

ALEXANDRE GONÇALVES

**EFEITO DO AGONISTA SELETIVO DO RECEPTOR β TIREOIDIANO (GC-1) NA
TOLERÂNCIA AO ESFORÇO DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO
HIPOTIREOIDISMO EXPERIMENTAL**

BRASÍLIA, 2014

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ALEXANDRE GONÇALVES

**EFEITO DO AGONISTA SELETIVO DO RECEPTOR β TIREOIDIANO (GC-1) NA
TOLERÂNCIA AO ESFORÇO DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO
HIPOTIREOIDISMO EXPERIMENTAL**

**Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde
pelo Programa de Pós Graduação em Ciências da
Saúde de Universidade de Brasília.**

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves

BRASÍLIA
2014

ALEXANDRE GONÇALVES

**EFEITO DO AGONISTA SELETIVO DO RECEPTOR β TIREOIDIANO (GC-1) NA
TOLERÂNCIA AO ESFORÇO DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO
HIPOTIREOIDISMO EXPERIMENTAL**

**Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde
pelo Programa de Pós Graduação em Ciências da
Saúde de Universidade de Brasília.**

Aprovado em 19 de Dezembro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves – Presidente
Universidade de Brasília-UNB**

**Prof. Dr. Fábio Lera Orsatti
Universidade Federal do Triângulo Mineiro-UFTM**

**Prof. Dr. Gilmar da Cunha Sousa
Universidade Federal de Uberlândia**

**Profa. Dra. Marie Togashi
Universidade de Brasília-UNB**

**Profa. Dra. Angélica Amorim Amato
Universidade de Brasília-UNB**

*Dedico este trabalho a minha esposa, **Juliana da Costa Silva**, pelo carinho e apoio incondicional dispensados a mim, que não me deixou fraquejar nos momentos mais difíceis ao longo desta jornada.*

AGRADECIMENTOS

À **DEUS**, por me iluminar e me guiar ao longo de toda minha vida;

Aos meus pais, Osvaldo e Eunice e minha irmã Alessandra, os quais sempre apoiaram minhas escolhas e são o alicerce de minha vida;

À Tia Dio e Senhor Roberto Furlanetto pelo carinho e transmissão de valores que levarei por toda minha vida;

Ao amigo de infância Prof. Dr. Túlio César Ferreira, que por uma destas coisas que só o destino explica, foi responsável pela minha apresentação ao meu orientador;

Aos amigos Juliana Huss, Roberto Furlanetto Jr, Vickelle Sobreira, Leandro Paranhos e Fernanda Rodrigues pelo apoio a realização deste trabalho;

Ao amigo Thiago Fidale, pelo companherismo e amizade ao longo de anos de estrada;

Aos ex-orientandos de iniciação científica Chineyder Tolentino e Karolinne Zinato pela grande contribuição durante fase experimental deste trabalho;

À Universidade de Brasília pela oportunidade de alcançar mais esta etapa de minha formação profissional;

Ao Prof. Valter Gomes, Reitor do Centro Universitário do Planalto de Araxá-UNIARAXA por oferecer a estrutura necessária para realização deste trabalho;

À Profa. Dra. Danielle Rodrigues dos Santos, coordenadora de pesquisa do UNIARAXA, pelo apoio dado a realização deste estudo;

Ao Prof. Marcelo Beletti, pela abertura do Laboratório de Histologia e Biologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia-UFU para realização de parte deste estudo;

Ao Prof. Mundim do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da UFU pela contribuição na análise do material sanguíneo deste estudo;

Aos professores Dr. Antonio Wilson Almeida e Dra. Maria Lúcia Prada que sempre tiveram uma palavra serena e de apoio nos momentos mais difíceis desta trajetória;

Ao Prof. Dr. Delander Neiva pela confiança depositada em meu trabalho frente ao curso de Medicina da Faculdade Atenas de Paracatu-MG.

Ao Prof. Dr. Alex Miranda Rodrigues pela oportunidade de fazer parte de sua equipe de professores gestores do curso de Medicina da Fundação Presidente Antonio Carlos-UNIPAC Campus Araguari/MG.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves, a minha eterna gratidão pelos preciosos ensinamentos na área científica os quais levarei comigo por toda a vida;

Ao meu primeiro mestre, Prof. MSc. Carivan Cordeiro, referência de professor, com quem hoje tenho a honra de compartilhar a companhia como colega de trabalho;

Ao Prof. Dr. Gilmar da Cunha Sousa, o qual, há 14 anos atrás, mostrou-me que não devemos desanimar diante dos desafios e que sonhos se realizam;

Ao Prof. Dr. Elmiro Santos Resende, o qual me ensinou que as coisas têm seu ritmo próprio e que é perfeitamente possível, unir o rigor de um grande cientista à amorosidade inerente a um grande ser humano.

*“Investir em conhecimento pode nos tornar sábios,
mas amor e fé nos tornam humanos.”
(Gloria Kalil)*

RESUMO

INTRODUÇÃO: O hormônio tireoidiano (HT) tem um papel central na homeostase metabólica atuando sobre a lipólise e controle do colesterol. Entretanto, HT tem profundos efeitos sobre o coração através de seu receptor α_1 . Assim, agonistas seletivos β tireoidianos, como GC-1, de ação comprovada sobre a taxa metabólica, níveis séricos de colesterol e lipólise, sem afetar o ritmo cardíaco, apresenta-se com grande interesse terapêutico para combate a doenças como obesidade e dislipidemia. Entretanto, nenhum estudo, até o momento, procurou testar a ação de tal substância em organismo submetido a esforço físico. **OBJETIVO:** Investigar o efeito do GC-1 sobre a tolerância ao exercício de ratos com hipotireoidismo experimental, submetidos a sessões de natação. **MATERIAIS E MÉTODO:** Foram utilizados 48 ratos divididos em seis grupos: grupo controle (C), grupo hipotireoideo sem tratamento (HIPO), grupos de ratos com hipotireoidismo tratados com T_4 1x (T_4) ou 10 vezes superior (10x T_4), grupos de ratos com hipotireoidismo tratados com GC-1 1x (GC-1) ou 10 vezes superior (10xGC-1). Após oito semanas de tratamento os animais foram submetidos a um teste de tolerância ao esforço de natação através da mensuração do tempo em segundos em que os ratos conseguiam nadar sem submergirem por mais de dez segundos. Em seguida, os animais foram eutanasiados e coletados amostras de sangue para análise bioquímica, retirada do coração e músculo sóleo para pesagem e análise morfométrica do cardiomiócito. **Resultados:** O hipotireoidismo diminuiu a tolerância ao exercício dos animais e o tratamento com T_4 e GC-1 recuperou a níveis normais. Contudo, doses elevadas de T_4 também diminuíram a tolerância ao exercício físico. Por outro lado, doses elevadas de GC-1 não diminuíram a tolerância ao exercício. Interessantemente, animais hipotireóideos, tratados ou não com T_4 , assim como GC-1 e mesmo altas doses de GC-1 (10x) não alteraram o diâmetro dos cardiomiócitos e o peso relativo do músculo sóleo. Por outro lado, altas doses de T_4 aumentaram significativamente o diâmetro dos cardiomiócitos e induziram atrofia do músculo sóleo. **Conclusão:** Ao contrário de T_4 , GC-1, tanto em doses 1x quanto em doses elevadas não modificam a tolerância ao exercício físico de ratos com hipotireoidismo.

Palavras-Chave: GC-1; Exercício; Hipotireoidismo.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Thyroid hormone (TH) has a central role in metabolic homeostasis acting on lipolysis and cholesterol control. However, HT has profound effects on the heart by its receptor $\alpha 1$. Thus , selective β thyroid agonists such as GC - 1 , that has proven action on the metabolic rate , serum cholesterol levels and lipolysis without affecting heart rate, presented with great therapeutic value to fight diseases such as obesity and dyslipidemia . However, no study to date sought to test the action of this substance in the organism undergone physical effort. **AIM:** Investigate the effect of GC-1 on tolerance to exercise in rats with experimental hypothyroidism. **MATERIALS AND METHODS:** Six groups with eight animals were studied: control group (C), hypothyroid group without treatment (HYPO); hypothyroidism treated with T_4 1x (T_4) or 10 times higher (10x T_4); hypothyroidism treated with equal molar doses of GC-1 (GC-1) or 10 times higher (10xGC-1). After eight weeks, each animal underwent an exercise tolerance test by measuring the time (seconds), in which the rats were swimming with a load attached to their tails without being submerging for more than 10 sec. After the test, the animals were euthanized, and blood samples were collected for biochemical analysis, and the heart and soleus muscle were removed for weighing and morphometric analysis of the cardiomyocyte. **RESULTS:** Hypothyroidism significantly reduced tolerance to exercise and, treatment with GC-1 1x or T_4 recover tolerance test to normal parameters. However, high doses of T_4 also decreased tolerance to physical exercise. Conversely, ten times higher doses of GC-1 did not impair tolerance to exercise. Interestingly, hypothyroidism, treated or not with T_4 , GC-1 or even high doses of GC-1 (10x) did not change cardiomyocyte diameter and relative weight of the soleus muscle. In contrast, higher doses of T_4 significantly increased cardiomyocyte diameter and induced atrophy of the soleus muscle. **CONCLUSION:** Unlike T_4 , GC-1 in high doses did not modify tolerance to physical exercise in the rats with hypothyroidism.

Key-words: GC-1; Exercise; Hypothyroidism

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular dos hormônios tireoidianos: T_4 e T_3

Figura 2: Representação esquemática do eixo Hipotálamo-Hipófise-Tireóide. O aumento da secreção de T_4 e T_3 gera *feedback* negativo no hipotálamo e hipófise inibindo a síntese e secreção de TRH e TSH.

Figura 3: Desenho esquemático modificado do mecanismo de ação dos receptores de T_3 (TRs) na região promotora de genes alvos

Figura 4: Moléculas dos principais agonistas seletivos do receptor β tireoidiano sintetizados.

Figura 5: Molécula de GC-1 e molécula de T_3 .

