tireóide, os lobos direito e esquerdo e as paratireoides foram extirpados, tomando cuidado para não lesionar o nervo laríngeo recorrente, principalmente o esquerdo, posicionado mais próximo à glândula (Figura 8).

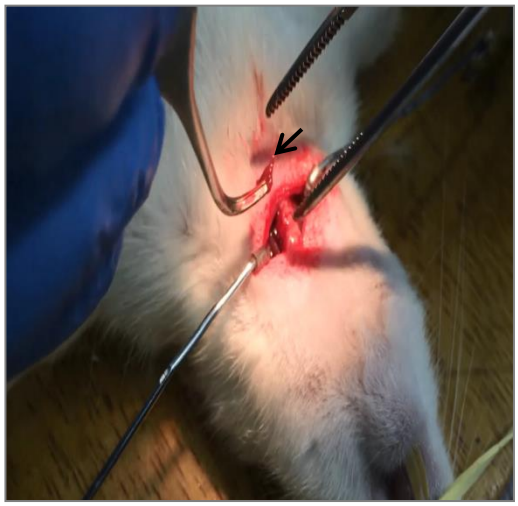

Figura 8. Extração do lobo esquerdo da glândula tireoide. Fonte: Sousa (2017).

Figura 9. Sutura da região cervical. Fonte: Sousa (2017).

A sutura foi realizada com fio de Nylon monofilamentado (4-0, Ny44cT20, Sutucat), preservando a glândula submandibular e tecidos subjacentes. Inicialmente, foi dado um ponto simples no centro da incisão, unindo a tela subcutânea e, por fim, derme e epiderme foram suturadas (Figura 9).

Ao longo do pós-operatório, foi administrado às ratas o metimazol (Methimazole – SIGMA) (0,05%) e 4,5mM de $CaCl_2$ (Cloreto de cálcio - SIGMA), ambos adicionados à água de beber. O metimazol é um fármaco que inibe a síntese de hormônio tiroideanoo que impede uma produção residual de hormônio, caso permaneçam algumas células tiroideanas remanescentes, mesmo após a retirada da glândula. A reposição de cálcio foi realizada uma vez que as glândulas paratireóides foram retiradas.

Um segundo protocolo, que tinha como objetivo a indução de um hipotireoidismo subclínico, foi também realizado. Para tal, após a realização da tireoidectomia, os animais passaram a receber injeções intraperitoneais (1 x ao dia) de L-T4 (tiroxina, Sigma, USA; 1,0 ug/100g de peso corporal), por duas semanas, conforme modelo previamente descrito por Morreale de Escobar e cols. (1995) e por Lu e cols. (2012).

3.2 - Dosagens hormonais

Logo após a decapitação dos animais, amostras de sangue foram coletadas em tubos de microcentrífuga e centrifugadas a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após esta etapa, o soro foi isolado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C. Após esta etapa, o soro foi utilizado para as dosagens de T3, T4 e TSH total utilizando-se um kit comercial (Mililliplex maplex map kit- RTHYMAG – 30k).

As concentrações de estradiol total foram também determinados nas amostras de sangue, usando o kit comercial (Mouse/Rate Estradiol ELISA ES180S-100). Para todos os ensaios foram construídas curvas-padrão utilizadas na determinação das dosagens, conforme recomendação dos fabricantes.

3.3 Desenhos experimentais

Desenhos experimentais que resume os protocolos utilizados nos diferentes grupos partindo da analise do ciclo estral até a eutanásia.

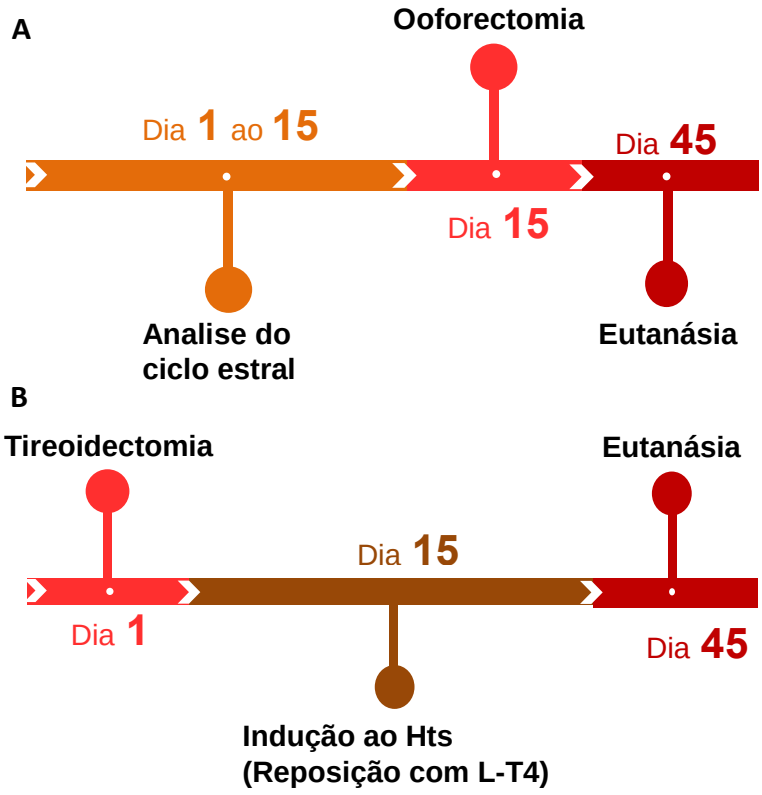

Figura 10. A figura (A) representa o protocolo experimental seguido para a indução da diminuição da concentração dos hormônios ovarianos a partir da retirada dos ovários

(Ooforectomia). Este protocolo teve inicio com a analise do ciclo estral por 15 dias seguido por a cirurgia de ooforectomia e trinta dias após o ato cirúrgico os animais foram sacrificados. Já a figura (B) mostra a indução aos diferentes hipotireoidismos, clinico e subclínico, a partir da retirada da glândula tireoide (tireoidectomia) e tireoidectomia mais reposição com L- T4 respectivamente.
Fonte: Sousa (2017).

3.4 - Preparação do Coração Isolado

Seguida a decapitação, o animal foi submetido à toracotomia e o coração retirado e pesado. Em seguida, a artéria aorta ascendente foi seccionada, canulada e fixada em uma cânula de aço inoxidável (cânula de perfusão) acoplada ao sistema de perfusão – Langendorff, sendo o coração submetido ao modelo de Isquemia/Reperfusão, como previamente descrito (TAVARES et al., 2013). Esse processo de canulação da aorta demorou tempo inferior a 1,5 min.

A solução modificada de Krebs-Henseleit (KH), aqui chamada de perfusato, que contém NaCl (118 mM), KCl (4,7 mM), CaCl2 (1,5 mM), MgSO4 (1,66 mM), NaHCO3 (24,88 mM), KH2PO4 (1,18 mM), dextrose 2g/L e água bi-destilada, pH 7,4, foi utilizada para perfundir o coração durante o experimento. O perfusato foi preparado, filtrado (Swinnex® 47mm, poro da membrana 0,22 µM), e o pH foi ajustado por contínua gaseificação com uma mistura de 95% O2/5% CO2.

O perfusato foi perfundido retrogradamente, de acordo com o Método de Langendorff (SKRZYPIEC-SPRING et al., 2007)(Figuras 11 e 12), através da aorta ascendente, a 37°C, a um fluxo constante (10ml/min) e sem recirculação. Conectado à cânula de perfusão, um transdutor de pressão (PowerLab/8SP, AD Instruments) aferiu a resistência imposta pelas artérias coronárias ao fluxo aplicado. Um balão fino de látex, preenchido com água, foi inserido no ventrículo esquerdo e conectado ao transdutor de pressão (PowerLab/8SP, AD Instruments) para avaliar a função ventricular. O volume do balonete foi ajustado, inicialmente, para uma pressão diastólica final de 8 mmHg (TAVARES et., 2013).Todos os corações foram submetidos ao processo de Isquemia/Reperfusão obedecendo a um protocolo experimental de 30 minutos de estabilização, 20 minutos de isquemia global (fluxo=0) e posterior restauração do fluxo, com 45 minutos de reperfusão, de acordo com trabalho

prévio (TAVARES et al., 2013). Foram avaliados o último minuto do período de estabilização e o último minuto dos 45 minutos de reperfusão.

Ao término do experimento, o coração foi armazenado no freezer -80 para futuras determinações.

O aparato de perfusão do coração permite a avaliação da força de contração (efeito ionotrópico), frequência cardíaca (efeito cronotrópico) e efeitos vasculares coronarianos, sem a influência humoral e nervosa que ocorrem sobre o sistema cardiovascular em um animal intacto. Assim, os parâmetros fisiológicos, além da pressão de perfusão e da temperatura da solução podem ser aferidos durante todo o processo experimental. Isso ocorre uma vez que o sistema de perfusão está conectado a um aquisitor de sinais (PowerLab) onde estes são digitalizados e analisados por um software específico (LabChart 7). O sistema permite ainda a realização dos experimentos fixando um dos parâmetros de perfusão: ou a pressão constante ou o fluxo constante; optamos pela realização dos experimentos com fluxo de perfusão constante. Esta escolha baseou-se no fato de conseguirmos, desta forma, inferir informações relativas ao efeito dos estímulos empregados (diminuição dos hormônios tiroideanos ou diminuição dos hormônios ovarianos) sobre a reatividade vascular das coronárias, o que é de grande interesse para nós.

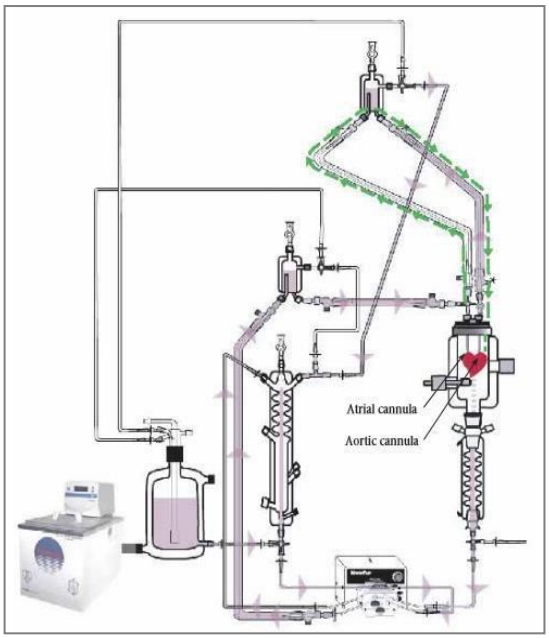

Figura 11. Sistema de perfusão de coração isolado - Langendorff.
Fonte: ADInstruments

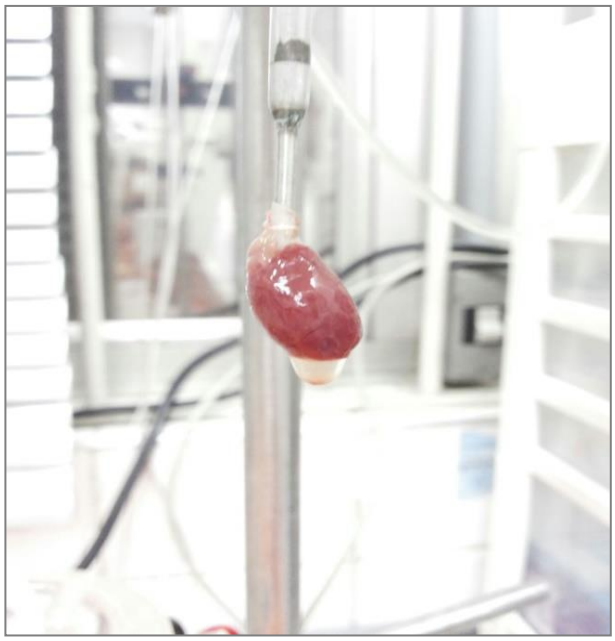

Figura 12: Coração de rato canulado no sistema de perfusão.

3.5 - Aquisição de dados

Durante os experimentos de coração isolado, alguns parâmetros cardíacos foram aferidos: Pressão Desenvolvida pelo Ventrículo Esquerdo (LVDP), que representa a diferença entre a Pressão Sistólica (LVSP) e a Pressão Diastólica Final do Ventrículo Esquerdo (LVEDP); Pressão Diastólica Final (EDP), que é a força ou carga aplicada ao coração no final da diástole; +dP/dt (1ª derivada positiva das pressões) e -dP/dt (1ª derivada negativa das pressões), que são índices que indicam a capacidade de contratilidade e a velocidade de relaxamento do coração, respectivamente; a Frequência cardíaca e a Pressão de Perfusão. Todos estes parâmetros foram monitorados continuamente por um sistema de registro (PowerLab-Lab Chart 7, ADInstruments, EUA). A figura a seguir mostra o exemplo de um registro do coração de um animal controle, no qual estão evidenciados,na ordem, os parâmetros referentes à pressão de perfusão (em mmHg), pressão ventricular (em mmHg) e frequência cardíaca (em batimentos por minuto) (Figura 13).

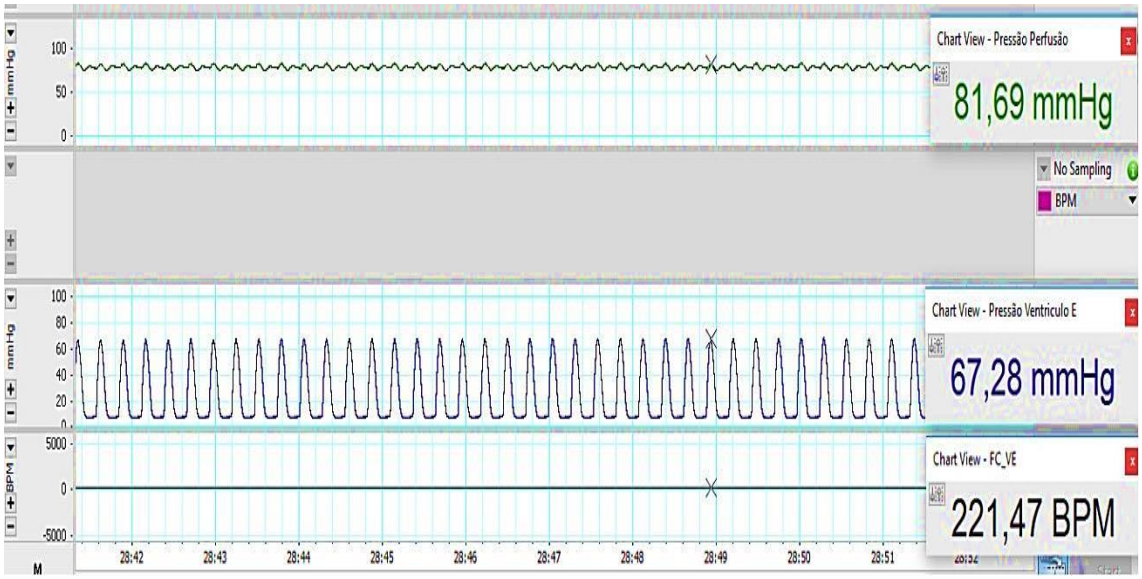

Figura 13.Exemplo de um registro gerado pelo software LabChart 8.0. Avaliação dos parâmetros: pressão de perfusão, pressão ventricular e frequência cardíaca..
Fonte: Sousa (2017).