Figura 6: Estruturas cristalográficas representativas da maior afinidade do GC-1 pelo $TR\beta$

Figura 7: Imagem gerada pelo software HL Image (Western Vision) de um campo de análise do corte histológico do miocárdio de um dos animais.

Figura 8: Níveis séricos de T_3 , T_4 e TSH dos animais dos diferentes grupos.

Figura 9: Tolerância ao esforço dos animais dos diferentes grupos submetidos ao teste de esforço

Figura 10: Diâmetro do cardiomiócito dos animais dos diferentes grupos.

Figura 11: Peso relativo do músculo sóleo dos animais dos diferentes grupos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito do GC-1 sobre as principais variáveis estudadas em organismo animal.

Tabela 2: Efeito do tratamento com T₄ e GC-1 sobre PC, PCor e PRCor dos ratos submetidos ao hipotireoidismo experimental.

ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT – Proteína quinase B
apo B – Apolipoproteína-B
Arg – Arginina
Asn – Asparagina
ATP – Adenosina trifosfato
ATPase – Adenosina 5' - trifosfatase
CEUA – Comissão de Ética no Uso Animal
ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*
GC-1 – Agonista seletivo do receptor β_1 tireoidiano
GC-24 – Agonista seletivo do receptor β_1 tireoidiano
HT – Hormônio tireoidiano
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
MHC1 – Miosina de cadeia pesada 1
MHC2 – Miosina de cadeia pesada 2
MHC2b – Miosina de cadeia pesada 2b
MHC2x – Miosina de cadeia pesada 2x
MTB – Maquinaria de Transcrição Basal
mTOR – *Mammalian target of Rapamycin*
PI3K – Fosfatidilinositol-3 quinase
RXR – Receptor X da retinóide
Ser – Serina
SERC₂ – Ca⁺² ATPase (Bomba de Cálcio)
T₃ – Triiodotironina
T₄ – Tetraiodotironina
TRE – Elementos responsivos dos receptores tireoidianos
TRH – Hormônio liberador da tirotrófina
TR α – Receptor tireoidiano α
TR β – Receptor tireoidiano β
TSH – Hormônio tireoestimulante ou tirotrófina
 α MHC – Miosina de cadeia pesada α
 β MHC – Miosina de cadeia pesada β

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 HORMÔNIOS TIREOIDIANOS: SÍNTESE, REGULAÇÃO E RECEPTORES.....	15
1.2 HORMÔNIO TIREOIDIANO E MIOCÁRDIO.....	18
1.3 HORMÔNIO TIREOIDIANO E MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	20
1.4 HORMÔNIO TIREOIDIANO E TOLERÂNCIA AO ESFORÇO.....	22
1.5 AGONISTAS SELETIVOS DO RECEPTOR β TIREOIDIANO.....	23
2 OBJETIVOS.....	29
2.1 OBJETIVO GERAL.....	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1 ANIMAIS E DROGAS.....	30
3.2 ARMAZENAMENTO DOS ANIMAIS.....	30
3.3 INDUÇÃO DO HIPOTIREOIDISMO.....	30
3.4 TESTE DE ESFORÇO.....	31
3.5 COLETA SANGUÍNEA E ANÁLISE DOS NÍVEIS HORMONAIS.....	31
3.6 RETIRADA E PESAGEM DO CORAÇÃO E MÚSCULO SÓLEO.....	31
3.7 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO CORAÇÃO.....	32
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
4 RESULTADOS.....	34
4.1 NÍVEIS SÉRICOS DE T_3 , T_4 E TSH.....	34
4.2 TESTE DE TOLERÂNCIA AO ESFORÇO NA NATAÇÃO.....	36
4.3 PARÂMETROS CORPORAIS DOS RATOS SUBMETIDOS AO HIPOTIREOIDISMO EXPERIMENTAL.....	37
4.4 MORFOMETRIA DOS CARDIOMIÓCITOS.....	38
4.5 PESO RELATIVO DO MÚSCULO SÓLEO.....	38
5 DISCUSSÃO.....	40
6 SUMÁRIO DOS RESULTADOS.....	45
7 CONCLUSÃO.....	46
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
9 APÊNDICE A.....	54
10 APÊNDICE B.....	56
11 ANEXO A.....	59

1 INTRODUÇÃO

Os hormônios tireoidianos (HTs) possuem ações em praticamente todos os sistemas orgânicos humanos, desempenhando um papel importante no crescimento e desenvolvimento, regulação de diversas funções homeostáticas, como produção de calor e de energia. Os HTs modulam o trabalho do miocárdio, taxa metabólica, densidade mineral óssea, regulação do metabolismo de lipídeos, do colesterol e lipoproteínas (1-2-3-4). Estas ações dos HTs são mediadas por dois receptores distintos: receptor α (TR α) e receptor β (TR β) (5).

Como o hormônio tireoidiano aumenta o gasto energético e reduz significativamente os níveis de colesterol e lipoproteínas, vários grupos têm procurado desenvolver substâncias agonistas seletivas do receptor β tireoidiano, uma vez que estes ligantes podem contribuir para o tratamento de doenças como obesidade e dislipidemias (6,7). Agonistas seletivos para TR β , por apresentarem menor afinidade pelo TR α_1 , não causam, por exemplo, taquicardia. Neste sentido, vários compostos com ação seletiva para TR β foram sintetizados e dentre estes podemos destacar o [3,5-dimetil-4-(4'-hidroxi-3'- isopropilbenzil)]-ácido fenoxiacético, conhecido como GC-1 (8).

Estudos já demonstraram a efetividade do GC-1 sobre a diminuição da obesidade, aumento da taxa metabólica, da lipólise, associado à diminuição dos níveis plasmáticos do colesterol, lipoproteínas e triglicerídeos sem aumentar a frequência cardíaca (9). Além disso, ao contrário do uso de hormônio tireoidiano, GC-1 não induz osteoporose ou agressão do tecido esquelético de roedores (10-11). A administração de GC-1 ou GC-24, outro agonista seletivo TR β , a ratos com hipotireoidismo não alterou a massa muscular (11), a expressão genética ou a composição do tipo de fibra muscular (12).

Apesar dos efeitos positivos dos agonistas seletivos TR β sobre a taxa metabólica e perfil lipídico já terem sido bem demonstrados na literatura, a ausência de efeitos colaterais sobre o coração ficou mais restrito à avaliação do aumento da frequência cardíaca e/ou presença de arritmias (6,9,13).

Contudo, até o momento nenhum estudo havia avaliado a influência dos agonistas seletivos para TR β sobre a tolerância ao exercício físico, apesar de já estar bem documentado na literatura que tanto o hipo quanto o hipertireoidismo afetam o desempenho durante o exercício (14-15).

Assim, nós avaliamos a tolerância ao esforço em sessões de natação de ratos hipotireoideos tratados com T₄ e GC-1 em doses 1x e 10x. Nossos resultados mostraram que GC-1, seja doses 1x ou 10x, não prejudicou a tolerância ao exercício físico, apontando para o fato de que a utilização de GC-1 conjuntamente com exercício físico, para controle da dislipidemia e obesidade, possa ser, aparentemente, seguro.

1.1 HORMÔNIOS TIREOIDIANOS: SÍNTESE, REGULAÇÃO E RECEPTORES.

Os HTs são formados dentro da glândula tireóide em seus folículos a partir de moléculas de iodo sendo quatro por molécula de 3,5,3',5'-tetraiodotironina (T₄) e três por molécula de 3,5,3'-triiodotironina (T₃), conforme ilustrado na figura seguinte. (16)

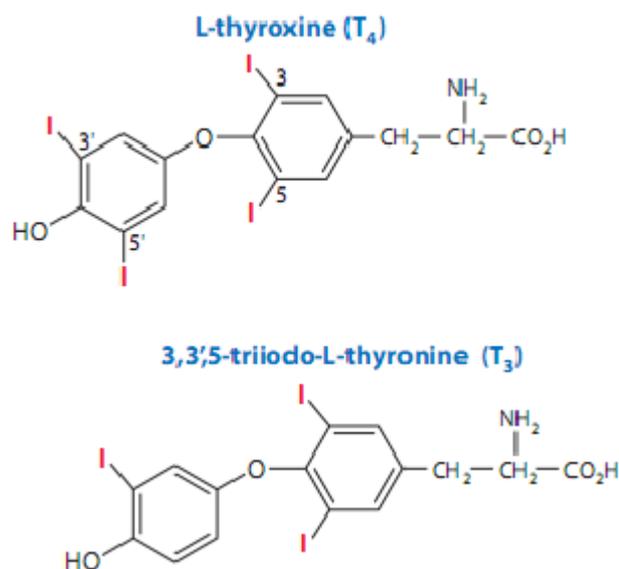


Figura 1 – Estrutura molecular dos hormônios tireoidianos: T₄ e T₃. Adaptado: Davis, Davis, Mousa, Luidens, Lin. (16)

Ambos os hormônios são liberados na circulação sistêmica a partir da ação do hormônio estimulante da tireóide ou tireotrofina (TSH). Este, por sua vez, é liberado da glândula hipófise a partir da ação do hormônio liberador da tireotrofina (TRH). Por conseguinte, a diminuição da concentração sérica de T₃ ou T₄ leva a aumento na síntese e secreção de TSH. Por outro lado tanto o T₃ sérico quanto o formado na hipófise ou hipotálamo pela conversão de T₄ a T₃ inibem a síntese e

secreção de TSH ou TRH. Este é um processo clássico de retroalimentação negativa (17) (Figura 2).

O TSH é um hormônio glicoprotéico com peso molecular de 28.000, constituído por duas sub-unidades, α e β , unidas por ligações não covalentes. Os HTs regulam diferentes etapas da síntese e secreção de TSH. A inibição da síntese de TSH pelos HTs resulta da diminuição dos níveis de RNA mensageiro para as sub-unidades α e β do hormônio por diminuição da transcrição de seus genes. Esses efeitos são observados em tempo coincidente com a ligação de T_3 aos seus receptores nucleares e são mediados, diretamente, por T_3 , não sendo bloqueados por inibidores da síntese protéica. Na deficiência da produção de HTs, como observada no hipotireoidismo, ocorre grande aumento nos níveis de RNA mensageiro para as sub-unidades α e β de TSH, com conseqüente aumento da síntese deste hormônio (18).

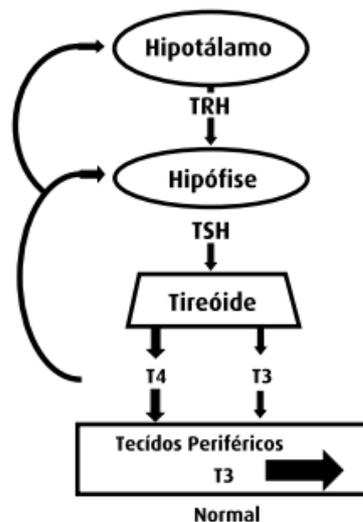


Figura 2 – Representação esquemática do eixo Hipotálamo-Hipófise-Tireóide. O aumento da secreção de T_4 e T_3 gera *feedback* negativo no hipotálamo e hipófise inibindo a síntese e secreção de TRH e TSH. Adaptado de Carvalho e Ramos (19).

Uma vez sintetizados e secretados os HTs entram na célula alvo por um sistema mediado por transportadores, para ligar-se a um receptor específico localizado no núcleo. Esses receptores estão distribuídos em vários tecidos e a afinidade do TR é dez vezes maior para a T_3 que para T_4 . As ações dos HTs são mediadas por dois receptores distintos: $TR\alpha$ e $TR\beta$ (5).

Conforme pode ser observado pela figura 3, na ausência do ligante, neste caso o T_3 , os TRs ligam-se aos elementos responsivos (TREs) como homodímeros

ou heterodímeros associados às proteínas corressoras. Esta interação permite a compactação da cromatina na região promotora, incapacitando a maquinaria de transcrição basal (MTB) iniciar a transcrição de genes alvos. Já na presença do ligante, os TRs sofrem uma mudança conformacional, dissociando as proteínas corressoras dos homodímeros (TR/TR). Esta dissociação permite a interação dos TRs com o receptor X da retinóide (RXR) formando heterodímeros e também com proteínas coativadoras, que por sua vez vão permitir o relaxamento da cromatina na região promotora. Esta interação tem o intuito de recrutar a MTB, ativando enfim a transcrição de genes responsivos ao T_3 (5).

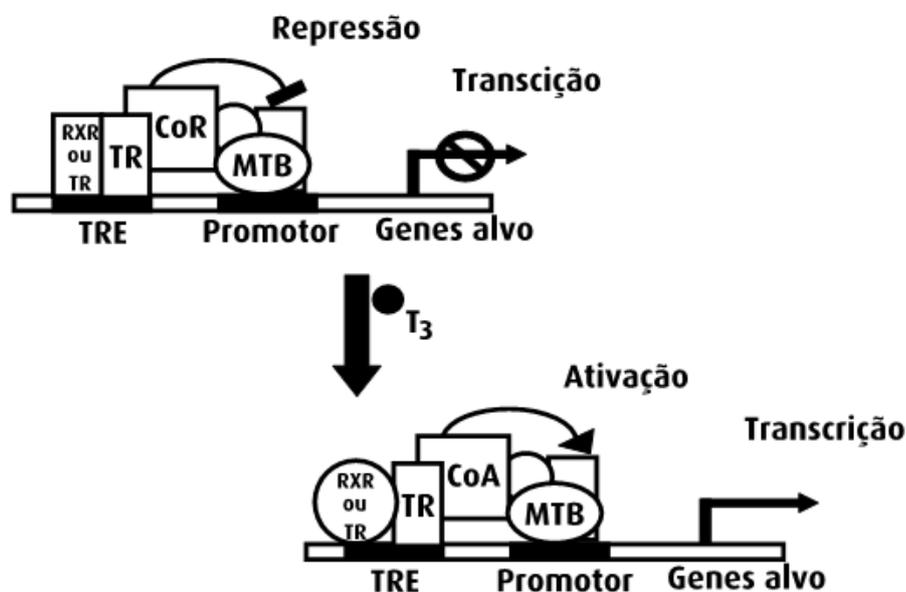


Figura 3 – Desenho esquemático modificado do mecanismo de ação dos receptores de T_3 (TRs) na região promotora de genes alvos. (A) Repressão da transcrição; (B) Ativação da transcrição. Fonte: Carvalho e Ramos.(19)

Os TRs são membros da superfamília de receptores nucleares e funcionam como fatores de transcrição induzido de T_3 conforme demonstrado anteriormente. Entretanto, TR α e β são codificados por dois genes distintos, localizados nos cromossomos 17 e 3, respectivamente. As isoformas α_1 , β_1 , β_2 e β_3 , proteínas resultantes de processamento alternativo do RNA mensageiro (*splicing* alternativo) ou da utilização de promotores alternativos, são capazes de se ligar aos HTs e estão distribuídas de maneira heterogênea nos diversos tecidos (20). O TR β_1 é predominante no rim, cérebro e fígado onde desempenha papel no metabolismo do

colesterol sanguíneo e gasto energético. $TR\beta_2$ possui uma expressão mais restrita ao cérebro e à hipófise anterior onde regula o mecanismo de *feedback* negativo do hormônio tireoidiano no eixo hipotálamo-tireóide. A regulação negativa do gene do TRH nos neurônios hipotalâmicos secretores de TRH e do gene da subunidade β do TSH por T_3 é fundamental para a manutenção da homeostase dos HT. $TR\alpha_1$ por sua vez é expresso predominantemente no sistema nervoso central, miocárdio, trato gastrointestinal, músculo esquelético, cartilagem e tecido ósseo (21-24).

Assim, essa expressão variada dos TRs pode constituir um mecanismo usado pelo T_3 para a regulação da transcrição de forma seletiva para alguns tecidos.

1.2 HORMÔNIO TIREOIDIANO E MIOCÁRDIO

Os HTs T_4 e T_3 tem influência direta no inotropismo e cronotropismo cardíaco, assim como nos mecanismos vasodilatadores periféricos. Tais ajustes garantem o aporte de oxigênio aos tecidos, que estando sobre influência da ação destes hormônios tem sua taxa metabólica aumentada (14).

No coração são expressos $TR\alpha$ e $TR\beta$ os quais ligam-se ao HT com similar afinidade (25). TR liga-se ao TRE nas regiões promotoras de diversos genes, incluindo miosina de cadeia pesada (MHC) e Ca^{+2} ATPase (SERCa2) e regula a transcrição de genes alvos no coração. T_3 aumenta a transcrição cardíaca do gene da α MHC (maior atividade da miosina ATPase) e diminui a transcrição do gene da β MHC (menor atividade da ATPase) (26,27).

T_3 também leva a um aumento na velocidade de relaxamento diastólico, a qual é causada por maior eficiência da SERCa2. Isto se deve ao aumento nos níveis de codificação do RNAm para a proteína SERCa2. Além disto, HT leva a um aumento no consumo de ATP no coração (26).

Portanto, HT estimula a taxa e força de contração sistólica e a taxa de relaxamento diastólico. Sua ação aumentada por algum tempo estimula a síntese de proteína cardíaca e leva a hipertrofia cardíaca concêntrica. Por outro lado, tal situação diminui o tônus vascular arterial levando a diminuição da pós-carga cardíaca (28).

Estados hiperdinâmicos da circulação estão associados à ação do HT sobre a transcrição gênica, o que promove síntese de proteínas regulatórias e estruturais do

coração e aumento do consumo de oxigênio em decorrência da maior ativação metabólica dos tecidos (29).

Assim sendo, distúrbios tireoidianos como hipo e hipertireoidismo estão relacionados a alterações consideráveis na estrutura e função cardíaca, assim como, nos processos hemodinâmicos (1,15).

Quadros clínicos de hipo e hipertireoidismo levam a alterações nas α MHC e β MHC do miocárdio, o que irá interferir diretamente na função de bomba deste órgão (14)

Na presença de níveis baixos de HT, como nos quadros de hipotireoidismo ocorre uma conversão da cadeia $\alpha\beta$ para $\beta\beta$ tendo como consequência diminuição da contratilidade do coração. Esta influência sobre o inotropismo cardíaco acarreta como resposta diminuição do volume sistólico que leva a diminuição do débito cardíaco (28).

Em modelos animais, em quadro de hipotireoidismo, os níveis de atividade da SERCa2 apresentaram-se diminuídos enquanto que os níveis de fosfolambam aumentados quando comparados aos animais eutireóides. Isto levou à diminuição do relaxamento diastólico. Tal ocorrência acarreta uma função sistólica anormal com diminuição de força de contração do músculo cardíaco (30, 34).

Por outro lado, níveis aumentados do HT leva a maior expressão do gene da cadeia α , o que potencializa capacidade de contratilidade do miocárdio. No entanto, este aumento de força de contração do miocárdio é garantida somente na elevação por pouco tempo do HT, uma vez que a exposição por período prolongado a ação deste hormônio poderá levar a catálise das proteínas contráteis do coração (14). Acrescenta-se a isto, menos energia química do ATP é usada para objetivos de contração, e mais dela é direcionada para produção de calor, o que causa um decréscimo na eficiência no processo de contração em corações hipertireóides (26).

Em estudo com objetivo de analisar efeito do hipertireoidismo prolongado sobre a função e estrutura cardíaca em hamsters normais e portadores de cardiomiopatia, no qual foram testados animais submetidos a altas doses de hormônio tireoidiano por dez dias e dois meses, os resultados demonstraram aumento significativo do peso relativo do coração, parâmetros ecocardiográficos como aumento da espessura da parede ventricular, aumento do comprimento do cardiomiócito e diminuição da fração de ejeção, somente nos animais submetidos a

dois meses de tratamento. Quanto a expressão de genes relacionados à função cardíaca confirmou-se aumento α MHC com diminuição da β MHC (32).

Já hipertrofia cardíaca pode ser explicada pelo fato de que, em resposta ao aumento da carga de trabalho imposta ao miocárdio, os cardiomiócitos aumentam seu volume e tamanho levando a aumento no tamanho e massa do coração. O crescimento dos cardiomiócitos ocorre a partir da ativação de eventos de sinalização como alteração na expressão gênica, aumento na taxa de síntese protéica e organização das proteínas contráteis dentro dos sarcômeros (29).