3.6 - Análise estatística

Os dados obtidos foram descritos em média ± erro padrão. Ovalorde “n” corresponde ao número de animais utilizados. A análise foi feita usando o

software GraphPad (Prism 6). Os resultados foram analisados e comparados utilizando-se a Análise de Variância (ANOVA one way) para comparação dos grupos Controle, Hipo e HTS, ou teste t de Student, para comparação dos grupos controle e Oo. Valores de $p<0,05$, foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

Os resultados apresentados serão divididos em dois capítulos: no primeiro iremos apresentar os dados referentes aos grupos hipotiroideos: experimental e subclínico. No segundo capítulo serão apresentados os dados referentes ao grupo ooforectomizado.

4.1 - Caracterização dos Hipotireoidismos

A confirmação dos modelos experimentais foi avaliada através das dosagens hormonais séricas de T3, T4, TSH totais, de acordo com os dados que se seguem.

4.1.1 *Quantificação dos níveis séricos de T3 total*

A análise das concentrações séricas de T3 mostrou que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais avaliados (Figura 14).

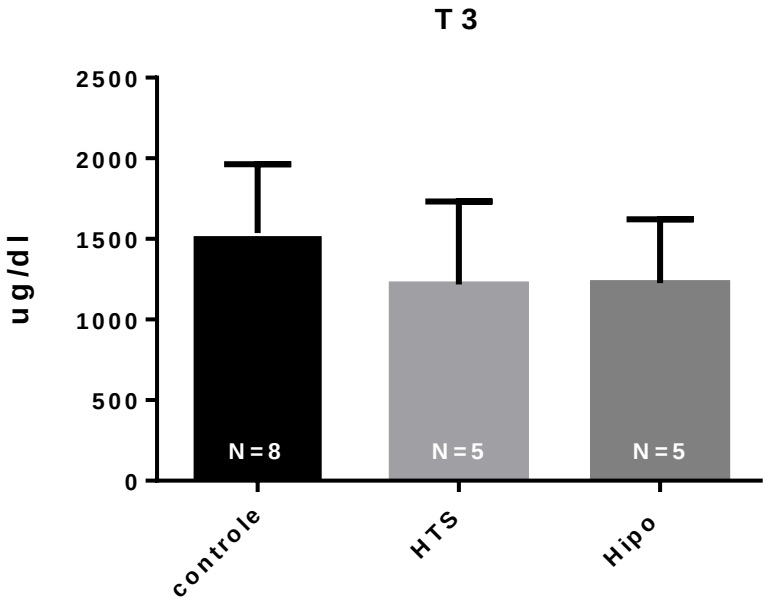

Figura 14. Análise da dosagem do T3 sérico total (em ug/dl). (HTS) Hipotireoidismo subclínico e (Hipo) Hipotireoidismo. Dados apresentados em média ± erro padrão. Teste ANOVA one-way e pós-teste de Tukey($p<0,05$).
Fonte: Sousa (2017).

4.1.2 *Quantificação dos níveis séricos de T4 total*

No que diz respeito à concentração de T4, o hipotireoidismo experimental determinou uma redução significativa nas concentrações séricas totais deste hormônio, em relação aos grupos controle e ao hipotireoidismo subclínico (HTS) (Figura 15).

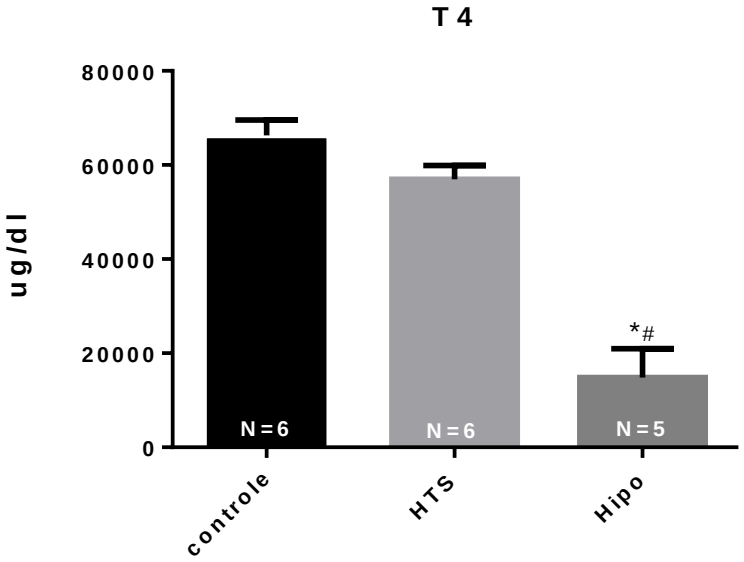

Figura 15. Análise da dosagem do T4 sérico total(em ug/dl). (HTS) Hipotireoidismo subclínico e (Hipo) Hipotireoidismo. Dados apresentados em média ± erro padrão. Teste ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.* vs controle, # vs Hipotireoidismo subclínico. ($p<0,05$).
Fonte: Sousa (2017).

4.1.3 *Quantificação dos níveis séricos de TSH total*

As duas condições de hipotireoidismo, experimental e subclínico, foram capazes de elevar significativamente os níveis de TSH quando comparados àqueles dos animais do grupo controle (Figura 16).

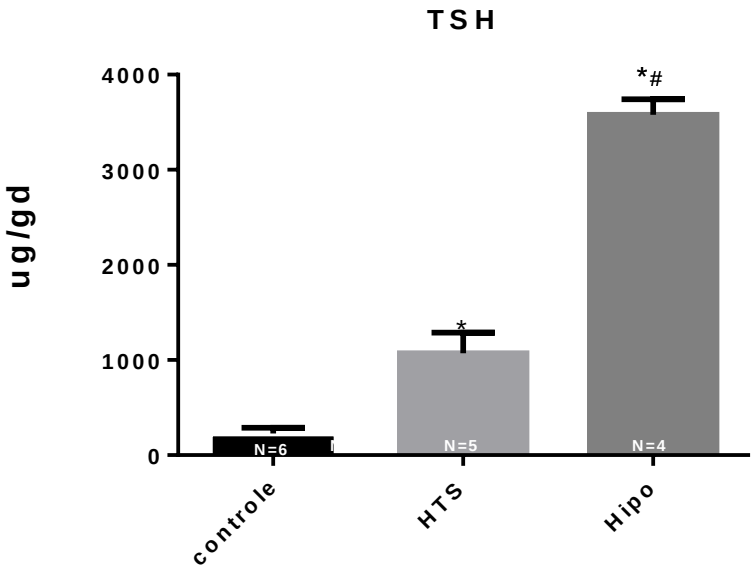

Figura 16. Análise plasmática da dosagem do TSH sérico total (em ug/dl). (HTS) Hipotireoidismo subclínico e (Hipo) Hipotireoidismo (HTS + OO).Dados apresentados em média ± erro padrão. Teste ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.* vs controle, # vs Hipotireoidismo subclínico (p<0,05).
Fonte: Sousa (2017).

4.2 Efeito do Hipotireoidismo subclínico e do Hipotireoidismo sobre o peso corporal

Todos os animais apresentavam pesos similares antes da indução do protocolo experimental. A avaliação das alterações no peso corporal dos animais mostra que, à exceção do grupo HTS, todos tiveram aumento de peso corporal ao longo do tempo do protocolo experimental. No entanto, o ganho de peso do grupo hipo foi menor quando comparado ao grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1. Análise do peso corpóreo inicial e final nos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Delta (g)
Controle (N=8)	206,375 ± 7,0	235 ± 13,9	28,62 ± 12,01
HTS (N=12)	201 ± 3,7	200,875 ± 12,7	-0,125 ± 10,96*
Hipo (N=7)	204,857 ± 28,5	206,285 ± 25,6	1,42 ± 10,39*

Peso corpóreo (em g).(HTS) Hipotireoidismo subclínico e (Hipo) Hipotireoidismo. Dados apresentados em média ± desvio-padrão. Teste ANOVA one-way e pós-teste de Tukey. * vs controle. ($p<0,05$).
Fonte: Sousa (2017).

4.3 Caracterização da ooforectomia

A confirmação do modelo experimental foi avaliada através da dosagem hormonal sérica de estradiol, como apresentado no gráfico a seguir.

4.3.1 Quantificação dos níveis séricos de estradiol total

Conforme pode ser observado, a condição experimental de ooforectomia levou à redução da concentração de estradiol quando comparada à dos animais pertencentes ao grupo controle (figura 17), o que confirma a eficiência da cirurgia realizada.

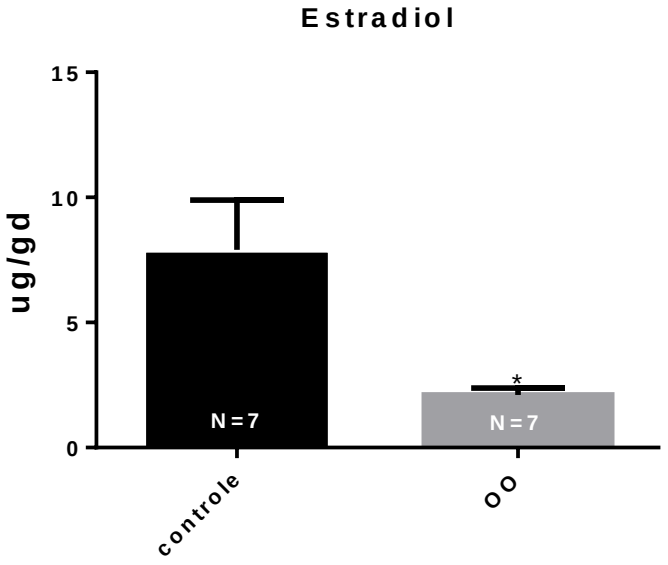

Figura 17. Análiseda concentração de estradiol sérico total (em ug/dl). (OO) Ooforectomizado. Dados apresentados em média ± erro padrão. Teste t de Student. * vs controle (p<0,05).
Fonte: Sousa (2017).

4.4 Efeito da ooforectomia sobre o peso corporal

Antes do início dos tratamentos os animais do grupo OO apresentavam peso corporal similar ao do grupo controle. A análise da evolução do peso corporal dos animais mostra, no entanto, que o ganho de peso corporal foi mais acentuado nos animais do grupo OO em comparação àqueles do controle (Tabela 2).

Tabela 2. Análise do peso corpóreo inicial e final nos dois diferentes grupos experimentais.

Grupos	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Delta (g)
Controle (N=8)	206,375 ± 7,0	235 ± 13,9	28,62 ± 12,01
OO (N=8)	203,375 ± 4,2	288,875 ± 16,3	85,5 ± 18,40*$

Peso corpóreo (em g).(OO) Ooforectomizado e controle. Dados apresentados em média ± desvio-padrão. Teste t de Student. * vs controle. ($p<0,05$).
Fonte: Sousa (2017).

4.5 Diferentes fases do ciclo estral e função cardíaca

Durante as quatro fases do ciclo reprodutivo das ratas é possível observar variações de diferentes tipos de hormônios, inclusive do estradiol. Para nos certificarmos de que a função cardíaca avaliada no modelo de coração isolado não sofreria interferência dessa variação hormonal que ocorre ao longo da fase estral das ratas, um pequeno número de experimentos foi previamente realizado. Para tal, avaliamos a função cardíaca antes e depois da isquemia, em quatro grupos divididos de acordo com a fase do ciclo estral em que as ratas se encontravam. Conforme pode ser observado a seguir, independentemente da fase do ciclo estral, os parâmetros de função cardíaca não se alteram significativamente no modelo de coração isolado, tanto antes como depois de um quadro de isquemia com reperfusão por 35 min (figuras 18, 19).

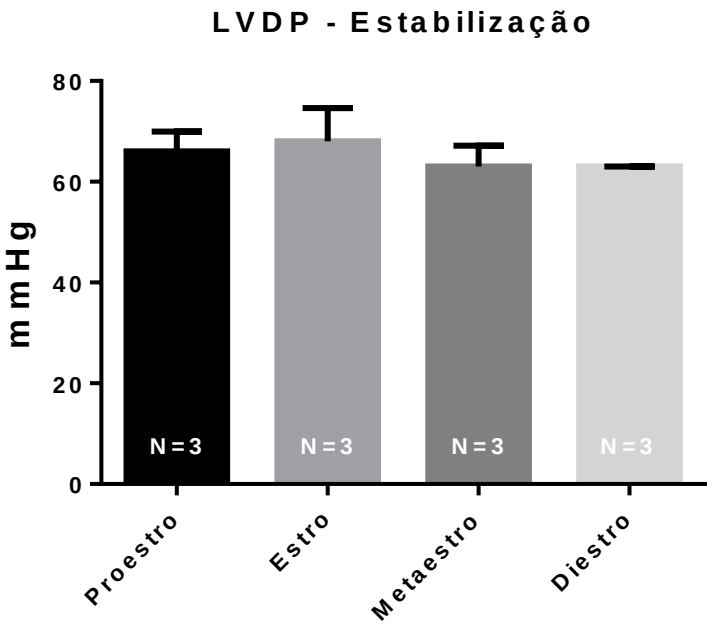

Figura 18. Análise da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP), em milímetros de mercúrio (mmHg), no período de estabilização nas diferentes fases do ciclo estral. Dados apresentados em média ± erro-padrão. Teste ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.Fonte: Sousa (2017).

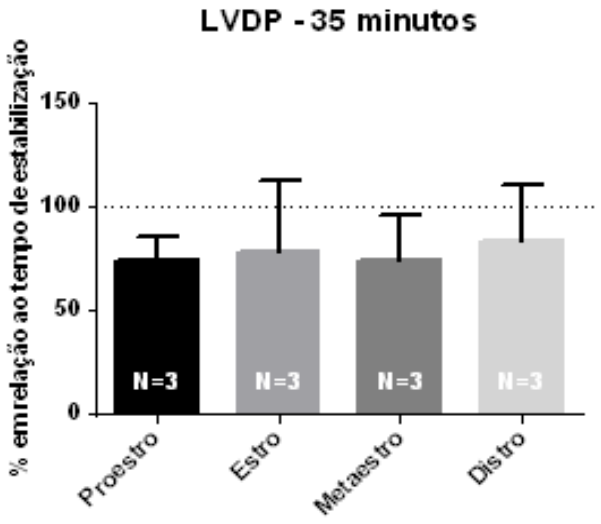

Figura 19. Análise da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP), exibido como % em comparação ao controle (período de estabilização), aos 35 minutos de reperfusão. O 100% refere-se ao tempo de estabilização. Dados apresentados em média ± erro-padrão da porcentagem de mudanças dos parâmetros comparados nos diferentes tempos. Teste ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.
Fonte: Sousa (2017).

4.6 Efeito do Hipotireoidismo subclínico e do Hipotireoidismo experimental, sobre parâmetros da função cardíaca em corações isolados de ratas submetidas à situação de isquemia e reperfusão por 35 min

4.6.1 Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP)

Em todos os tempos avaliados, bem como durante o período de estabilização, não foram encontradas alterações significativas na LVDP entre os diferentes grupos experimentais no presente estudo. Apresentaremos nesse estudo os dados referentes aos parâmetros cardíacos após 35 minutos de reperfusão pós-isquemia (Figuras 20 e 21).

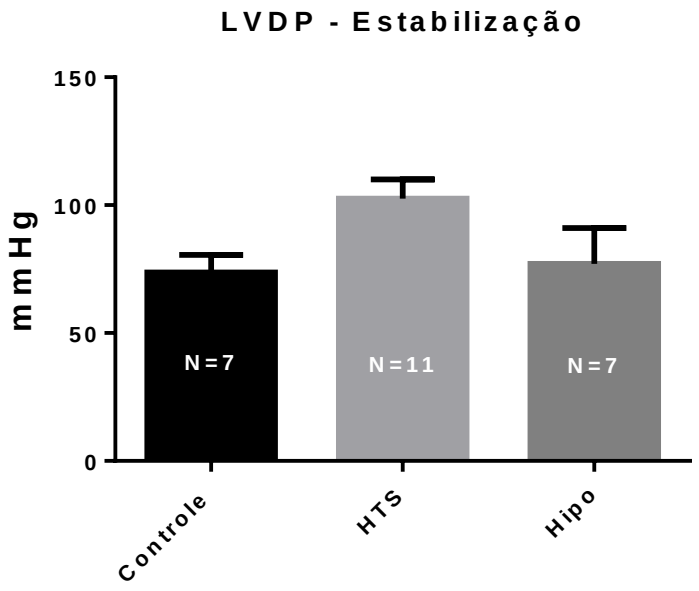

Figura 20. Análise da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP), em milímetros de mercúrio (mmHg), no período de estabilização. (HTS) Hipotireoidismo subclínico e (Hipo) Hipotireoidismo. Dados apresentados em média ± erro-padrão. Teste ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.
Fonte: Sousa (2017).

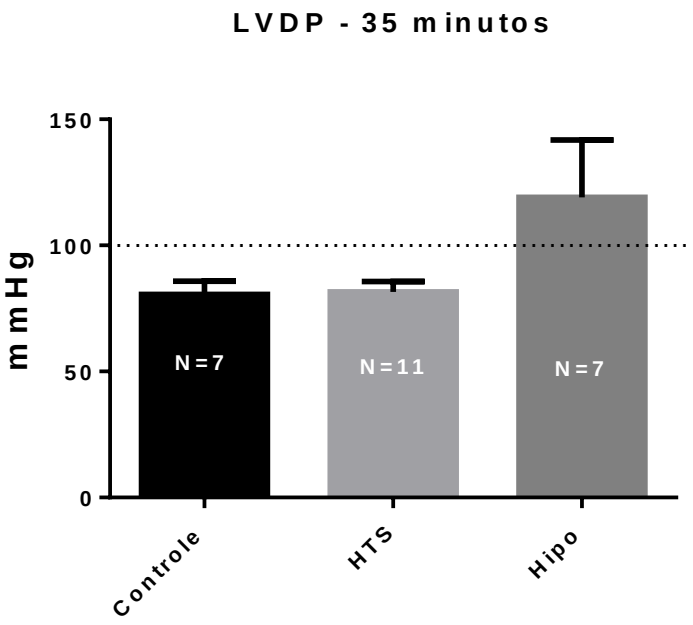

Figura 21. Análise da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP), exibido como % em comparação ao controle (período de estabilização), aos 35 minutos de reperfusão. (HTS) Hipotireoidismo subclínico e (Hipo) Hipotireoidismo. O 100% refere-se ao tempo de estabilização. Dados apresentados em média ± erro-padrão da porcentagem de mudanças dos parâmetros comparados nos diferentes tempos. Teste ANOVA one-way e pós-teste de Tukey. Fonte: Sousa (2017).

4.6.2 *Pressão diastólica final (EDP)*

No período de estabilização não houve diferença entre os grupos experimentais (Figura 22). Já após 35 min de reperfusão, os animais submetidos do grupo Hipo exibiram uma EDP significativamente menor em relação ao grupo controle (86,5 ± 21,9 vs. 335,0 ± 136,3, respectivamente) (Figura 23).

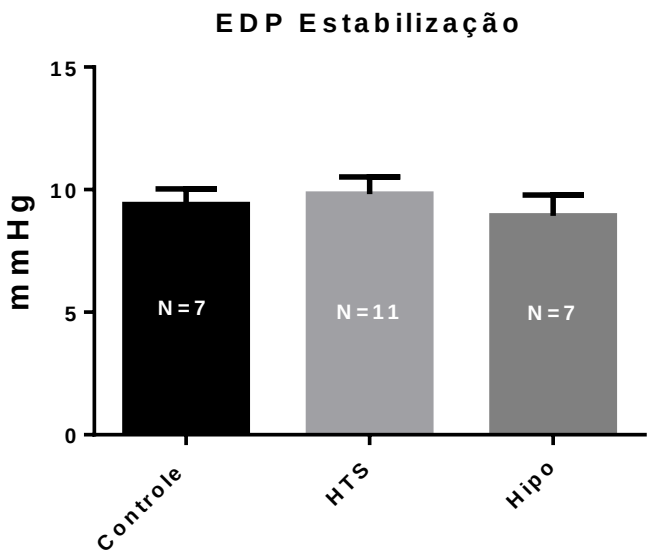

Figura 22. Análise da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (EDP) em mmHg, no período de estabilização. (HTS) Hipotireoidismo subclínico e (Hipo) Hipotireoidismo. Dados apresentados em média ± erro-padrão. Teste ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.
Fonte: Sousa (2017).

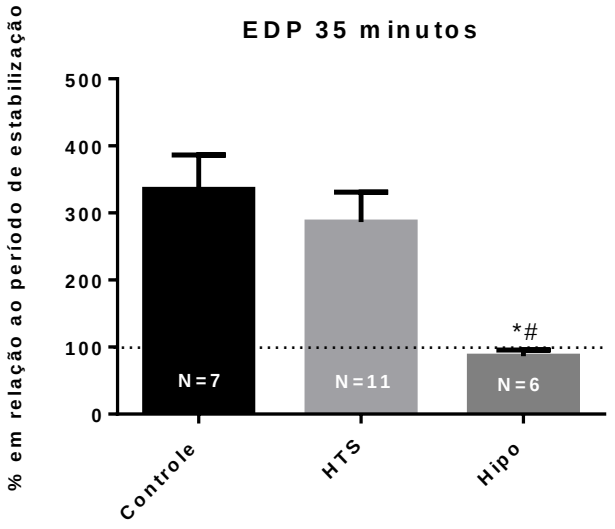

Figura 23. Análise da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (EDP), exibidocomo % em comparação ao respectivo período de estabilização, após35 min. de reperfusão. (HTS) Hipotireoidismo subclínico e (Hipo) hipotireoidismo. O 100% refere-se ao tempo de estabilização. Dados apresentados em média ± erro-padrão. Teste ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.* vs controle, # vs Hipotireoidismo subclínico ($p<0,05$).
Fonte: Sousa (2017).

4.6.3 *Primeira derivada positiva das pressões (+dP/dt)*

A +dP/dt foi significativamente reduzida no grupo Hipo em relação ao grupo controle e ao grupo HTS no período de estabilização (1073,8 ± 358,1 mmHg no Hipo vs. 2312,5±549,9 mmHg no controle e vs. 2790,9 ± 719,0 mmHg no HTS) (Figura 24). Após isquemia e reperfusão por 35 min o grupo Hipo aumentou significativamente a +dP/dt em relação ao controle (Figura 25).

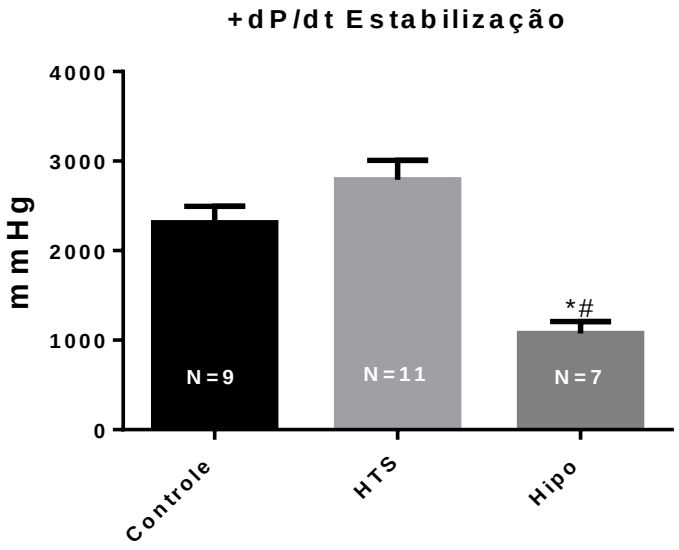

Figura 24. Análise da primeira derivada positiva das pressões (+dP/dt) em mmHg no período de estabilização. (HTS) Hipotireoidismo subclínico e (Hipo) Hipotireoidismo. Dados apresentados em média ± erro-padrão. Teste ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.* vs controle, # Hipotireoidismo subclínico ($p<0,05$).

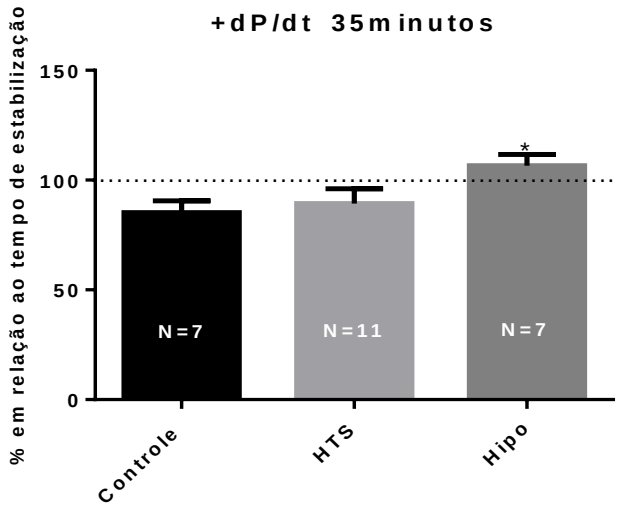

Figura 25. Análise da primeira derivada positiva de pressão por tempo (+dP/dt), exibida % em comparação ao controle (período de estabilização), aos 35 minutos de reperfusão. (HTS) Hipotireoidismo subclínico e (Hipo) Hipotireoidismo. O 100% refere-se ao tempo de estabilização. Dados apresentados em média ± erro-padrão. Teste ANOVA one-way e pós-teste de Fisher's.* vs controle , # Hipotireoidismo subclínico (p<0,05).
Fonte: Sousa (2017)

4.6.4 *Primeira Derivada Negativa das Pressões (-dP/dt)*

No período de estabilização os animais do grupo hipotireoidismo apresentaram uma redução significativa da -dP/dt em relação aos grupos controle e HTS(-610,5 ± 223,3 Hipo vs. -1244,2 ± 211,6 controle e vs. -1504,6 ± 341,3 HTS)(Figura 26). Durante a reperfusão foi possível notar um aumento da recuperação no que se refere à -dP/dt no grupo Hipo, em comparação aos grupos controle e HTS (99,5 ± 17,0 Hipo vs. 73,4 ± 13,1 controle e vs. 77,7 ± 16,8HTS) (Figura 27).

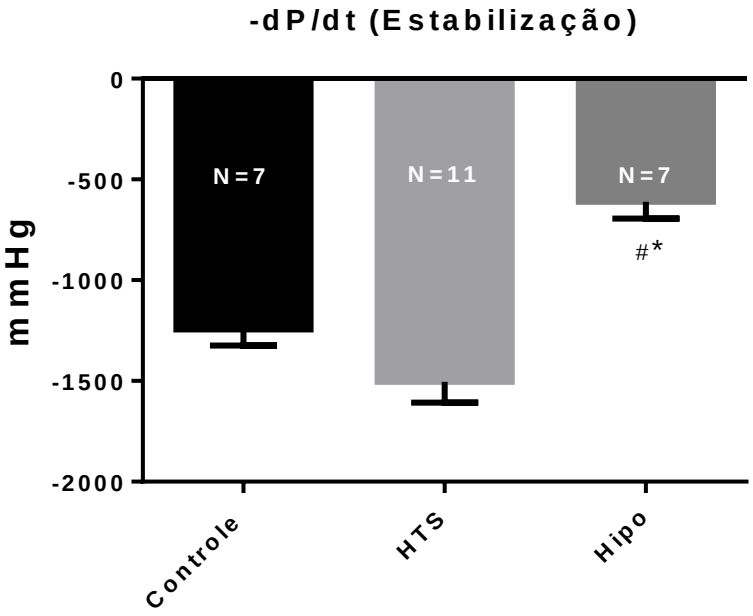

Figura 26. Análise da primeira derivada negativa de pressão por tempo (-dP/dt) em mmHg, no período de estabilização. (HTS) Hipotireoidismo subclínico e (Hipo) Hipotireoidismo. Dados apresentados em média ± erro-padrão. Teste ANOVA one-way e pós-teste de Tukey. * vs controle, # vs Hipotireoidismo subclínico. (p<0,05).
Fonte: Sousa (2017).