Na hipertrofia fisiológica a rede de colágeno fibrilar garante a integridade da estrutura dos miócitos adjacentes, facilitando o encurtamento dos cardiomiócitos o que leva a uma eficiência da bomba cardíaca. Contudo, a hipertrofia patológica está associada à morte celular ou necrose e diminuição dos cardiomiócitos o que leva a acúmulo excessivo de colágeno (fibrose). Tal processo leva a prejuízo tanto na contração e relaxamento ventricular quanto na densidade capilar e consequente déficit de oxigênio (33,34).

Outro fato relevante é que, aparentemente, a hipertrofia patológica está relacionada com a diminuição do metabolismo de gordura e aumento do metabolismo de glicose do miocárdio. No entanto, em hipertrofia patológica avançada o metabolismo de glicose tende a diminuir devido ao aumento da resistência insulínica levando a prejuízo de produção de ATP pelo miocárdio (31).

1.3 HORMÔNIO TIREOIDIANO E MÚSCULO ESQUELÉTICO

O músculo esquelético é um tecido caracterizado por um alto grau de plasticidade o que lhe confere uma grande capacidade adaptativa. Ele é constituído por quatro tipos de fibras: tipo I, tipo IIa, tipo IIx e tipo IIb. Tais fibras possuem características histoquímicas diferenciadas que fazem com que estas se apresentem com diferentes velocidades de contração e capacidade de gerar ATP. Numa ordem crescente temos as fibras tipo I como sendo mais lentas e fibras tipo IIb as mais rápidas, enquanto que IIa e IIx são fibras intermediárias (35).

Estas diferentes fibras possuem diferentes expressões de MHC. As fibras tipo I são caracterizadas pela expressão da MHC1, tipo IIa pela MHC2, tipo IIx pela MHC2x e tipo 2b MHC2b. Portanto, o custo energético mais elevado associado ao

aumento da velocidade de contração está relacionado, em parte, a expressão gênica específica ao tipo de fibra (36).

O tecido muscular esquelético é um dos principais alvos de ação dos HTs. A contribuição destes hormônios para plasticidade do fenótipo muscular é evidente principalmente nas fibras tipo I. Ao contrário das fibras rápidas, o desenvolvimento e a manutenção de um fenótipo de contratilidade lenta são dependentes de um padrão de estimulação quase contínua e de baixa frequência, típicos de uma inervação motora lenta. Assim, o efeito desta estimulação é contraposta pela sinalização do HT, o qual além de direcionar a expressão gênica envolvida na contratilidade rápida, também estimula a atividade mitocondrial, em particular, a glicólise (37).

O músculo sóleo de ratos eutireóideos é constituído de 97% de fibras tipo I e 96% de MHC1. Contudo, quando estes animais são levados ao estado de hipotireoidismo, através de da ingestão de metimazolo na água de beber, o músculo sóleo passa a ter quase que exclusivamente fibras tipo I. Por outro lado, a indução do hipertireoidismo nestes animais através da injeção de altas doses de T_3 , induz uma diminuição das fibras tipo I da musculatura em questão para aproximadamente 93% e queda na expressão de MHC1 para 81,3% (38).

Portanto, alterações metabólicas diferentes, mas com consequências semelhantes, podem ser observadas em pacientes tanto em hipo como em hipertireoidismo (14).

Pesquisas envolvendo pacientes com hipotireoidismo subclínico constataram, através de teste de força muscular, diminuição de força muscular significativa dos membros superiores, inferiores e musculatura inspiratória nestes segmentos corporais na maioria dos pacientes quando comparado ao grupo controle composto por sujeitos eutireoideos (39,40).

Já o estado de hipertireoidismo tem como efeito direto na musculatura esquelética perda de massa muscular e diminuição da proporção de fibras musculares do tipo I. Tais alterações levam os pacientes acometidos de tal disfunção à perda de força e resistência significativa para realização de trabalhos que exijam esforços físicos (41).

Estudo em roedores demonstrou que o músculo sóleo de ratos submetidos ao hipertireoidismo experimental apresentam menor peso relativo e menor força quando comparado aos ratos eutireóideos. Tais acometimentos ao músculo esquelético dos

animais estariam relacionados à diminuição da concentração e modificação oxidativa da MHC1 do músculo sóleo (42).

Em outro estudo que analisou os níveis das isoformas de MHC contida no músculo sóleo de ratos eutireóides, hipotireóides e hipertireóides, demonstrou um aumento da expressão MHC1 de 40,1% nos ratos hipotireóides e diminuição de 33% nos ratos hipertireóides quando comparado aos animais eutireóides (43).

Portanto, os distúrbios tireoidianos afetam significativamente tanto o metabolismo quanto o fenótipo da musculatura esquelética de pacientes e animais. Na manifestação de hipotireoidismo ocorre uma diminuição do metabolismo muscular e aumento da expressão da MHC1. Por outro lado o hipertireoidismo leva a um estado de hipermetabolismo, diminuição do peso relativo do músculo esquelético e diminuição da expressão da MHC1(14,38).

1.4 HORMÔNIO TIREOIDIANO E TOLERÂNCIA AO ESFORÇO

Estudos tradicionais da fisiologia do exercício descrevem que a capacidade do organismo em tolerar esforços físicos é reflexo de uma ação integrada dos sistemas respiratório, cardiovascular e muscular. Portanto, acometimentos que levem a prejuízo a função de tais sistemas terão como consequência a diminuição da capacidade funcional do organismo afetado (44).

Esforço físico requer energia. Para manter uma taxa de trabalho específica, o músculo deve ser suprido de ATP tão rápido quanto o utiliza. Para tanto, é necessário uma difusão alveolar preservada, uma eficiente bomba cardíaca, a qual garanta um débito cardíaco adequado para suprir o aporte sanguíneo necessário à musculatura ativa. E por fim, um músculo com características histoquímicas que favoreça a fosforilação do ATP para a manutenção da ciclagem das pontes cruzadas de miosina (45).

Neste sentido, o aporte sanguíneo para musculatura ativa durante o exercício físico irá depender de ajustes centrais (aumento do débito cardíaco) e periféricos (maior perfusão muscular) (15).

Portanto, conforme já demonstrado, como os HTs tem grande ação sobre os sistemas cardiovascular e muscular, é plausível considerarmos que tanto o hipo quanto o hipertireoidismo terão como consequência uma diminuição na capacidade do organismo em tolerar esforços físicos.

No primeiro caso, a explicação pode ser direcionada a menor ação do hormônio tireoidiano sobre os sistemas cardiovascular e muscular, o que acomete diretamente variáveis fisiológicas como débito cardíaco e perfusão muscular, as quais influenciam a tolerância ao esforço. Já no hipertireoidismo, a explicação para baixa tolerância ao esforço, encontra respaldo na diminuição da função de bomba cardíaca devido a possível degradação das proteínas contráteis do coração e a alta degradação de substrato energético muscular em sujeitos hipertireóides (14,15).

Estudos relacionados à hemodinâmica cardiovascular e a tolerância ao esforço realizados com pacientes com disfunções tireoidianas constataram menor taxa de esforço no limiar anaeróbio destes pacientes quando comparados aos sujeitos eutireóides (15,46). Esta diminuição na tolerância ao esforço se deve, em parte, em caso de hipertireoidismo, às disfunções oxidativas mitocondriais e, em caso de hipotireoidismo, ao inadequado suporte cardiovascular (15)

Seguindo esta linha, pesquisa que analisou a máxima tolerância ao esforço de ratos hipo e hipertireóides em exercício de natação, demonstrou que os animais apresentaram menores tempos de exercícios ao longo das sessões de natação quando comparado aos eutireóides (47)

Tais resultados foram corroborados por estudos envolvendo pacientes com hipotireoidismo subclínico. Avaliação da resposta cardiopulmonar e do limiar anaeróbio em mulheres com hipotireoidismo subclínico identificou menor tempo de tolerância ao esforço no teste ergométrico e menor pico de intensidade de esforço quando comparado ao grupo controle composto por mulheres saudáveis (48).

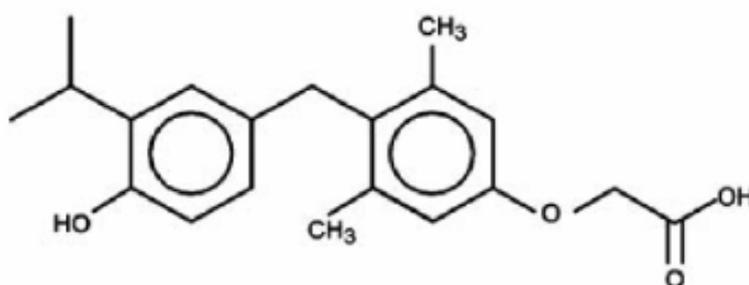
No entanto, o reestabelecimento do estado eutireóide através da terapia com L-tiroxina, melhora os parâmetros cardiopulmonares e limiar anaeróbio de mulheres como hipotireoidismo subclínico (49,50)

1.5 AGONISTAS SELETIVOS DO RECEPTOR β TIREOIDIANO

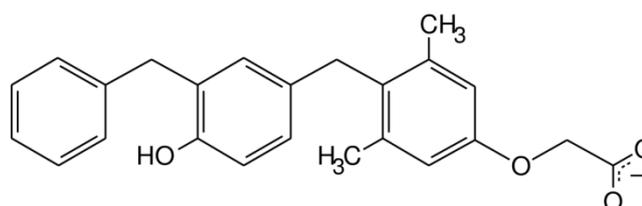
Muitos dos efeitos farmacológicos dos HT poderiam ser utilizados no tratamento de patologias não necessariamente relacionadas à tireóide, como, por exemplo, a dislipidemia e obesidade. No entanto, o HT não é utilizado no tratamento destas condições, porque os efeitos benéficos são acompanhados pelo aparecimento de efeitos colaterais importantes, como, por exemplo, taquicardia e arritmias (5).

Na tentativa de se obter os benefícios das ações do HT sobre o metabolismo, gordura corporal, níveis de colesterol e lipoproteínas vários pesquisadores têm focado seus esforços em sintetizar substâncias agonistas seletivas do receptor β tireoidiano, as quais garantem os benefícios da terapia com HT sem os indesejáveis efeitos colaterais sobre o coração. Neste sentido, vários compostos com ação seletiva para TR β foram sintetizados (figura 4) dentre os quais podemos destacar o [3,5-dimetil-4-(4'-hidroxi-3'-isopropilbenzil)]-ácido fenoxiacético, GC-1 (8).

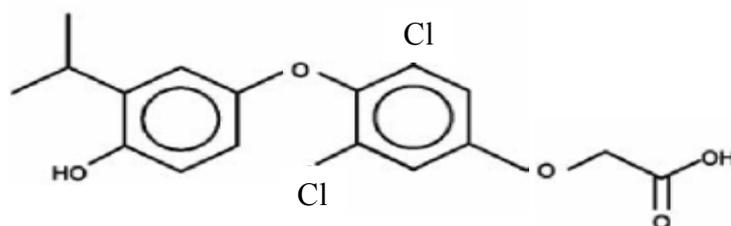
GC-1



GC-24



KB141



KB2115

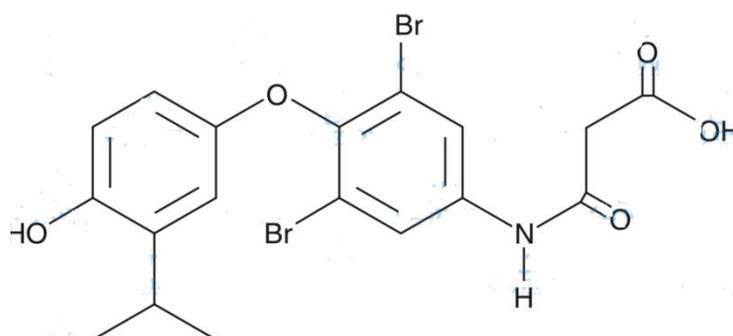


Figura 4: Moléculas dos principais agonistas seletivos do receptor β tireoidiano sintetizados (8,13,51,52)

GC-1 tem dimensões comparáveis ao T_3 , com algumas diferenças: uma ligação metil versus uma ligação éter dos anéis, ligações laterais de metil versus iodo e peso molecular menor devido às diferenças das porções de metil e iodo (53)

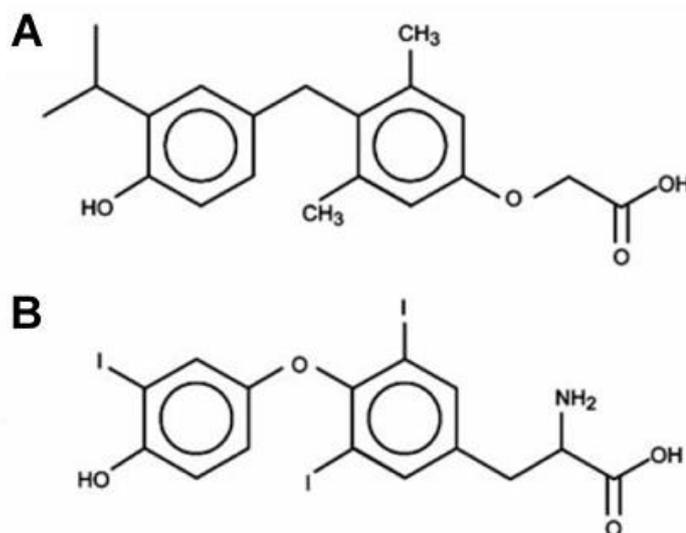


Figura 5: Molécula de GC-1 (A) e molécula de T_3 (B). Bleicher L, Aparicio R, Nunes FM et.al. (54)

Ensaio com células confirmaram que GC-1 tem potente atividade agonista ao TR, com máxima eficácia similar ao T_3 e seletividade para $TR\beta$. A maior parte da ligação seletiva de GC-1 está relacionada com conformações alternativas de um resíduo Arg (Arg228 α / Arg282 β). No $TR\alpha$ Arg 228 é observado em conformações múltiplas e a correspondente Arg 282 do $TR\beta$ é observada em apenas uma única conformação estável, interagindo efetivamente com o ligante (Figura 6). A conformação simples e estável Arg 282 observado no $TR\beta$ permite sua interação forte com GC-1 e Asn331 (Figura 6A). Por outro lado, no $TR\alpha$ o GC-1 tem uma ligação adicional com a Ser277 cuja energia de ligação do $TR\alpha$ é menor (Figura 6B) (54).

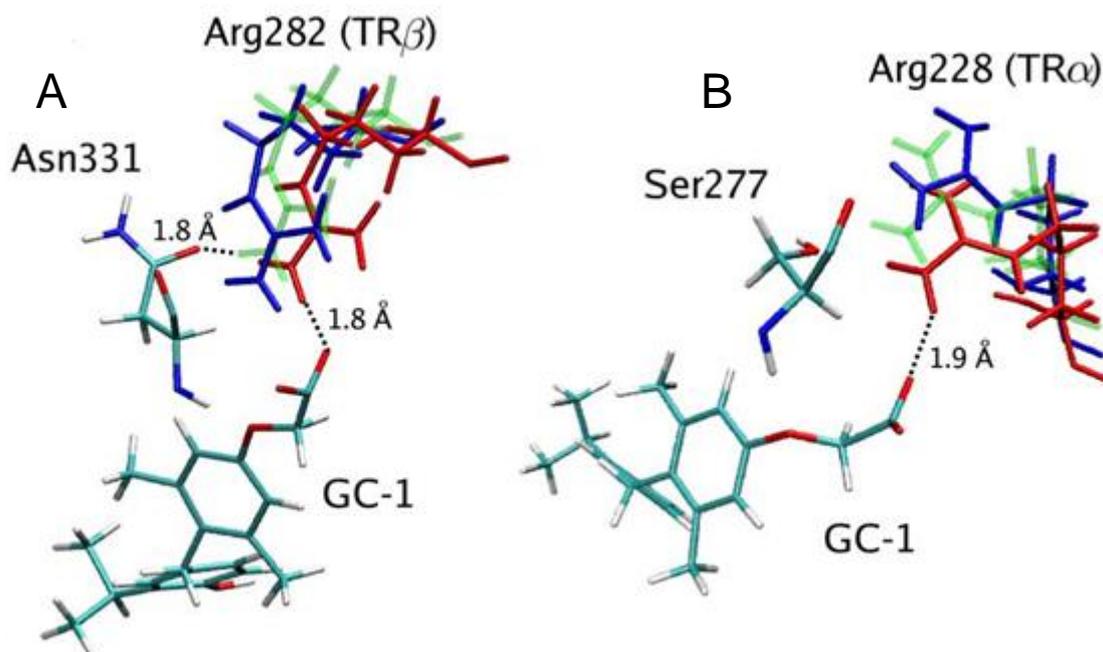


Figura 6: Estruturas cristalográficas representativas da maior afinidade do GC-1 pelo TR β . A) Interação forte GC-1 com Asn331 devido a conformação simples e estável da Arg282. B) Interação fraca do GC-1 com a Ser277 devido as conformações múltiplas da Arg228. Adaptado de Bleicher L, Aparicio R, Nunes FM, et.al.(55).

Portanto, conforme já mencionado anteriormente, esta maior afinidade pelo TR β faz com que GC-1 tenha grande potencial no controle do colesterol, metabolismo lipídico, aumento da taxa metabólica basal sem possíveis efeitos deletérios no coração, músculo esquelético e osso.

Em relação a distúrbios do metabolismo hipotireoidismo manifesto é caracterizado por hipercolesterolemia e aumento dos níveis de LDL-c e apolipoproteína-B (apo B), sendo que 90% dos pacientes possuem hipercolesterolemia. O mecanismo que pode explicar tal fato é a diminuição da remoção fracional do LDL devido tanto o número quanto a atividade dos receptores hepáticos para LDL estarem reduzidos. Outro fato é que o catabolismo hepático do colesterol para formação da bile é regulado pela enzima 7 α hidroxilase colesterol, a qual é regulada pelo T₃ podendo assim, ser a justificativa para o aumento sérico do níveis de colesterol associado ao hipotireoidismo (55, 56).

Portanto, a estimulação do TR aumenta a atividade da enzima hepática 7 α hidroxilase colesterol, a qual converte colesterol em ácidos biliares para excreção

fecal e aumenta a expressão da ligação de ATP aos transportadores G5 e G8, que possuem papel na excreção do esteroide biliar (57).

Neste sentido, agonistas seletivos do receptor tireoidiano aumentam a expressão dos receptores hepáticos de LDL, levando a maior remoção do LDL sérico. Além disto, eles atuam na diminuição dos níveis de apo B, a principal proteína constituinte do LDL (9).

No que tange os efeitos dos agonistas seletivos do receptor β tireoidiano sobre a taxa metabólica, gordura corporal e musculatura esquelética, estudos com GC-1 já demonstraram que este composto induz a perda da gordura corporal sob condições que não há nenhum ou mínimo efeito sobre o ritmo cardíaco e perda de músculo detectável (58).

Pesquisa realizada com ratos tratados por seis semanas com T_3 e GC-1 verificou que ambos os grupos tiveram aumentos semelhantes na taxa metabólica e redução na massa gorda sendo a redução mais acentuada para o grupo tratado com T_3 . Interessantemente, o grupo tratado com T_3 , teve sua massa muscular afetada negativamente em relação ao grupo tratado com GC-1(11).

Outro trabalho realizado com ratos e primatas os quais foram submetidos a tratamento com T_3 e GC-1 por período de sete dias demonstrou que os grupos de animais tratados com GC-1 e T_3 obtiveram ganhos semelhantes no que diz respeito à redução do colesterol e aumento na taxa metabólica. No entanto, o grupo GC-1 não apresentou alterações no ritmo cardíaco (59).

Com relação à taxa metabólica e ritmo cardíaco estudos com KB-141, mais um agonista seletivo do receptor β tireoidiano já sintetizado, também demonstraram, tanto em roedores quanto em primatas, um aumento do metabolismo sem alterar o ritmo do coração dos animais (13).