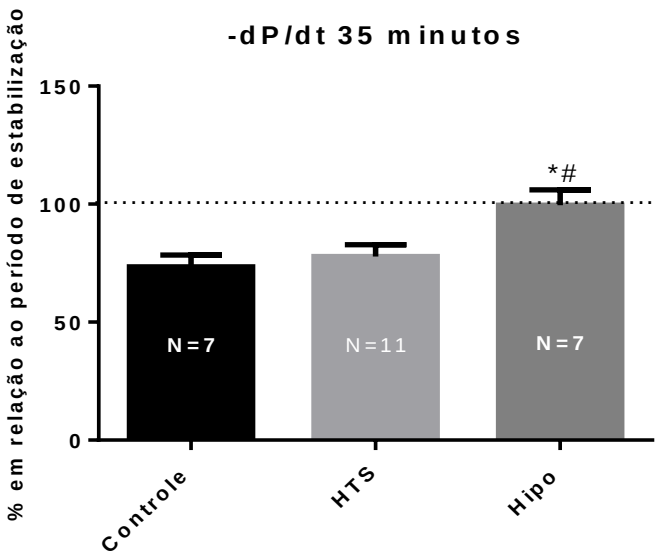

Figura 27. Análise da primeira derivada negativa de pressão por tempo (-dP/dt), exibido como % em comparação ao controle (período de estabilização), aos 35 minutos de reperfusão. (HTS) Hipotireoidismo subclínico e (Hipo) Hipotireoidismo. O 100% refere-se ao tempo de estabilização. Dados apresentados em média ± erro-padrão. Teste ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.* vs controle, # vs Hipotireoidismo subclínico (P<0,05).
Fonte: Sousa (2017).

4.6.5 *Frequência Cardíaca*

Durante a estabilização os corações dos animais do grupo induzido ao hipotireoidismo apresentaram frequência cardíaca significativamente inferior àquela dos corações dos grupos controle e HTS (150,1± 15,0 Hipo vs.244,6 ± 21,2 controle e vs. 236,6 ± 35,7 HTS)(Figura 28). Porém, essa diferença não foi observada após 35 min de isquemia (Figura 29)

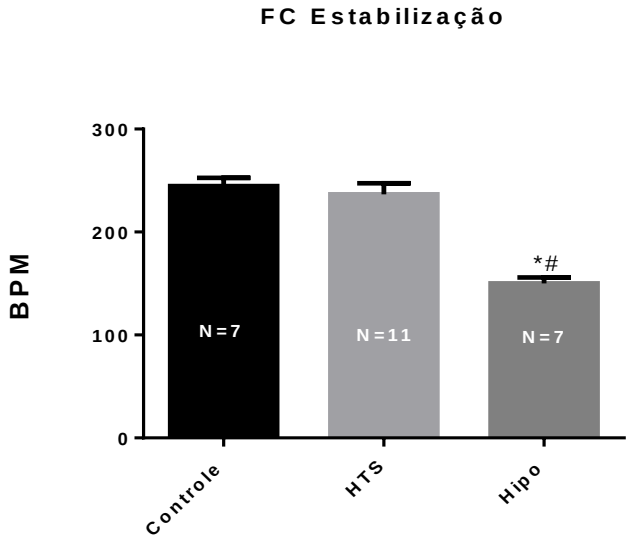

Figura 28. Análise da frequência cardíaca em batimentos por minuto BPM, no período de estabilização. (HTS) Hipotireoidismo subclínico e (Hipo) Hipotireoidismo. Dados apresentados em média ± erro-padrão. Teste ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.* vs controle, # vs Hipotireoidismo subclínico ($p<0,05$).
Fonte: Sousa (2017

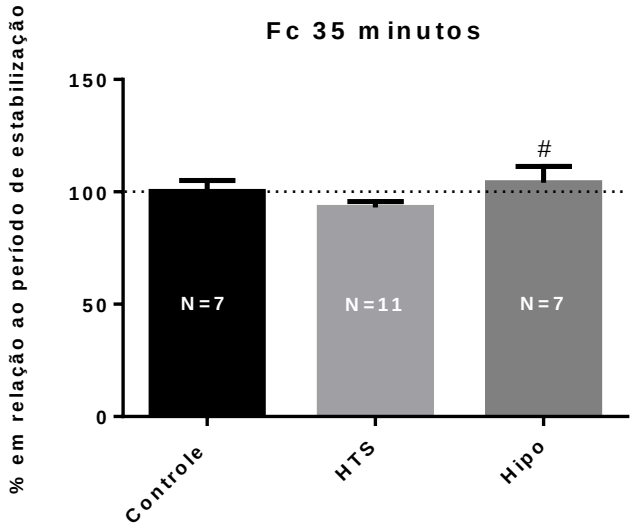

Figura 29. Análise da frequência cardíaca, em batimentos por minuto (BPM), após35 min. de reperfusão, exibida como % em comparação ao respectivo período de estabilização.(HTS) Hipotireoidismo subclínico e (Hipo) Hipotireoidismo. O 100% refere-se ao tempo de estabilização. Dados apresentados em média ± erro-padrão. Teste ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.
Fonte: Sousa (2017).

4.6.6 *Pressão de perfusão*

A pressão de perfusão foi semelhante entre os grupos, tanto na estabilização (Figura 30) como após 35 min de reperfusão (Figura 31).

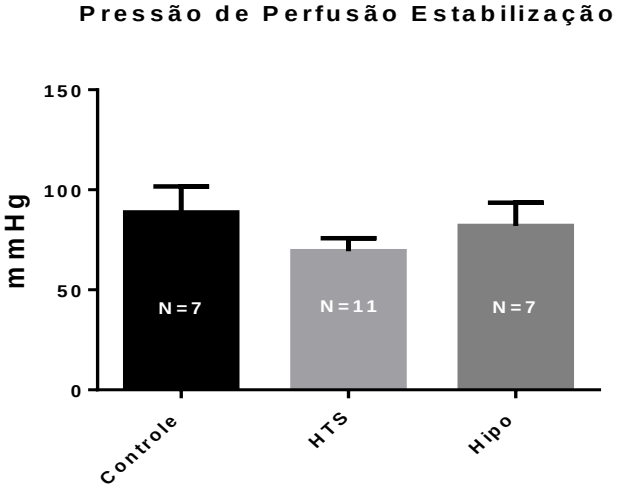

Figura 30. Análise da pressão de perfusão no período estabilização em mmHg. (HTS) Hipotireoidismo subclínico e (Hipo) Hipotireoidismo. Dados apresentados em média ± erro-padrão. Teste ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.
Fonte: Sousa (2017).

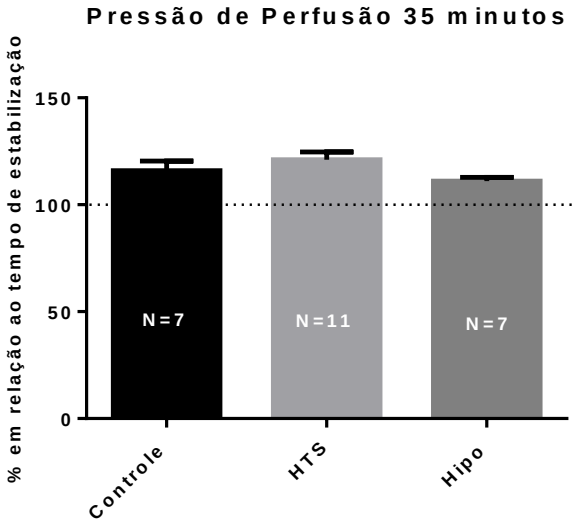

Figura 31. Análise da pressão de perfusão em (mmHg), exibida como % em comparação ao respectivo período de estabilização, após 35 min de reperfusão.(HTS) Hipotireoidismo subclínico e (Hipo) Hipotireoidismo. O 100% refere-se ao tempo de estabilização. Dados apresentados em média ± erro-padrão. Teste ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.
Fonte: Sousa (2017).

4.7 Efeito da ooforectomia, sobre parâmetros da função cardíaca em corações isolados de ratas submetidas à situação de isquemia e reperfusão.

Após avaliarmos todos os parâmetros da função cardíaca, LVDP, EDP, +dP/dt, -dP/dt, Frequência cardíaca e Pressão de perfusão, observamos não haver diferença estatística entre o grupo de animais ooforectomizados e o controle tanto no período de estabilização como no período de reperfusão conforme pode se percebido nos gráficos a seguir.

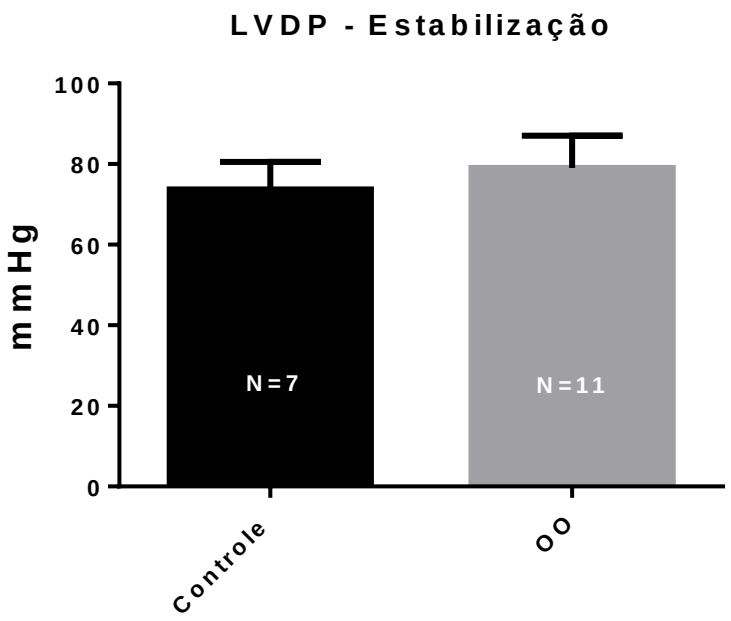

Figura 32. Análise da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP), em milímetros de mercúrio (mmHg), no período de estabilização. (Oo) Ooforectomia. Dados apresentados em média ± erro-padrão. Teste t de Student. ($p<0,05$).
Fonte: Sousa (2017).

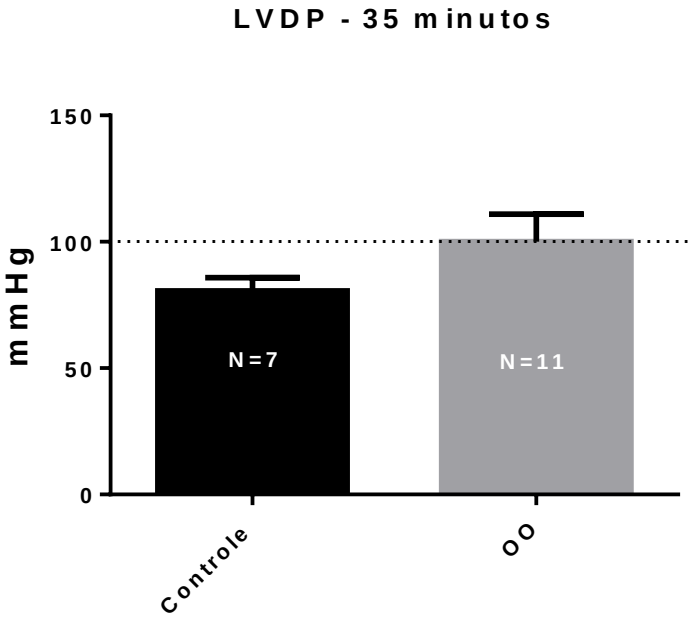

Figura 33. Análise da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP), exibido como % em comparação ao controle (período de estabilização), aos 35 minutos de reperfusão. (Oo) Ooforectomia. O 100% refere-se ao tempo de estabilização. Dados apresentados em média ± erro-padrão da porcentagem de mudanças dos parâmetros comparados nos diferentes tempos. Teste t de Student. ($p<0,05$).
Fonte: Sousa (2017).

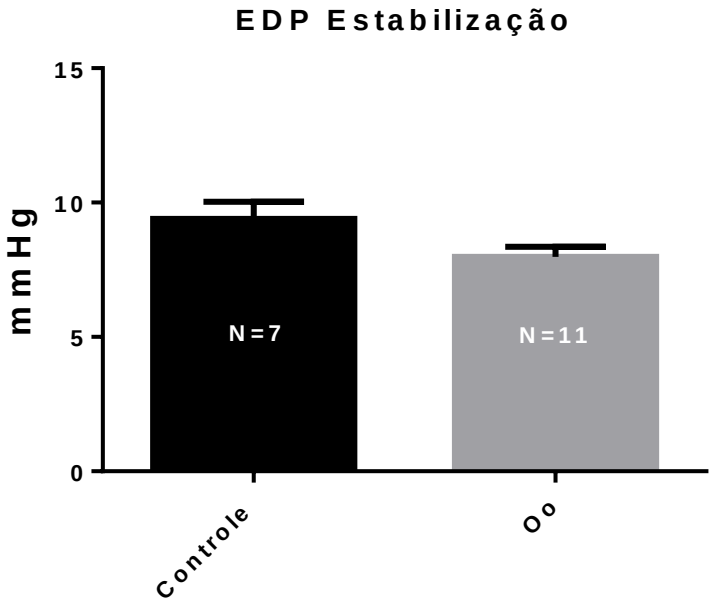

Figura 34. Análise da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (EDP) em mmHg, no período de estabilização. (Oo) Ooforectomia. Dados apresentados em média ± erro-padrão. Teste t de Student. (p<0,05).
Fonte: Sousa (2017).