Corroborando com os achados anteriores pesquisadores, ao estudarem o efeito do T_3 e do GC-1 sobre a capacidade metabólica e dano oxidativo aos tecidos de ratos hipotireóides, verificaram que a capacidade aeróbia era mais aumentada no grupo tratado com T_3 do que com GC-1. No entanto, um dado relevante foi que o tratamento com GC-1 restabeleceu os valores eutireóides do ritmo cardíaco e os índices dos danos oxidativos teciduais (60).

Na mesma linha do GC-1 estudo realizado com GC-24, outro agonista seletivo do receptor β tireoidiano, demonstrou que, ratos alimentados com dieta rica em gordura, após quatro semanas de tratamento, o grupo tratado com GC-24

apresentou menores taxas de gordura corporal, gordura hepática e diâmetro de adipócitos quando comparado ao grupo controle e grupo alimentado com dieta rica em gordura sem tratamento. Estes resultados foram acompanhados de nenhuma alteração na ingestão alimentar e peso cardíaco. Já o grupo tratado com T₃ apesar de ganharem menos peso corporal e obterem menores taxas de gordura corporal total, exibiram hipertrofia cardíaca (61).

Em outra pesquisa ao analisar o influência do tratamento com GC-24 em camundongos submetidos à dieta rica em gordura para indução da obesidade pesquisadores observaram que tal substância não foi capaz de acelerar o metabolismo diante de tal dieta, mas foi capaz de amenizar o ganhos de peso corporal mais significativamente quando comparado ao tratamento com T₃. Por outro lado observaram que o peso do coração, do tecido adiposo marrom e rins aumentaram significativamente no grupo tratado com T₃ sendo nenhuma alteração observada no grupo tratado com GC-24 (62).

Assim, na tabela 1 apresentamos um resumo dos principais efeitos do GC-1 no organismo de ratos e primatas.

Tabela 1: Efeito do GC-1 sobre as principais variáveis estudadas em organismo animal.

Variáveis	Efeito do GC-1
Taxa Metabólica	Positivo
Metabolismo do Colesterol	Positivo
Metabolismo Lipídico	Positivo
Massa Gorda	Negativo
Massa Magra	Ausente
Massa Óssea	Ausente
Peso do Coração	Ausente
Ritmo Cardíaco	Ausente

2 OBJETIVO GERAL

Analisar a influência do agonista seletivo do receptor β tireoidiano, GC-1, sobre a capacidade de tolerar esforço físico de ratos wistar submetidos ao hipotireoidismo experimental.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito do GC-1 sobre a tolerância ao esforço de ratos wistar submetidos ao hipotireoidismo experimental
- Verificar o efeito do GC-1 sobre a morfometria do coração de ratos wistar submetidos ao hipotireoidismo experimental;
- Verificar o efeito do GC-1 sobre a musculatura esquelética de ratos wistar submetidos ao hipotireoidismo experimental;
- Comparar os efeitos do hormônio tireoidiano e de seu agonista seletivo do receptor β , GC-1, sobre a tolerância ao esforço, peso corporal, morfometria do coração e musculatura esquelética de ratos wistar submetidos ao hipotireoidismo experimental.

3 MATERIAIS E MÉTODO

3.1 ANIMAIS E DROGAS

O presente estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília sob o número 119158/2010. Para realização do protocolo experimental foram utilizados ratos Wistar, adultos, com peso entre 200 e 250g, pertencentes ao biotério da Universidade Federal de Uberlândia. Foram selecionados 48 animais, os quais foram divididos em seis grupos de oito animais sendo: grupo controle eutireóideo (C), grupo hipotireóideo (HIPO) com veículo, grupo tratado com T₄ (Sigma, Brasil) (T₄) na dose de 0,3µg/100g de peso corporal por dia, grupo tratado com 10xT₄ (10xT₄) na dose de 3µg/100g de peso corporal por dia, grupo tratado com GC-1 (GC-1) na dose de 0,15 µg/100g de peso corporal por dia e grupo tratado com 10xGC-1 na dose de 1,5 µg/100g de peso corporal por dia. Os grupos GC-1 e 10xGC-1 foram tratados com doses equimolar dos grupos T₄ e 10xT₄. Todos os tratamentos foram realizados por meio de injeção intraperitoneal diária por um período de oito semanas. Todos os animais eram pesados a cada três dias para ajuste das doses das drogas quando necessário.

3.2 ARMAZENAMENTO DOS ANIMAIS.

Os animais foram armazenados em gaiolas e estas alojadas no biotério do Centro Universitário do Planalto de Araxá/UNIARAXA. As condições ambientais do biotério foram mantidas as mesmas durante todo o período experimental no que se refere à temperatura ($22^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C), umidade relativa do ar ($55 \pm 10\%$), nível de ruído (0,1 a 65 dB) e luminosidade, reproduzindo-se o ciclo claro e escuro a cada 12 horas. Todos os animais receberam ração e água “*ad libitum*”.

3.3 INDUÇÃO DO HIPOTIREOIDISMO

O hipotireoidismo foi induzido através da administração metimazolo 0,1% mais perclorato de sódio 1% (MM 0,1%+P 1%) na água de beber dos ratos por duas semanas (10).

3.4 TESTE DE ESFORÇO

Antes da aplicação do teste de esforço os animais foram submetidos por cinco dias à adaptação ao ambiente aquático. O aparato de natação para o teste de esforço em ratos consistiu em um tanque com 20 cm de largura e 50 cm de altura, preenchido com água em temperatura de 30° a 32°, até a altura de 40 cm.

Para verificação da tolerância ao esforço foi utilizado o protocolo proposto por Lancha Júnior (63). De acordo com este protocolo cada animal deveria realizar uma sessão de exercício de natação, com carga de 5% do peso corporal amarrado em sua calda, pelo maior tempo possível. Tal procedimento garante uma intensidade de esforço correspondente à máxima fase estável do lactato (limiar anaeróbio). O teste era validado quando os ratos submergiam por mais de dez segundos. A tolerância ao esforço era aferida a partir do tempo que os animais suportavam nadando sem submergirem por mais de dez segundos.

3.5 COLETA SANGUÍNEA E ANÁLISE DOS NÍVEIS HORMONAIS.

Após a realização do teste de esforço os animais eram deixados em repouso por dez minutos e, em seguida, eutanasiados através de decapitação por guilhotina e o sangue do tronco coletado. O soro foi separado por centrifugação e imediatamente congelado. Posteriormente os níveis totais de T_3 , T_4 e TSH foram analisados no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia através do método ELISA. Os coeficientes de variação intra e interensaios foram respectivamente: $T_3 = 9,6-10,3\%$, $T_4 = 4,3-4,5\%$, TSH = 4,6-7,6%.

3.6 RETIRADA E PESAGEM DO CORAÇÃO E MÚSCULO SÓLEO

Após a eutanásia de cada um dos animais foi realizado a abertura do tórax e o desmembramento o membro posterior direito para retirada do coração e músculo sóleo os quais foram fixados em formol a 10%. Após 24 horas tanto o coração como o músculo sóleo foram pesados em balança de precisão da marca FILIZOLLA® (0.001 g-Gehaka Ltda. Sao Paulo-Brazil). O pesos relativos do músculo cardíaco e

do músculo sóleo foram determinados dividindo-se os respectivos valores obtidos pelo peso total do animal no dia do sacrifício.

Em seguida foi separado o ventrículo esquerdo juntamente com o septo interventricular para realização dos cortes histológicos. Tal procedimento teve como objetivo verificar uma possível hipertrofia ou degradação do órgão.

3.7 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO CORAÇÃO.

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

Feito isto, foram obtidos dois cortes do ventrículo esquerdo e medidos os menores diâmetros de sete células cortadas perpendicularmente e identificadas em cinco campos microscópicos diferentes. A medida do diâmetro das células foi realizada utilizando-se imagens digitalizadas capturadas em microscópio binocular *Olympus BX40* com objetiva de 40x, acoplado à câmera *Olympus OLY-200* ligada a um computador através de placa digitalizadora *Data Translation 3153*. As mensurações foram realizadas utilizando o software *HL Image (Western Vision)*. Todo procedimento de análise foi realizado pelo método duplo cego. Todos procedimentos para confecção das lâminas e equipamentos para análise o material pertenciam ao laboratório de Histologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

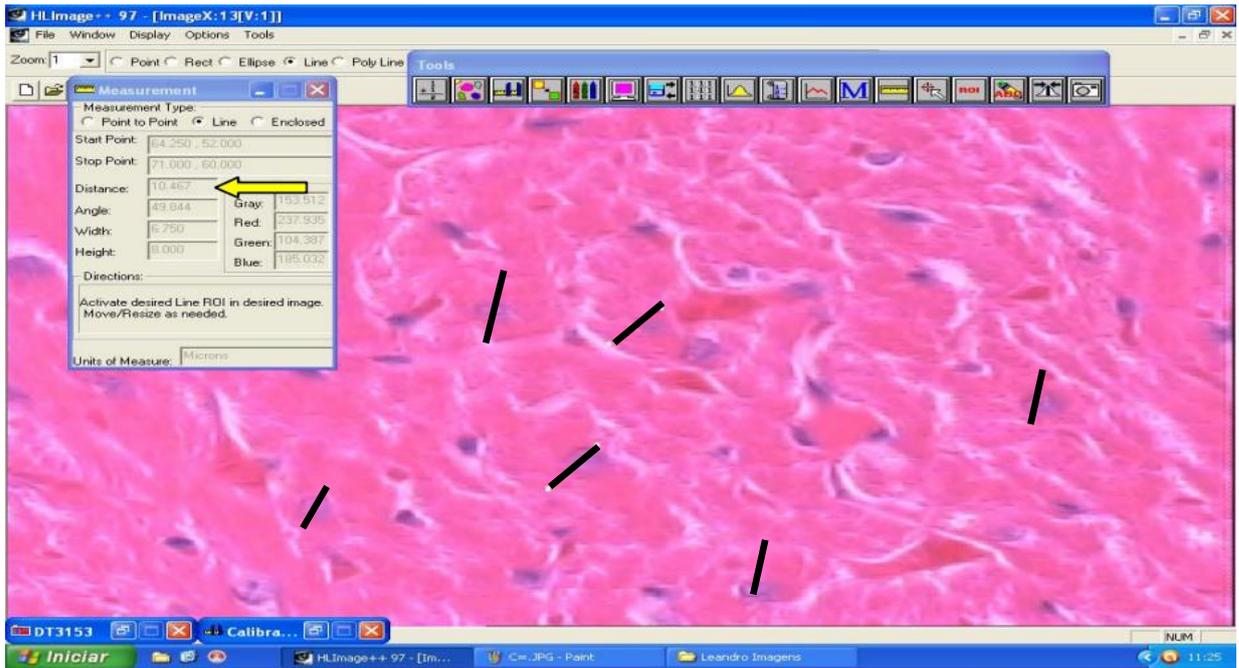


Figura 7: Imagem gerada pelo software HL Image (Western Vision) de um campo de análise do corte histológico do miocárdio de um dos animais. As barras pretas indicam a medida transversal realizada para obtenção do diâmetro dos cardiomiócitos.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Os dados foram submetidos a análise estatística através do software Prisma 4.0. Foram utilizado o método ANOVA *one way* para verificação de ocorrência de diferença entre os grupos e posteriormente aplicado o teste *Newman-Keuls*, com nível de significância em 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 NÍVEIS SÉRICOS DE T₃, T₄ E TSH