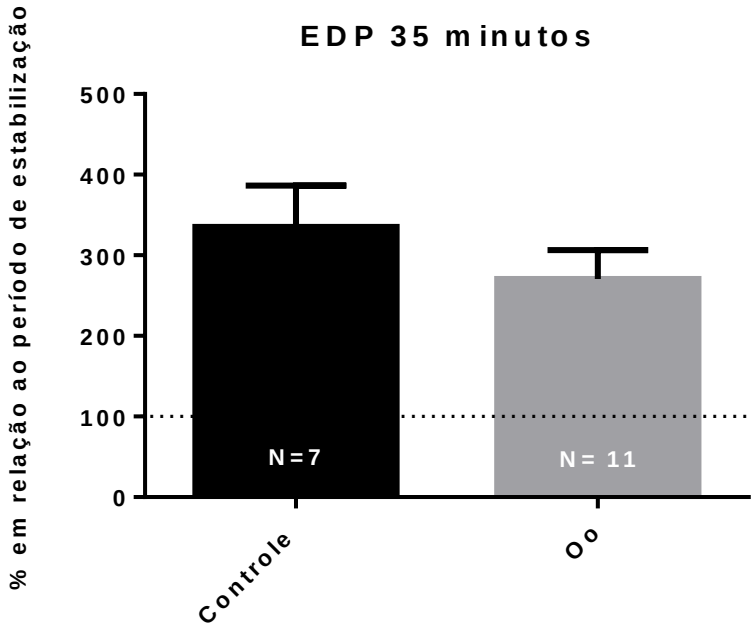

Figura 35. Análise da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (EDP), exibido como % em comparação ao controle (período de estabilização), aos 35 minutos de reperfusão. (Oo) Ooforectomia. O 100% refere-se ao tempo de estabilização. Dados apresentados em média ± erro-padrão. Teste t de Student. (p<0,05).
Fonte: Sousa (2017)

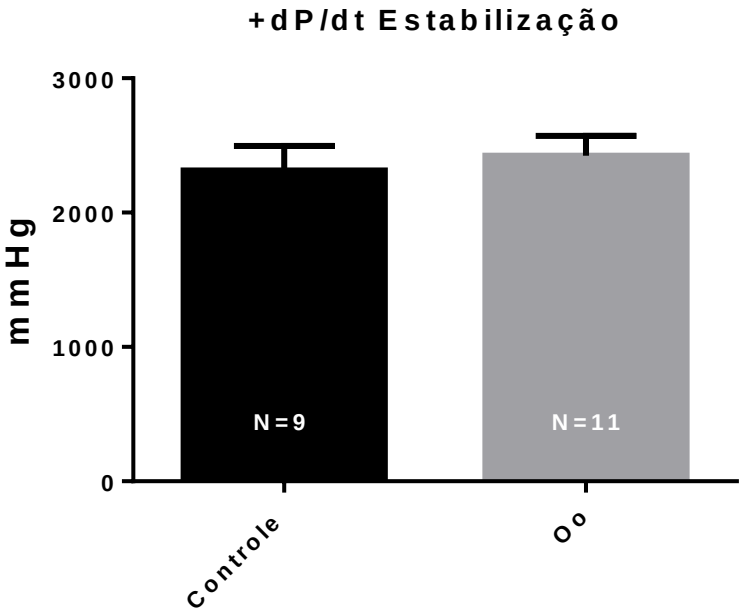

Figura 36. Análise da primeira derivada positiva das pressões (+dP/dt) em mmHg no período de estabilização. (Oo) Ooforectomia. Dados apresentados em média ± erro-padrão. Teste t de Student. (p<0,05).
Fonte: Sousa (2017)

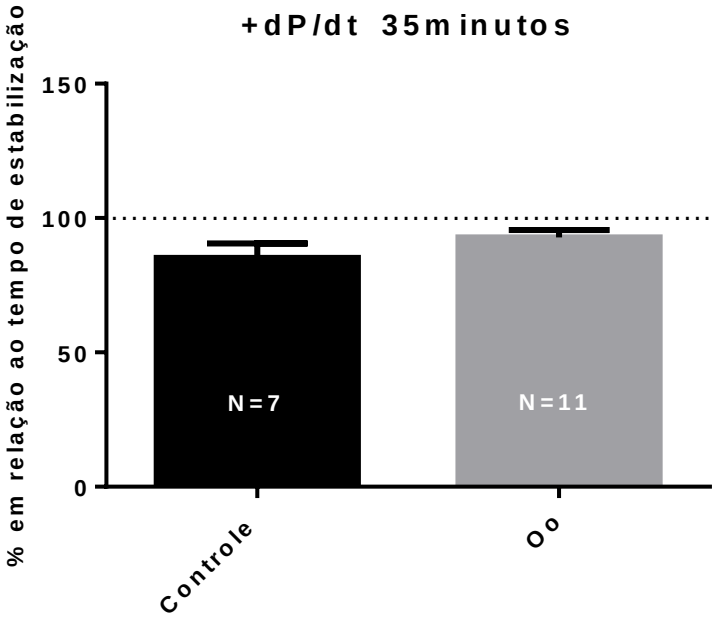

Figura 37. Análise da primeira derivada positiva de pressão por tempo (+dP/dt), exibida % em comparação ao controle (período de estabilização), aos 35 minutos de reperfusão. (Oo) Ooforectomia. O 100% refere-se ao tempo de estabilização. Dados apresentados em média ± erro-padrão. Teste t de Student. (p<0,05).
Fonte: Sousa (2017).

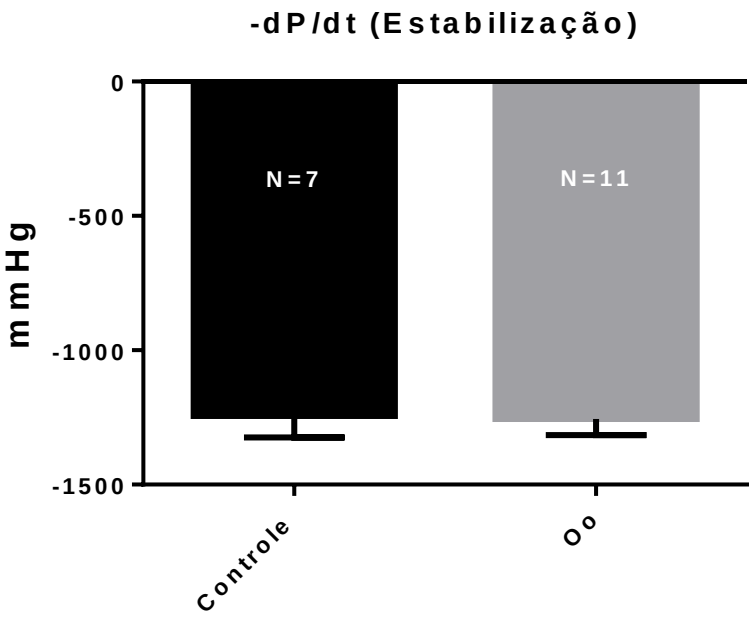

Figura 38. Análise da primeira derivada negativa de pressão por tempo (-dP/dt) em mmHg, no período de estabilização. (Oo) Ooforectomia. Dados apresentados em média ± erro-padrão. Teste t de Student. (p<0,05).
Fonte: Sousa (2017).

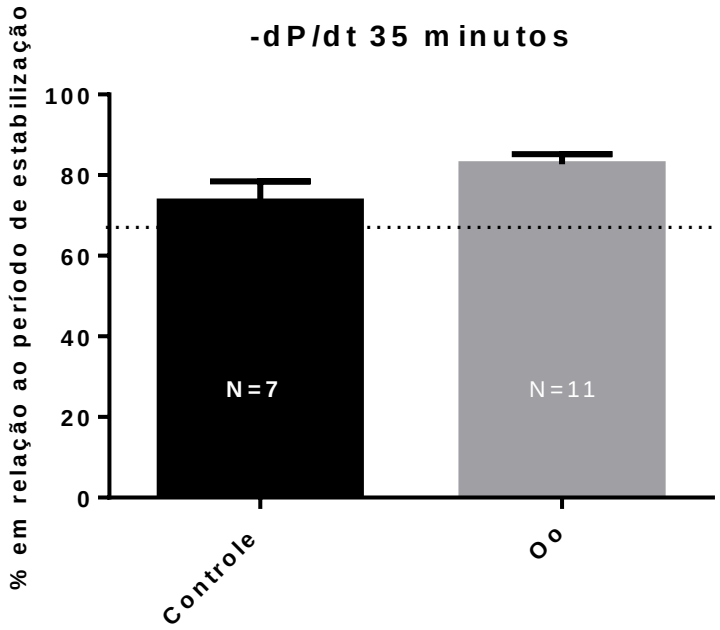

Figura 39. Análise da primeira derivada negativa de pressão por tempo (-dP/dt), exibido como % em comparação ao controle (período de estabilização), aos 35 minutos de reperfusão. (Oo) Ooforectomia. O 100% refere-se ao tempo de estabilização. Dados apresentados em média ± erro-padrão. Teste t de Student. (p<0,05).
Fonte: Sousa (2017).

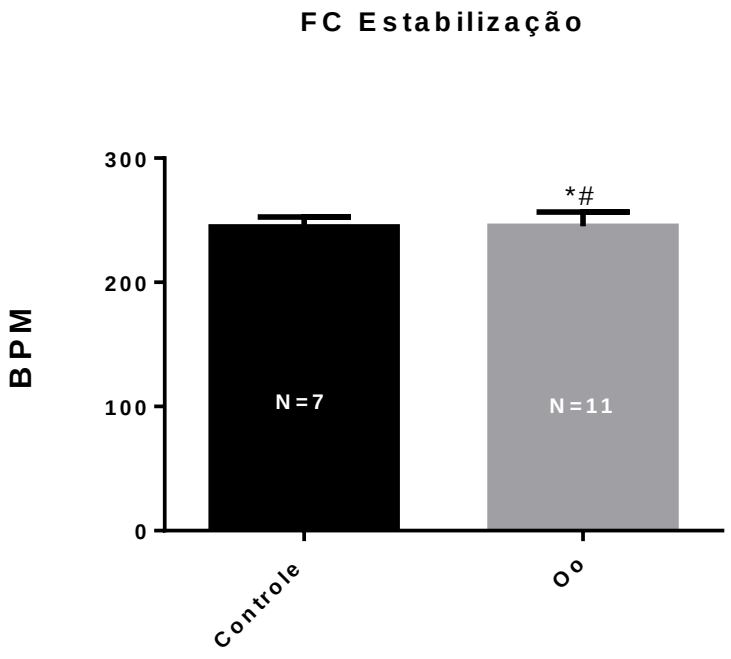

Figura 40. Análise da frequência cardíaca em batimentos por minuto BPM, no período de estabilização. (Oo) Ooforectomia. Dados apresentados em média ± erro-padrão. Teste t de Student. (p<0,05).
Fonte: Sousa (2017).

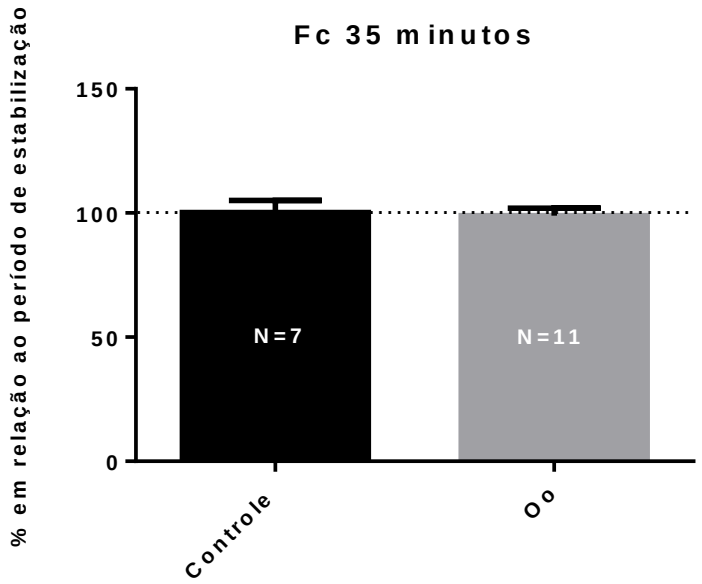

Figura 41. Análise da frequência cardíaca apresentada em batimentos por minuto (BPM), exibido como % em comparação ao controle (período de estabilização), aos 35 minutos de reperfusão. (HTS) Hipotireoidismo subclínico e (Hipo) Hipotireoidismo. O 100% refere-se ao tempo de estabilização. Dados apresentados em média ± erro-padrão. Teste ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.
Fonte: Sousa (2017

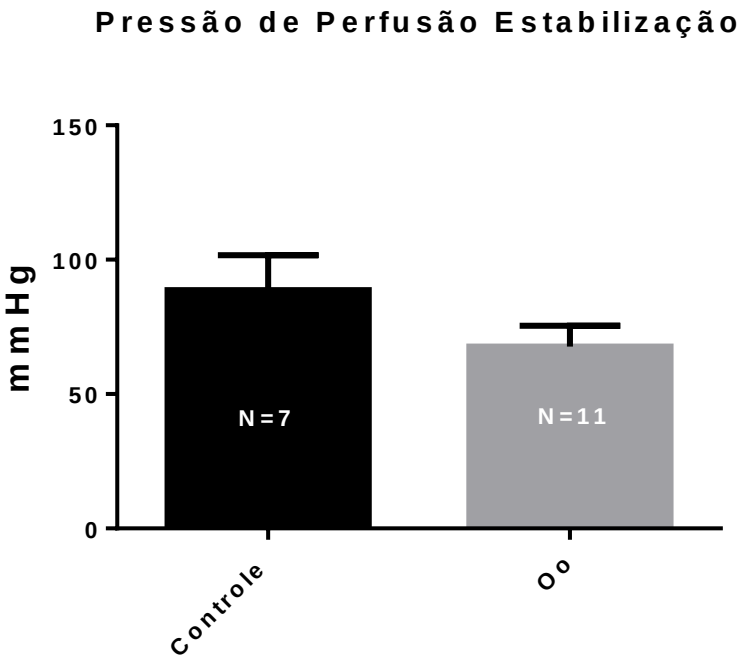

Figura 42. Análise da pressão de perfusão no período estabilização em mmHg. (Oo) Ooforectomia. Dados apresentados em média ± erro-padrão. Teste t de Student. (p<0,05).
Fonte: Sousa (2017).

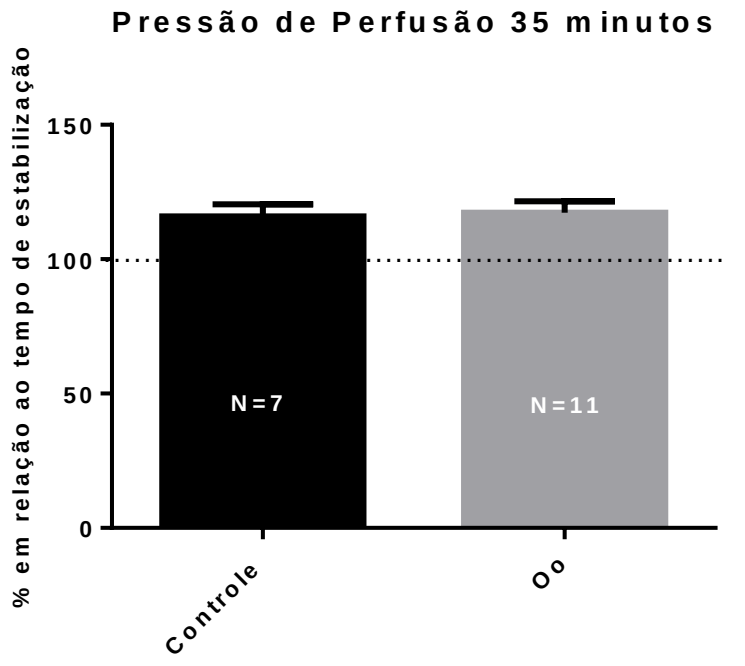

Figura 43. Análise da pressão de perfusão em (mmHg), exibido como % em comparação ao controle (período de estabilização), no tempo de reperfusão de 35 minutos. (Oo) Ooforectomia. O 100% refere-se ao tempo de estabilização. Teste t de Student. (p<0,05).
Fonte: Sousa (2017).

5. Discussão

Ultimamente, a comunidade científica vem relacionando a diminuição dos níveis dos hormônios tireoidianos e ovarianos com o aumento de doenças cardíacas. Essas correlações são baseadas no fato de que na pós-menopausa, período em que há diminuição brusca da atividade ovariana e gradativa da atividade tireoidiana, aumenta o risco de doenças cardíacas (HAK et al., 2000; IRIGOYEN et al., 2005; KONG et al., 2015; LONDOÑFO et al., 2011; MAZER, 2004b).

Neste sentido, nós investigamos o efeito do hipotireoidismo, do hipotireoidismo subclínico, da diminuição dos níveis de hormônios ovarianos, induzido por ooforectomia, e do hipotireoidismo subclínico juntamente com a diminuição dos níveis de hormônios ovarianos, no que diz respeito à função cardíaca após um evento de I/R. Nossos resultados mostram que após I/R, a ausência de hormônios ovarianos, a presença do hipotireoidismo subclínico ou mesmo as duas condições estabelecidas no mesmo animal, não foram suficientes para alterar a recuperação cardíaca após um evento isquêmico. Já a condição de hipotireoidismo foi capaz de prevenir a contratura isquêmica, o inotropismo negativo e o lusinotropismo negativo após o quadro de I/R. No entanto, vale ressaltar que esses parâmetros, com exceção da EDP, encontravam-se diminuídos no período de estabilização, por isso não podemos considerar que hipotireoidismo seja uma condição cardioprotetora.

5.1 Confirmação e caracterização do modelo experimental de (1) hipotireoidismo, (2) hipotireoidismo subclínico, (3) diminuição dos níveis de hormônios ovarianos e (4) hipotireoidismo subclínico e diminuição dos níveis de hormônios ovarianos.

Nesta parte do trabalho foram avaliados alguns parâmetros como os níveis hormonais de T3, T4, TSH e estradiol, o peso corpóreo, do coração, do útero nos diferentes grupos com o objetivo de confirmar as condições experimentais nestes animais.

Carneiro Ramos e colaboradores (2007) descreveram que ratos hipotireoideos apresentam níveis de hormônios tireoidianos séricos diminuídos

após 14 dias de tireoidectomia em comparação aos animais controle, além de diminuição do peso corpóreo e da massa cardíaca, corroborando com os nossos achados.

Os hormônios tireoidianos são determinantes no controle das taxas metabólicas basais em animais homeotérmicos. No entanto, ratos hipotireoideos parecem não ter esta capacidade prejudicada (CURCIO et al., 1999). Curcio e coautores demostraram que o hipotireoidismo diminuiu o volume de adipócitos em 50%, e mesmo quando alimentados com dieta hipercalórica tinham 30% menos gordura corporal do que os controles. Também foi mostrado, nesse mesmo trabalho, que o hipotireoidismo reduz a absorção de nutrientes e, portanto, a ingestão de energia não é traduzida em energia absorvida / metabolizada. Além disso, a atividade simpática pode estar envolvida nesse evento, já que ratos que não podem sintetizar catecolaminas como noradrenalina ou adrenalina, não são obesos (THOMAS; PALMITER, 1997). Mano e colaboradores (1998) demonstraram que o hipotireoidismo induzido em animais, foi capaz de diminuir as concentrações de catecolaminas em diferentes tipos de tecidos.

Além de diminuir o peso corpóreo, hipotireoidismo tem sido associado a uma diminuição da massa cardíaca, devido à redução da expressão de genes e proteínas citoplasmáticas (KLEIN, 1988; BUPHA-INTR et al., 2006). Carneiro-Ramos e colaboradores mostraram que o hipotireoidismo por 14 dias em ratos, promoveu diminuição dos níveis de expressão gênica do fator natriurético atrial (ANF), um marcador de hipertrofia cardíaca, seguido por atrofia nos ventrículos direito e esquerdo.

O hipotireoidismo subclínico, diferente do hipotireoidismo, é caracterizado por elevação dos níveis de TSH frente aos níveis normais de T3 e T4. Neste estudo, o estado de hipotireoidismo subclínico foi comprovado 15 dias após a indução, ao detectar altas concentrações de TSH e níveis normais de T3 e T4 no soro dos animais pertencentes a esse grupo. Yang e colaboradores (2014), utilizando protocolo semelhante, observaram aumento nos níveis de TSH e níveis normais de hormônios tireoidianos após 8 semanas. Resultados parecidos foram obtidos por Liu et al (2010), que avaliou a prole de ratas com hipotireoidismo subclínico.

Tanto em ratas como em mulheres, a queda nos níveis de hormônios ovarianos, tem como efeitos secundários, a diminuição da massa uterina e o aumento da massa corpórea. Neste trabalho, observamos que o declínio nos níveis de hormônios ovarianos, por ooforectomia, levou à diminuição da massa uterina e aumento do peso corpóreo, corroborando com achados da literatura (DANTAS et al., 2004; BERGER; EL-ALFY; LABRIE, 2008).

Os estrogênios participam da proliferação celular do tecido vaginal e uterino. Ratas ooforectomizadas podem apresentar diminuição da espessura do epitelial vaginal e na quantidade de camadas de células epiteliais uterinas (SUZUKI et al., 1996). A ooforectomia também pode levar ao aumento de expressão de algumas proteinases, como metaloproteinases e serinoproteinases, no útero. No entanto, este aumento pode ser inibido pelo estrogênio, o que sugere a participação dessas proteinases na regressão uterina após a ooforectomia (SUZUKI et al., 1996b).

Segundo Hamilton et al (2016), tanto o envelhecimento quanto a diminuição nos níveis de estrógeno por deficiência ovariana, estão associados ao aumento da susceptibilidade à obesidade, dislipidemia, resistência à insulina e redução do metabolismo. Neste trabalho, Hamilton e colaboradores observaram, após 11 semanas, que a ooforectomia promoveu resistência à insulina, diminuição da atividade metabólica e aumento da massa corpórea. Em outro estudo, camundongos ooforectomizadas foram submetidos à dieta hiperlipídica. O estrógeno diminuiu significativamente a obesidade e a intolerância à glicose ao controlar a expressão de genes adipogênicos (STUBBINS et al., 2012). Durante o período de diestro, momento em que há baixa concentração de estrógenos circulantes, as ratas exibem maior consumo alimentar, que é reduzido durante as fases de proestro e estro (ECKEL et al., 2000). Mieli e colaboradores (2004), evidenciaram que animais ooforectomizados, por médios e longos períodos, aumentam a ingesta de alimentos e a massa gorda. Neste mesmo trabalho, observou-se uma correlação positiva entre a massa total de gordura e os níveis plasmáticos de leptina.

5.2 Efeito do hipotireoidismo sobre parâmetros cardíacos após um evento de isquemia e reperfusão

A disfunção cardíaca associada ao hipotireoidismo está relacionada com a diminuição da função sistólica, diastólica e frequência cardíaca. Esta disfunção se dá, pelo menos em parte, por perturbações da homeostase de cálcio, como resultado da diminuição da expressão de proteínas de ciclagem deste íon e por mudanças que ocorrem na expressão da isoforma de miosina de cadeia pesada (MHC) (BERS, 2002; MOUROUZIS et al., 2009; VAN DER VELDEN, 2011; DONG et al., 2016).

O hipotireoidismo é tão marcante na função cardíaca que a deficiência de hormônios tireoidianos na vida fetal pode atenuar as funções cardíacas normais, incluindo frequência cardíaca ± dp/dt durante a idade adulta, o que está relacionado com o aumento da expressão de β-MHC e diminuição da expressão de α-MHC (MOUROUZIS et al., 2009; YOUSEFZADEH; JEDDI; ALIPOUR, 2016). As alterações nas proporções dessas proteínas estão diretamente relacionadas ao nível de desempenho mecânico do coração. A Beta-MHC apresenta menor atividade da adenosina trifosfatase, seguido por menor velocidade de deslizamento do filamento, no entanto, pode gerar força de ponte cruzada com uma maior economia de uso de energia quando comparaà alfa-MHC (HARRIS et al., 1994; SUGIURA et al., 1998).

Essa isoforma é vista como sendo energeticamente favorável, em condições desafiadoras para o miocárdio, no entanto, isso pode ser compensado pela função cardíaca deprimida (KRENZ; ROBBINS, 2004). Provavelmente este evento acontece como resposta adaptativa no intuito de preservar a energia (KRENZ; ROBBINS, 2004).

No presente trabalho, foi visto que os corações hipotireoideos apresentaram atividades cronotrópica (FC), lusinotrópica (-dP/dt) e inotrópica (+dP/dt) reduzidas desde o período de estabilização. No entanto esse perfil não sofreu alteração após um e evento de isquemia e reperfusão. Portanto, os corações hipotireoideos podem suportar melhor a lesão por isquemia e reperfusão do que corações normais. O que sugere que os corações dos ratos hipotireoideos possuem diminuição no metabolismo cardíaco, corroborando com relatos da literatura (ZHANG et al., 2002; PANTOS et al., 2003; MOUROUZIS et al., 2009; JEDDI; ZAMAN; GHASEMI, 2015).

Esses resultados apoiam a opinião de que, nem sempre, o miocárdio doente pode ser vulnerável a lesão por I/R, principalmente no que concerne à

sua funcionalidade (FRIEHS; DEL NIDO, 2003; PANTOS; MOUROUZIS; COKKINOS, 2007; MOUROUZIS et al., 2009).

Após o início dos sintomas do infarto do miocárdio os níveis de T3 podem ser rapidamente regulados para baixo, visto que a conversão de T4 em T3 reverso é aumentada nessa condição (OHYAMA et al., 1987; FRIBERG et al., 2002). Na presença de disfunção cardíaca essa queda é ainda mais pronunciada. Ao que tudo indica a diminuição dos níveis de hormônios tireoidianos parece ser, agudamente, proporcional aos danos causados pela isquemia (OHYAMA et al., 1987; FRIBERG et al., 2002).

Este efeito pode ser inicialmente atribuído a modificações no metabolismo e no uso da energia que ocorre no coração hipotireoidiano. Efetivamente o consumo de oxigênio é diminuído em corações hipotireoideos dado a superioridade da Isoforma miosina de cadeia lenta o que favorece o aumento de glicogênio no miocárdio (ABE; OBATA; TANAKA, 1992; PANTOS et al., 2005). Neste sentido Abe e colaboradores (1992) mostraram que durante a isquemia os níveis de trifosfato de adenosina (ATP) decaem vagarosamente em corações hipotireoideos, e foram maiores na reperfusão, diferentemente dos corações controle (ABE; OBATA; TANAKA, 1992). Assim, o glicogênio pré-isquêmico mais elevado e a glicólise retardada são provavelmente mediadores importantes na tolerância isquêmica observada nos corações hipotireoideos. No nosso estudo, apesar de não termos feito essas medições, os parâmetros pré e pós-isquêmicos registrados, fazem-nos acreditar, junto aos relatos da literatura, que os corações hipotireoideos aqui avaliados, apresentavam este metabolismo energético, já que o hipotireoidismo classicamente aumenta expressão da isoforma β-MHC que se utiliza deste metabolismo.

5.3 Efeito das diferentes fases do ciclo estral sobre os parâmetros cardíacos, após evento de isquemia e reperfusão

Neste segmento do estudo foram avaliados alguns parâmetros cardíacos, antes e após a isquemia, nas quatro fases do ciclo estral com o objetivo de confirmar que essas flutuações hormonais não interferiam na função cardíaca dos animais aqui avaliados.

Ao o que tudo indica as diferentes fases do ciclo estral podem ou não modificar a função cardíaca dependendo do tipo de injúria causada ao coração.

Yang e colaboradores, concluíram que a fase do ciclo estral influencia na função cardíaca após o trauma-hemorrágico, uma vez que fêmeas em proestro não sofreram alterações na função cardíaca após este tipo de trauma (YANG et al., 2006). Em casos de injúria direta, como na isquemia e reperfusão, a resposta pode ser diferente. Frasier e colaboradores descreveram que a função cardíaca após um evento isquêmico, tanto em vivo como em ex-vivo, independe da fase do ciclo estral, principalmente no que se refere à frequência cardíaca, gravidade das arritmias, pressão de perfusão e LVDP (FRASIER et al., 2013).

No presente projeto, mesmo os grupos experimentais estando em diferentes fases do ciclo estral, não foram observadas diferenças na LVDP, tanto antes como depois do evento isquêmico, o que comprova que as pequenas oscilações hormonais ocorridas nas diferentes fases do ciclo estral são indiferentes para a função cardíaca tanto antes como depois de um quadro de isquemia e reperfusão.

Após confirmarmos que as oscilações hormonais encontradas no decorrer de quatro dias não modifica a função cardíaca mesmo após um episódio isquêmico, resolvemos então restringir um grupo de animais jovens, por quatro semanas, à presença dos hormônios ovarianos, e assim descrever qual é a importância desses hormônios para a função cardíaca frente a um quadro isquêmico.

5.4 Efeito da ooforectomia sobre parâmetros cardiacos após um evento de isquemia e reperfusão

A diminuição dos níveis de hormônios ovarianos está sendo relacionada com alterações na função cardíaca após um evento isquêmico (KIM et al., 1996; MCNULTY et al., 2000) e que o risco de óbito por decorrência deste evento pode ser reduzido com a terapia de estrogênio (ET). No entanto, essa redução depende muito da magnitude da duração da interrupção do fornecimento de sangue (BULKLEY, 1987), da idade do indivíduo e do tempo relativo à ausência de estrógeno (NAKAMURA et al., 1992; WONG et al., 2006).

Nossos resultados atuais mostram claramente que a 0oforectomia, por 30 dias em ratas jovens, não foi capaz de alterar nenhum dos parâmetros

avaliados durante o período de reperfusão após um episódio isquêmico com duração de 20m.

Os efeitos da diminuição dos níveis de hormônios ovarianos no coração têm sido objeto de muitas investigações. Alguns estudos mostram que a deficiência de hormônios ovarianos por curtos períodos (6 a 8 semanas), produzido por oofoerectomia, não aumenta a incidência de arritmias ou o tamanho do infarto do miocárdio (MCNULTY et al., 2000), o que corrobora com estudos atuais (GOYAL; SEMWAL; YADAV, 2016). Liu e colaboradores (2004) avaliaram a função cardíaca de ratas Sprague-Dawley, três meses depois da cirurgia, e observaram o declínio da função cardíaca que foi sustentada durante a reperfusão. Por outro lado, a ooforectomia por tempos mais curtos (14 dias), também foi capaz de atenuar, em até duas vezes, a recuperação da função cardíaca, como bomba, após 60 minutos de isquemia com fluxo baixo (0,5 mL / min, 60 min). Portanto, tanto o tempo de ooforectomia como o período de isquemia pode influenciar na recuperação do tecido cardíaco após um evento isquêmico, citado em (BULKLEY, 1987; KALOGERIS et al., 2012). Todos os tecidos podem resistir a períodos curtos de isquemia. No entanto, a exposição prolongada à isquemia pode induzir à hibernação do miocárdio, em que as células cardíacas revertem para um fenótipo metabólico mais ancestral a fim de sobreviver, mas com um custo de função mecânica reduzida. Assim, as respostas dos tecidos à isquemia / reperfusão são bimodais, dependendo da duração da isquemia, citado em (BULKLEY, 1987; KALOGERIS et al., 2012).