Conforme demonstrado na figura 8, os níveis de T₃ e T₄ foram significativamente menores, e o TSH significativamente maior no grupo HIPO em relação ao grupo C. O tratamento com T₄ normalizou os níveis de T₃, T₄ e TSH. Já o tratamento com altas doses de T₄ (10xT₄) aumentou significativamente os níveis séricos de T₃ e T₄ e diminuiu os níveis de TSH. Os animais tratados com GC-1 (GC-1) e doses elevadas de (10xGC-1) tiveram níveis séricos menores de T₃ e T₄ do que o grupo C. Já o nível sérico de TSH foi menor apenas para o grupo 10xGC-1.

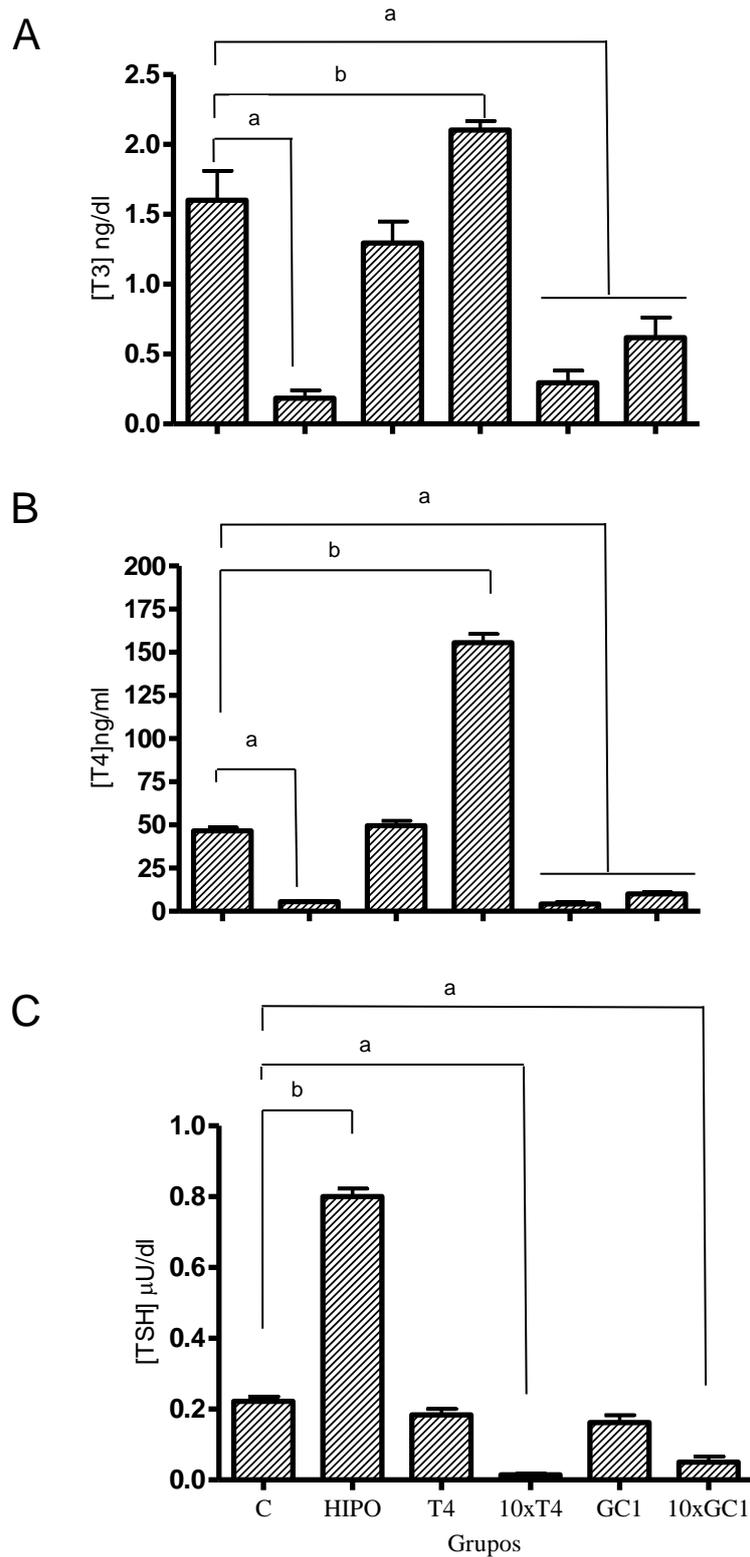


Figura 8: Níveis séricos de T_3 , T_4 e TSH dos animais nos diferentes grupos. Os valores correspondem às médias \pm erro médio. Para cada valor foram utilizados oito ratos. 7A = Níveis séricos de T_3 ; 7B = Níveis séricos de T_4 ; 7C = Níveis séricos de TSH; C = grupo controle; HIPO = ratos hipotireóides; T4 = ratos hipotireóides tratados com T_4 ; 10xT4 = ratos hipotireóides tratados com 10x T_4 ; GC-1 = ratos hipotireóides tratados com GC-1; 10xGC-1 = ratos hipotireóides tratados com 10xGC-1. a = diferença significativa menor quando comparado ao grupo C; b = diferença significativa maior quando comparado ao grupo C; $p \leq 0.05$ no teste de Newman-Keuls.

4.2 TESTE DE TOLERÂNCIA AO ESFORÇO NA NATAÇÃO.

Com o objetivo de verificar o comportamento de cada grupo diante do esforço físico os animais foram submetidos ao exercício de natação com carga de 5% do peso corporal. Como podemos observar na figura 9, o hipotireoidismo diminuiu a tolerância ao exercício físico de forma muito intensa. Enquanto os animais controle conseguiram nadar durante $426,75 \pm 42,72$ seg, o grupo com hipotireoidismo tolerou somente $110,13 \pm 5,78$ seg ($p < 0,001$). O tratamento dos animais com T_4 ou GC-1 normalizou a tolerância ao exercício ($T_4 = 414,63 \pm 36,40$ seg; GC-1 = $398,13 \pm 21,71$ seg). Todavia, quando os animais foram tratados com doses elevadas de T_4 ($10 \times T_4$), a tolerância ao exercício também diminuiu de forma significativa, atingindo valores próximo ao hipotireoidismo ($212 \pm 22,57$ seg – $p < 0,001$). Ao contrário de T_4 , doses elevadas de GC-1 não modificaram a tolerância dos animais na capacidade de nadar ($455,75 \pm 25,58$ seg).

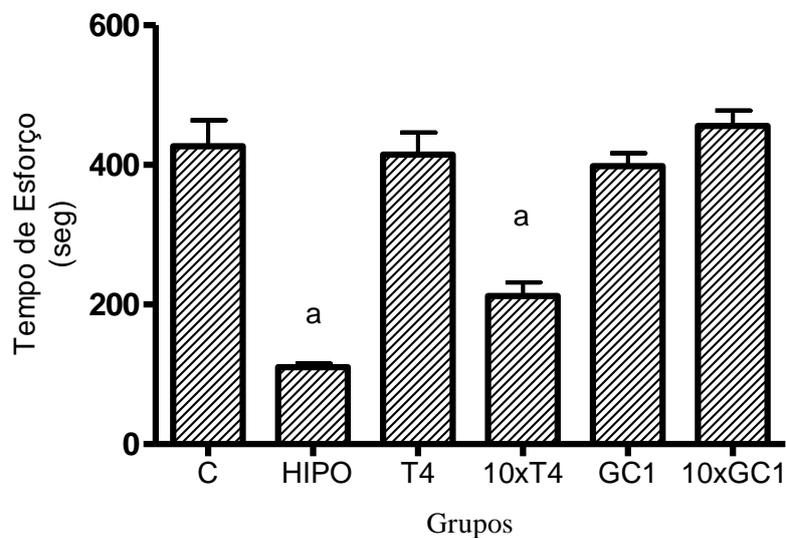


Figura 9: Tolerância ao esforço dos animais dos diferentes grupos submetidos ao teste de esforço. GC-1 não altera a tolerância ao esforço físico de ratos Wistar hipotireóides submetidos ao protocolo de natação com carga de 5% do peso corporal ($n = 8$ ratos por grupo). Controle (C); com hipotireoidismo não tratado (HIPO); com hipotireoidismo tratado com T_4 (T_4); doses elevadas ($10 \times T_4$); com GC-1 em doses equimolares (GC-1 e $10 \times GC-1$). O tempo de esforço aferido foi aquele em que os animais conseguiam nadar sem submergirem por mais de dez segundos. a = diferença significativa em relação ao grupo controle. $p \leq 0,05$ no teste de Newman-Keuls.