Além disso, a idade do animal contribui diretamente para a dimensão do dano isquêmico (WILLEMS et al., 2005). Os efeitos da deficiência de estrogênio na função cardíaca foram mais pronunciados em animais idosos, do que em animais adultos (NAKAMURA et al., 1992). Isso sugere que outras variáveis associadas à deficiência de estrógeno, como a idade, são necessárias para a piora na recuperação após um evento isquêmico.

O fato da ooforectomia, por 30 dias em ratas jovens, não alterar a recuperação cardíaca após uma isquemia de 20m, sugere, ao menos indiretamente, que a diminuição de estrógeno por si só, pelo menos por um curto período, não é capaz de atenuar a recuperação cardíaca. Entretanto, esses achados devem ser comprovados com estudos adicionais mais conclusivos.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente estudo podemos concluir que:

- A ausência dos hormônios ovarianos por quatro semanas não altera a recuperação cardíaca após um evento de isquemia seguida de reperfusão.
- O hipotireoidismo subclínico não prejudica a recuperação funcional do coração após isquemia acompanhada de reperfusão.
- Os corações hipotireoideos podem ser mais resistentes à lesão por isquemia seguida de reperfusão, apesar de continuarem com a função cardíaca deprimida.

7. REFERÊNCIAS

ABE, M.; OBATA, H.; TANAKA, H. Functional and metabolic responses to ischemia in the isolated perfused hypothyroid rat heart. **Japanese circulation journal**, v. 56, n. 7, p. 671–680, 1992.

ALMEIDA, S. A. De; ROBERTO, E.; CLAUDIO, G.; MENGAL, V. F.; GUEDES, S. Exercise Training Reduces Cardiac Dysfunction and Remodeling in Ovariectomized Rats Submitted to Myocardial Infarction. **Plos One**, v. 9, n. 12, p. 1–12, 2014.

ANDERSON, S. E.; KIRKLAND, D. M.; BEYSCHAU, A.; CALA, P. M.; STEVEN, E.; KIRKLAND, D. M.; BEYSCHAU, A. Acute effects of 17_-estradiol on myocardial pH, Na, and Ca2 and ischemia-reperfusion injury.**American journal of physiology. Cell physiology**, v. 8644, n. 9, p. 57–64, 2005.

ASARIAN, L.; GEARY, N. Sex differences in the physiology of eating. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 305, n. 11, p. R1215–R1267, 2013.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: Referencias: Elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BERGER, L.; EL-ALFY, M.; LABRIE, F. Effects of intravaginal dehydroepiandrosterone on vaginal histomorphology, sex steroid receptor expression and cell proliferation in the rat.**Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 109, n. 1–2, p. 67–80, 2008.

BERS, D. M. Cardiac excitation–contraction coupling. **Nature**, v. 415, n. 6, p. 198–205, 2002.

BIONDI, B. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Heart failure and thyroid dysfunction. **European Journal of Endocrinology**, v. 167, n. 5, p. 609–618, 2012.

BLAUSTEIN, J. D. An Estrogen by Any Other Name. **Endocrinology**, v. 149, n. 6, p. 2697–2698, jun. 2008.

BLENCK, C. L.; HARVEY, P. A.; RECKELHOFF, J. F.; LEINWAND, L. A. The Importance of Biological Sex and Estrogen in Rodent Models of Cardiovascular Health and Disease. **Circulation Research**, v. 118, n. 8, p. 1294–1312, 2016.

BULKLEY, G. B. Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. **The British journal of cancer. Supplement**, v. 8, p.2 66–73, 1987.

BUPHA-INTR, T.; WATTANAPERMPOOL, J.; PENA, J. R.; WOLSKA, B. M.; SOLARO, R. J. Myofilament response to Ca2+ and Na+/H+ exchanger activity in sex hormone-related protection of cardiac myocytes from deactivation in hypercapnic acidosis. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 2, p. R837–R843, 28, 2006.

CANARIS, G. J.; MANOWITZ, N. R.; MAYOR, G.; RIDGWAY, E. C. The Colorado thyroid disease prevalence study. **Archives of internal medicine**, v. 160, n. 4, p. 526–534, 2000.

COUSE, J. F.; KORACH, K. S.; KORACH, K. S. Estrogen Receptor Null Mice : What Have We Learned and Where Will They Lead Estrogen Receptor Null Mice : What Have We Learned and Where Will They Lead Us ? **Endocrine Reviews**, v. 20, n. April, p. 358–417, 1999.

CROWLEY, W. F.; RIDGWAY, E. C.; BOUGH, E. W.; FRANCIS, G. S.; DANIELS, G. H.; KOURIDES, I. A.; MYERS, G. S.; MALOOF, F. Noninvasive evaluation of cardiac function in hypothyroidism. Response to gradual thyroxine replacement. **The New England journal of medicine**, v. 296, n. 1, p. 1–6, 1977.

CURCIO, C.; LOPES, A. M.; RIBEIRO, M. O.; FRANCOSO, O. A.; CARVALHO, S. D.; LIMA, F. B.; BICUDO, J. E.; BIANCO, A. C. Development of compensatory thermogenesis in response to overfeeding in hypothyroid rats. **Endocrinology**, v. 140, n. 8, p. 3438–3443, 1999.

DANTAS, A. P. V; FRANCO, M. D. C. P.; TOSTES, R. C. a; FORTES, Z. B.; COSTA, S. G.; NIGRO, D.; CARVALHO, M. H. C. Relative contribution of estrogen withdrawal and gonadotropins increase secondary to ovariectomy on prostaglandin generation in mesenteric microvessels. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 43, n. 1, p. 48–55, 2004.

DIECKMAN, L. J.; SOLARO, R. J. Effect of thyroid status on thin-filament Ca2+ regulation and expression of troponin I in perinatal and adult rat hearts. **Circulation research**, v. 67, n. 2, p. 344–351, 1990.

DILLMANN WH. Biochemical basis of thyroid hormone action in the heart. **Am J Med**. v.88. n. 88, p. 626–630, 1990.

DONG, J.; GAO, C.; LIU, J.; CAO, Y.; TIAN, L. TSH inhibits SERCA2a and the PKA / PLN pathway in rat cardiomyocytes. **Oncotarget**, v. 7, n. 26, 2016.

EBER, B. et al. Changes in thyroid hormone parameters after acute myocardial infarction. **Cardiology (Switzerland)**, v. 86, n. 2, p. 152–156, 1995.

EMPSON, M. et al. Prevalence of thyroid disease in an older Australian population. **Internal Medicine Journal**, v. 37, n. 7, p. 448–455, 2007.

ESCOBAR-MORREALE, H. F.; OBREGON, M. J.; ESCOBAR DEL REY, F.; MORREALE DE ESCOBAR, G. Replacement therapy for hypothyroidism with thyroxine alone does not ensure euthyroidism in all tissues, as studied in thyroidectomized rats. **Journal of Clinical Investigation**, v. 96, n. 6, p. 2828–2838, 1995.

EVANS, H. M.; LONG, J. A. Characteristic Effects upon Growth, Oestrus and Ovulation Induced by the Intraperitoneal Administration of Fresh Anterior Hypophyseal Substance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 8, n. 3, p. 38–39, 1922.

EVORA, P.R.B. ET AL. Lesão de Isquemia-Reperfusão. Aspectos Fisiopatológicos e a Importância da Função Endotelial. **Arquivo Brasileiro Cardiologia,** v.66, n.4, p. 239-245, 1996.

FRASIER, C. R.; BROWN, D. A.; SLOAN, R. C.; HAYES, B.; STEWART, L. M.; PATEL, H. D.; LUST, R. M.; ROSENBAUM, M. D. Stage of the estrous cycle does not influence myocardial ischemia-Reperfusion injury in rats (rattus norvegicus). **Comparative Medicine**, v. 63, n. 5, p. 416–421, 2013.

FRIBERG, L.; WERNER, S.; EGGERTSEN, G.; AHNVE, S. Rapid down-regulation of thyroid hormones in acute myocardial infarction: is it cardioprotective in patients with angina? **Archives of internal medicine**, v. 162, n. 12, p. 1388–94, 2002.

FRIEHS, I.; EL NIDO, P. J. Increased susceptibility of hypertrophied hearts to ischemic injury.**The Annals of Thoracic Surgery**, v. 75, n. 2, p. S678-S684, 2003.

GIUBERTI, K.; PEREIRA, R. B.; BIANCHI, P. R.; PAIGEL, A. S.; VASSALLO,

D. V.; STEFANON, I. Influence of Ovariectomy in the Right Ventricular Contractility in Heart Failure Rats. **Archives of Medical Research**, v. 38, n. 2, p. 170–175, 2007.

GOYAL, A.; SEMWAL, B. C.; YADAV, H. N. Abrogated cardioprotective effect of ischemic preconditioning in ovariectomized rat heart. **Human & experimental toxicology**, v. 35, n. 6, p. 644–653, 2016.

GROHÉ, C.; KAHLERT, S.; LÖBBERT, K.; STIMPEL, M.; KARAS, R. H.; VETTER, H.; NEYSES, L. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors.**Federation of European Biochemical Societies**, v. 416, n. 1, p. 107–112, 1997.

HAK, A. E.; POLS, H. A.; VISSER, T. J.; DREXHAGE, H. A.; HOFMAN, A.; WITTEMAN, J. C. Subclinical hypothyroidism is an independent risk factor for atherosclerosis and myocardial infarction in elderly women: the Rotterdam Study.**Annales medicinae internae**, v. 132, n. 4, p. 270–278, 2000.

HALL, J. M.; COUSE, J. F.; KORACH, K. S. The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 40, p. 36869–36872, 2001.

HARRIS, D. E.; WORK, S. S.; WRIGHT, R. K.; ALPERT, N. R.; WARSHAW, D. M. Smooth, cardiac and skeletal muscle myosin force and motion generation assessed by cross-bridge mechanical interactions in vitro. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 15, n. 1, p. 11–19, 1994.

HOLLAND, F. W.; BROWN, P. S.; CLARK, R. E. Acute severe postischemic myocardial depression reversed by triiodothyronine. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 54, n. 2, p. 301–305, 1992.

HU, S.; REINCKE, M.; STRO, H.; HORN, M.; DIENESCH, C.; MORA, P.; SCHMIDT, H. H. H. W.; ALLOLIO, B.; NEUBAUER, S. Evidence Against a Role of Physiological Concentrations of Estrogen in Post-Myocardial Infarction Remodeling. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 34, n. 5, p. 1427–1434, 1999.

IRIGOYEN, M. C.; PAULINI, J.; FLORES, L. J.; FLUES, K.; BERTAGNOLLI, M.; MOREIRA, E. D.; CONSOLIM-COLOMBO, F.; BELLO-KLEIN, A.; DE ANGELIS, K. Exercise training improves baroreflex sensitivity associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats. **Hypertension**, v. 46, n. 4, p. 998–1003, 2005.

KALOGERIS, T.; BAINES, C. P.; KRENZ, M.; KORTHUIS, R. J. Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury.**International review of cell and molecular biology**, v. 298, n. 3, p. 229–317, 2012.

KANNEL, W. B.; HJORTLAND, M. C.; MCNAMARA, P. M.; GORDON, T. Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. **Annals of internal medicine**, v. 85, n. 4, p. 447–452, 1976.

KARTHICK, N.; DILLARA, K.; POORNIMA, K. N.; SUBHASINI, A. S. Dyslipidaemic changes in women with subclinical hypothyroidism. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 10, p. 2122–2125, 2013.

KENESSEY, A.; OJAMAA, K. Thyroid hormone stimulates protein synthesis in the cardiomyocyte by activating the Akt-mTOR and p70S6K pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 30, p. 20666–20672, 2006.

KIM, Y.; CHEN, B.; BEAUREGARD; KOURETAS, P.; THOMAS, G.; FARHAT, M.; MYERS, A.; DE, L. 17β-Estradiol Prevents Dysfunction of Canine Coronary Endothelium. **Circulation**, v. 94, n. 12, p. 2901–2908, 1996.

KLEIN, I.; DANZI, S. Thyroid disease and the heart Circulation. **Circulation,** v. 116, n. 15, p. 1725-1735, 2007.

KLEIN, I. Hipertro a cardíaca induzida por tiroxina : tempo de desenvolvimento e inibição por Propranolol * Oxford Academic account. **Endocrinology**, v. 123, n. 1, p. 203–210, 1988.

KLEIN, L. E.; SIGEL, a V; DOUGLAS, J. a; EGHBALI-WEBB, M. Upregulation of collagen type I gene expression in the ventricular myocardium of thyroidectomized male and female rats. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 28, n. 1, p. 33–42, 1996

KNOWLTON, A. A.; KORZICK, D. H. Estrogen and the female heart**. Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 389, n. 1, p. 31-39, 2014.

KONG, L.; WEI, Q.; FEDAIL, J. S.; SHI, F.; NAGAOKA, K.; WATANABE, G. Effects of thyroid hormones on the antioxidative status in the uterus of young adult rats. **Journal of Reproduction and Development**, v. 61, n. 3, p. 219–227, 2015.

KORZICK, D. H.; LANCASTER, T. S. Age-related differences in cardiac ischemia–reperfusion injury: effects of estrogen deficiency. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 465, n. 5, p. 669–685, 2013.

KRENZ, M.; ROBBINS, J. Impact of beta-myosin heavy chain expression on cardiac function during stress. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 44, n. 12, p. 2390–2397, 2004.

LEDEE, D.; PORTMAN, M. A.; KAJIMOTO, M.; ISERN, N.; OLSON, A. K. Thyroid Hormone Reverses Aging-Induced Myocardial Fatty Acid Oxidation Defects and Improves the Response to Acutely Increased Afterload. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

LEGRYS, V. a; FUNK, M. J.; LORENZ, C. E.; GIRI, A.; JACKSON, R. D.; MANSON, J. E.; SCHECTMAN, R.; EDWARDS, T. L.; HEISS, G.; HARTMANN, K. E. Subclinical hypothyroidism and risk for incident myocardial infarction among postmenopausal women. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 98, n. 6, p. 2308–2317, 2013.

LI, X.; HUANG, J.; YI, P.; BAMBARA, R. a; HILF, R.; MUYAN, M. Single-Chain Estrogen Receptors (ERs) Reveal that the ER α / β Heterodimer Emulates Functions of the ER α Dimer in Genomic Estrogen Signaling Pathways Single-Chain Estrogen Receptors (ERs) Reveal that the ER, Heterodimer Emulates Functions of the. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 17, p. 7681–7694, 2004.

LIU, D.; TENG, W.; SHAN, Z.; YU, X.; GAO, Y.; WANG, S.; FAN, C.; WANG, H.; ZHANG, H. The effect of maternal subclinical hypothyroidism during pregnancy on brain development in rat offspring. **Thyroid**, v. 20, n. 8, p. 909–915, 2010.

LJ, F.; FIGUEROA, D.; IC, S.; JORGE, L.; MC, I.; RODRIGUES, B.; K, D. A. Effects of exercise training on autonomic dysfunction management in an experimental model of menopause and myocardial infarction . **Menopause**, v. 17, n. 4, p. 712–717, 2010.

LONDOÑO, Á. L.; GALLEGO, M. L.; BAYONA, A.; LANDÁZURI, P. Prevalencia de hipotiroidismo y relación con niveles elevados de anticuerpos antiperoxidasa y yoduria en población de 35 y más años en Armenia. 2009-2010. **Revista de Salud Pública**, v. 13, n. 6, p. 998–1009, 2011.

LU, L.; YU, X.; TENG, W.; SHAN, Z. Treatment with levothyroxine in pregnant rats with subclinical hypothyroidism improves cell migration in the developing brain of the progeny. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 35, n. 5, p. 490–496, 2012.

MADATHIL, A.; HOLLINGSWORTH, K. G.; BLAMIRE, A. M.; RAZVI, S.; NEWTON, J. L.; TAYLOR, R.; WEAVER, J. U. Levothyroxine improves abnormal cardiac bioenergetics in subclinical hypothyroidism: A cardiac magnetic resonance spectroscopic study. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 100, n. 4, p. E607–E610, 2015.

MANDL, A. M. The Phases of the Oestrous Cycle in the Adult White Rat. **Journal of Experimental Biology**, v. 28, n. 4, p. 576–584, 1951.

MANO, T.; SAKAMOTO, H.; FUJITA, K.; MAKINO, M.; KAKIZAWA, H.; NAGATA, M.; KOTAKE, M.; HAMADA, M.; UCHIMURA, K.; HAYAKAWA, N.; HAYASHI, R.; NAKAI, A.; ITOH, M.; KUZUYA, H.; NAGASAKA, A. Effects of thyroid hormone on catecholamine and its metabolite concentrations in rat cardiac muscle and cerebral cortex. **Thyroid**, v. 8, n. 4, p. 353–358, 1998.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. .; TANNO, A. . Determination of The Estrous Cycle Phases of Rats: Some Helpful Considerations. **Brazilian Journal Biology**, v. 62, n. 4, p. 609–614, 2002.

MAZER, N. A. Interaction of Estrogen Therapy and Thyroid Hormone Replacement in Postmenopausal Women. **Thyroid**, v. 14, p.27-34, 2004.

MCHUGH, N. A.; COOK, S. M.; SCHAIRER, J. L.; BIDGOLI, M. M.; MERRILL, G. F. Ischemia- and reperfusion-induced ventricular arrhythmias in dogs: effects of estrogen. **The American journal of physiology**, v. 268, n. 2, p. H2569-

H2573, 1995.

MCNULTY, P. H.; JAGASIA, D.; WHITING, J. M.; CAULIN-GLASER, T. Effect of 6-wk estrogen withdrawal or replacement on myocardial ischemic tolerance in rats. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 278, n. 4, p. H1030- H1034, 2000.

MEENA, C. L.; MEENA, R. D.; NAWAL, R.; MEENA, V. K.; BHARTI, A.; MEENA, L. P. Assessment of left ventricular diastolic dysfunction in sub-clinical hypothyroidism. **Acta Informatica Medica**, v. 20, n. 4, p. 218–220, 2012.

MELI, R.; PACILIO, M.; RASO, G. M.; ESPOSITO, E.; COPPOLA, A.; NASTI, A.; DI CARLO, C.; NAPPI, C.; DI CARLO, R. Estrogen and raloxifene modulate leptin and its receptor in hypothalamus and adipose tissue from ovariectomized rats. **Endocrinology**, v. 145, n. 7, p. 3115–3121, 2004.

MITTAL, G.; CHANDRAIAH, G.; RAMARAO, P.; RAVI KUMAR, M. N. V. Pharmacodynamic evaluation of oral estradiol nanoparticles in estrogen deficient (ovariectomized) high-fat diet induced hyperlipidemic rat model. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 1, p. 218–223, 2009.

MONZANI, F.; DI BELLO, V.; CARACCIO, N.; BERTINI, A.; GIORGI, D.; GIUSTI, C.; FERRANNINI, E. Effect of levothyroxine on cardiac function and structure in subclinical hypothyroidism: A double blind, placebo-controlled study. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n. 3, p. 1110–1115, 2001.

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

NAKAMURA, H.; PJ, del N.; E, J.; SARIN, M.; H, F.; S, L. Age related differences in cardiac susceptibility to ischemia / reperfusion injury . Response to deferoxamine . **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 104, n. 1, p. 165–172, 1992.

NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J.-Å. Estrogen Receptors: Therapies Targeted to Receptor Subtypes. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 89, n. 1, p. 44–55, 2011.

OGITA, H.; NODE, K.; ASANUMA, H.; SANADA, S.; LIAO, Y. Amelioration of Ischemia- and Reperfusion-Induced Myocardial Injury by the Selective Estrogen Receptor Modulator , Raloxifene , in the Canine Heart. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 40, n. 5, p. 2–9, 2002.

OHYAMA, T.; NAKAI, A.; NAGASAKA, A.; AONO, T.; MASUNAGA, R.; NAKAGAWA, H.; KATAOKA, K.; OHTANI, S.; SHINODA, S.; IWASE, K. [Change in serum thyroid hormone levels in patients with acute myocardial infarction]. **Nihon Naibunpi Gakkai zasshi**, v. 63, n. 1, p. 19–25, 1987.

OJAMAA, K.; KENESSEY, A; KLEIN, I. Thyroid hormone regulation of phospholamban phosphorylation in the rat heart. **Endocrinology**, v. 141, n. 6, p. 2139–2144, 2000.

PANTOS C, VASSILIKI V, DENNIS D C, DENNIS V. Thyroid hormone and phenotypes of cardioprotection. **Basic Res Cardiol.** v.99, n. 3, p. 101–120, 2004.

PANTOS, C.; MALLIOPOULOU, V.; MOUROUZIS, I.; SFAKIANOUDIS, K.; TZEIS, S.; DOUMBA, P.; XINARIS, C.; COKKINOS, A. D.; CARAGEORGIOU, H.; VARONOS, D. D.; COKKINOS, D. V. Propylthiouracil-induce hypothyroidism is associated with increased tolerance of the isolated rat heart to ischaemia-reperfusion. **Journal of Endocrinology**, v. 178, n. 3, p. 427–435, 2003.

PANTOS, C.; MOUROUZIS, I.; MALLIOPOULOU, V.; PAIZIS, I.; TZEIS, S.; MORAITIS, P.; SFAKIANOUDIS, K.; VARONOS, D. D.; COKKINOS, D. V. Dronedarone Administration Prevents Body Weight Gain and Increases Tolerance of the Heart to Ischemic Stress: A Possible Involvement of Thyroid Hormone Receptor α 1. **Thyroid**, v. 15, n. 1, p. 16–23, jan. 2005.

PARKS, R. J.; HOWLETT, S. E. Sex differences in mechanisms of cardiac excitation-contraction coupling.**Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 465, n. 5, p. 747-763, 2013.

PHILP, K. L.; HUSSAIN, M.; BYRNE, N. F.; DIVER, M. J.; HART, G.; COKER, S. J. Greater antiarrhythmic activity of acute 17 b -estradiol in female than male anaesthetized rats : correlation with Ca 2 þ channel blockade.**British Journal of Pharmacology**, v. 149, n. 10, p. 233–242, 2006.

PUGACH, E. K.; BLENCK, C. L.; DRAGAVON, J. M.; LANGER, S. J.; LEINWAND, L. A. Estrogen receptor profiling and activity in cardiac myocytes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 431, p. 62–70, 2016.

REVANKAR, C. M. A Transmembrane Intracellular Estrogen Receptor Mediates Rapid Cell Signaling. **Science**, v. 307, n. 5715, p. 1625–1630, 11 mar. 2005.

RIBEIRO, jr R. F.; BM, P.; FF, P.; FIORIM, J.; FM, D.; FL, L.; AA, F.; DV, V. Myocardial contractile dysfunction induced by ovariectomy requires AT1 receptor activation in female rats . **Cell Physiol Biochem**, v. 30, n. 1, p. 1–12, 2012.

ROGER, V. L.; GO, A. S.; LLOYD-JONES, D. M., et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2011 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, v. 123, n. 4, p. e18–e209, 1 2011.

SANDLER, B.; WEBB, P.; APRILETTI, J. W.; HUBER, B. R.; TOGASHI, M.; CUNHA LIMA, S. T.; JURIC, S.; NILSSON, S.; WAGNER, R.; FLETTERICK, R. J.; BAXTER, J. D. Thyroxine-thyroid hormone receptor interactions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 53, p. 55801–55808, 2004.

SAPIN, R.; SCHLIENGER, J. L. Dosages de thyroxine (T4) et tri-iodothyronine (T3): techniques et place dans le bilan thyroïdien fonctionnel. **Annales de Biologie Clinique**, v 61, n. 4, p. 411- 420, 2003.

SCHMIDT-OTT, U. M.; ASCHEIM, D. D. Thyroid Hormone and Heart Failure. **Current Heart Failure Reports**, v. 3, n. 3, p. 114–119, 2006.

SHAHRIVAR, F. F.; BADAVI, M.; DIANAT, M.; MARD, A.; AHANGARPOUR, A.; SAMARBAF-ZADEH, A. Exogenous apelin changes alpha and beta myosin heavy chain mRNA expression and improves cardiac function in PTU-induced hypothyroid rats. **Gene**, v. 595, p. 25–30, 2016.

SHAIKH, A. a. Estrone and Estradiol Levels in the Ovarian Venous Blood from Rats During the Estrous Cycle and Pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 307, p. 297–307, 1971.

SHIBLI-RAHHAL, A.; HAYNES, W.; SINKEY, C.; DILLON, J. S. Effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) on vascular function in postmenopausal women with diabetes : a ran- domized controlled trial. **Journal of Diabetes Research and Clinical Metabolism**, v. 1, n. 1, p. 13, 2012.

SUGIURA, S.; KOBAYAKAWA, N.; FUJITA, H.; YAMASHITA, H.; MOMOMURA, S.; CHAEN, S.; OMATA, M.; SUGI, H. Comparison of unitary displacements and forces between 2 cardiac myosin isoforms by the optical trap technique: molecular basis for cardiac adaptation. **Circulation Research**, v. 82, n. 10, p. 1029–1034, 1998.

SUZUKI, A.; ENARI, M.; ABE, Y.; OHTA, Y.; IGUCHI, T. Effect of ovariectomy on histological change and protein expression in female mouse reproductive tracts. **In Vivo**, v. 10, n. 1, p. 103–110, 1996a.

SUZUKI, A.; ENARI, M.; HAYASHI, Y.; OHTA, Y.; KOSHIKAWA, N.; MIYAZAKI, K.; IGUCHI, T. Characterization and Role of Proteinases Induced by Estrogen-Deprivation in Female Mouse Reproductive Tracts. **Reproductive Toxicology**, v. 10, n. 2, p. 129–135, 1996b.

TAVARES, F. M.; DA SILVA, I. B.; GOMES, D. A.; BARRETO-CHAVES, M. L. M. Angiotensin II type 2 receptor (AT2R) is associated with increased tolerance of the hyperthyroid heart to ischemia-reperfusion. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 27, n. 5, p. 393–402, 2013.

THOMAS, S. A.; PALMITER, R. D. Thermoregulatory and metabolic phenotypes of mice lacking noradrenaline and adrenaline. **nature**, v. 387, n. 6628, p. 94–97, 1 maio 1997.

VAN DER VELDEN, J. Diastolic myofilament dysfunction in the failing human heart**. Pflugers Archiv European Journal of Physiology**,v. 462, n. 1, p. 155-163, 2013.

WILLEMS, L.; ZATTA, A.; HOLMGREN, K.; ASHTON, K. J.; HEADRICK, J. P. Age-related changes in ischemic tolerance in male and female mouse hearts. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 38, n. 2, p. 245–256, 2005.

WONG, C. M.; YAO, X.; AU, C. L.; TSANG, S. Y.; FUNG, K. P.; LAHER, I.; VANHOUTTE, P. M.; HUANG, Y. Raloxifene prevents endothelial dysfunction in aging ovariectomized female rats. **Vascular Pharmacology**, v. 44, n. 5, p. 290–298, 2006.

XUE, Q.; XIAO, D.; ZHANG, L. Estrogen Regulates Angiotensin II Receptor Expression Patterns and Protects the Heart from Ischemic Injury in Female Rats.**Biology of Reproduction**, v. 93, n. May, p. 1–9, 2015.

YANG, S. S.; TANG, L.; LI, R. G.; GE, G. H.; QU, X. K.; MA, J. W.; QIAO, Z. Y.; ZHANG, L.; LIU, H. J.; HOU, Y. M.; CAO, H.; HAO, Z. M.; CHENG, W. B.; WANG, H. W. The effects of subdinical hypothyroidism on serum lipid level and TLR4 expression of monocyte in peripheral blood of rats. **Neuroendocrinology Letters**, v. 35, n. 1, p. 80–86, 2014.

YANG, S.; CHOUDHRY, M. A.; HSIEH, Y.-C.; HU, S.; RUE, L. W.; BLAND, K. I.; CHAUDRY, I. H. Estrus cycle: influence on cardiac function following trauma-hemorrhage. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 291, n. 6, p. H2807- H2815, 2006.

YOUSEFZADEH, N.; JEDDI, S.; ALIPOUR, M. R. Effect of Fetal Hypothyroidism on Cardiac Myosin Heavy Chain Expression in Male Rats. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, n. 2, 2016.

ZHANG, L.; PARRATT, J. R.; BEASTALL, G. H.; PYNE, N. J.; FURMAN, B. L. Streptozotocin diabetes protects against arrhythmias in rat isolated hearts: Role of hypothyroidism. **European Journal of Pharmacology**, v. 435, n. 2, p. 269–276, 2002.