4.3 PARÂMETROS CORPORAIS DOS RATOS SUBMETIDOS AO HIPOTIREOIDISMO EXPERIMENTAL.

O hipotireoidismo promoveu um aumento significativo do peso corporal (PC) e o tratamento com T₄ ou GC-1 normalizou esses valores conforme demonstrado na tabela 2. Ao contrário, o uso de T₄ em doses elevadas (10xT₄), induziu uma redução significativa do PC.

O hipotireoidismo induziu um aumento significativo no peso do coração, quando comparado aos demais animais, enquanto que os grupos T₄, 10xT₄ e 10xGC-1 não apresentaram valores diferentes do grupo C. Já na análise do peso do coração corrigido pelo PC, observou-se um aumento significativo somente do grupo 10xT₄.

Tabela 2: Efeito do tratamento com T₄ e GC-1 sobre PC, PCor e PRCor dos ratos submetidos ao hipotireoidismo experimental

Grupos/Variáveis	PC (g)	PCor (mg)	PRCor (mg x g ⁻¹)
C	310,38 ± 10,67	970 ± 26,64	3,13 ± 0,09
HIPO	451,75 ± 15,17 ^a	1572,5 ± 80,84 ^a	3,48 ± 0,14
T ₄	337,50 ± 8,9 ^b	1052,50 ± 30,62 ^b	3,13 ± 0,11
10xT ₄	233,38 ± 15,22 ^{a,b,c}	886,25 ± 34,57 ^{b,c}	3,85 ± 0,2*
GC-1	341,38 ± 11,17 ^{b,d}	1142,5 ± 26,98 ^{a,b,d}	3,36 ± 0,09
10xGC-1	312,63 ± 18,07 ^{b,d}	1020 ± 29,28 ^{b,d}	3,32 ± 0,21

Os valores correspondem as médias ± erro médio. Para cada valor foram utilizados oito ratos. PC = peso corporal dos ratos; PCor = peso do coração dos ratos; PRCor = peso relativo do coração dos ratos (PC/PCor). C = grupo controle; HIPO = ratos hipotireóideos; T₄ = ratos hipotireóideos tratados com T₄; 10xT₄ = ratos hipotireóideos tratados com 10xT₄; GC-1 = ratos hipotireóideos tratados com GC-1; 10xGC-1 = ratos hipotireóideos tratados com 10xGC-1. ^a diferença significativa em relação ao C; ^b diferença significativa em relação ao HIPO; ^c diferença significativa em relação ao T₄; ^d diferença significativa em relação 10xT₄; * diferença significativa em relação aos demais grupos.

4.4 MORFOMETRIA DOS CARDIOMIÓCITOS

Considerando que o PC varia significativamente durante o estado de hipo ou hipertireoidismo, e que o peso do coração corrigido pelo peso corporal pode variar em função da modificação do PC, nós decidimos analisar o diâmetro do cardiomiócito dos diferentes grupos. Conforme observado na figura 10, quando comparado ao controle, o hipotireoidismo não modificou o diâmetro do cardiomiócito, assim como o tratamento com T₄ e GC-1. Contudo, o uso de T₄ em doses elevadas (grupo 10xT₄) induziu a um aumento significativo do diâmetros dos cardiomiócitos. O mesmo não ocorreu no uso de doses elevadas de GC-1(10xGC-1).

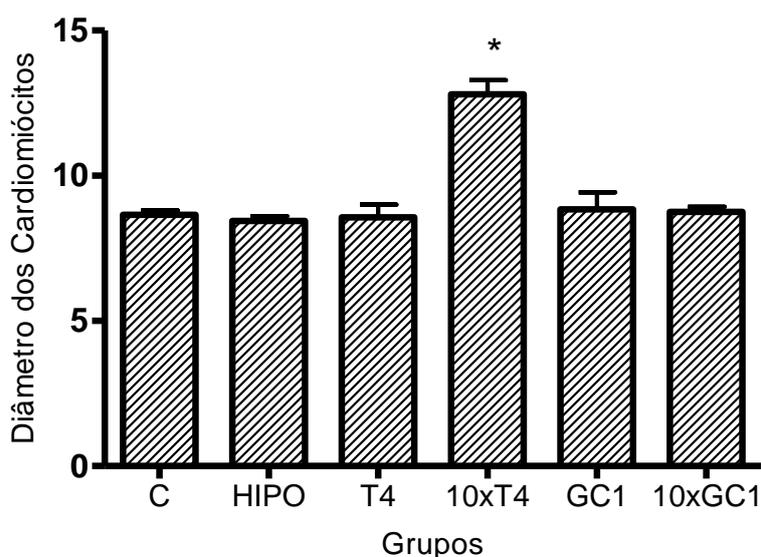


Figura 10: Diâmetro do cardiomiócito dos animais dos diferentes grupos. GC-1 não altera o diâmetro dos cardiomiócitos dos ratos tratados dose 1x (GC-1) quanto doses elevadas (10xGC-1). (n= 8 ratos por grupo). Foram analisados os diâmetros dos cardiomiocitos do ventrículo esquerdo dos animais nos diferentes grupos. * diferença significativa do grupo 10xT₄ em relação aos demais. p < 0,05 no teste de Newmans-Keuls.

5.5 PESO RELATIVO DO MÚSCULO SÓLEO.

Em seguida, com o objetivo de analisar a influência dos diferentes tratamentos sobre a musculatura esquelética avaliou-se o peso relativo do músculo

sóleo dos animais dos diferentes grupos. Conforme demonstrado na figura 11, o hipotireoidismo não modificou o peso relativo do músculo sóleo, assim como o tratamento com T₄ e GC-1 em doses fisiológicas. Por outro lado, a administração de T₄ em doses elevadas promoveu uma atrofia desse músculo. Tal processo não foi observado na administração de doses elevadas de GC-1 (10xGC-1).

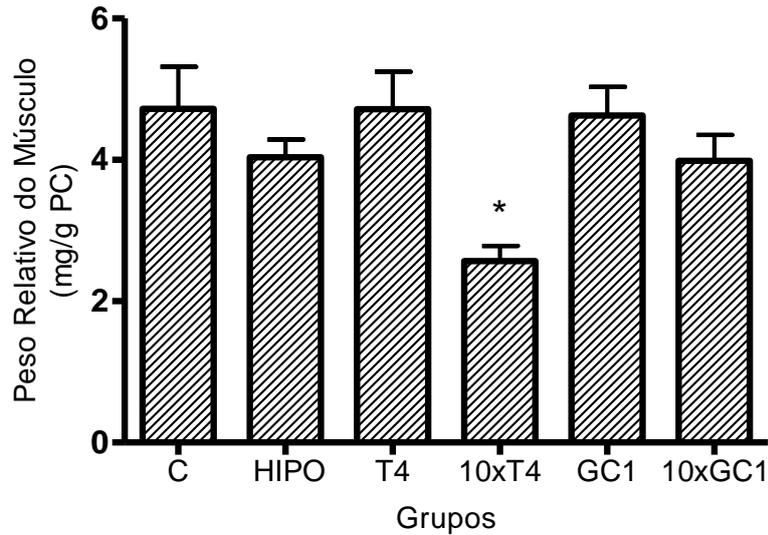


Figura 11. Peso relativo do músculo sóleo dos animais dos diferentes grupos. GC-1 não promove atrofia do músculo sóleo dos ratos tratados tanto com doses fisiológicas (GC-1) quanto elevadas (10xGC-1). ($n = 8$ ratos por grupo). Foram analisados os diâmetros dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo dos animais nos diferentes grupos. * diferença significativa do grupo 10xT4 em relação aos demais. $p \leq 0,05$ no teste de Newman-Keuls.

5 DISCUSSÃO

Com o crescimento e envelhecimento da população mundial observamos na última década, assim como nas projeções futuras, um aumento muito significativo da prevalência de obesidade e diabetes e, conseqüentemente, de suas comorbidades. A prevalência de obesidade na população mundial saltou de 6,4% em 1980 para 12% em 2008 (65) enquanto que a prevalência de diabetes na população adulta saltará dos 6,4% em 2010 para 7,7% em 2030 (65).

Entre as medidas farmacológicas destaca-se a busca pelo desenvolvimento de novos medicamentos que possam auxiliar no controle da obesidade e de suas conseqüências como a dislipidemia e diabetes. Uma opção terapêutica que vem sendo investigada é o desenvolvimento de agonistas seletivos para os receptores tireoidianos β . Propõe-se que esses ligantes podem auxiliar o controle da obesidade e da hipercolesterolemia sem os efeitos colaterais do hormônio tireoidiano no coração, osso e músculo esquelético (9-13).

Dentre estes compostos tem se destacado o GC-1, uma vez que estudos relacionados à sua utilização em animais com hipotireoidismo tem apresentado resultados consistentes no que tange diminuição do peso corporal, dos níveis de colesterol sem causar taquicardia e arritmia, osteoporose ou agressão do tecido esquelético de roedores (9-11).

Porém nenhum desses estudos avaliou o efeito de GC-1, ou mesmo de seu outro análogo, GC-24 sobre a tolerância ao esforço de ratos submetidos ao hipotireoidismo experimental. Uma vez que a prática de exercícios físicos tem sido recomendada como auxiliar ao tratamento da obesidade e doenças metabólicas, é de relevante importância saber se GC-1 causa diminuição na capacidade de tolerar esforço físico.

Portanto, com o objetivo principal de avaliarmos tal questão nós investigamos a influência do GC-1 sobre a capacidade de tolerar esforço físico em ratos hipotireóideos submetidos à sessão de natação.

Primeiramente, para comprovação do hipotireoidismo experimental foi utilizado o comportamento do T_3 , T_4 e TSH nos diferentes grupos. De acordo com o comportamento dos hormônios tireoidianos apresentados na figura 7 pode-se observar que o experimento induziu ao hipotireoidismo nos ratos, uma vez que, o grupo HIPO apresentou diminuição nos níveis de T_3 e T_4 e elevação significativa do

TSH. Considera-se alterações séricas deste último em organismo com função hipotálamo hipofisária intacta é o melhor indicador de alterações da produção tireoidiana. Os níveis de TSH são altos no hipotireoidismo e baixos no hipertireoidismo. Além disto, a reposição com T_4 tem como resposta a supressão do TSH (66).

Após o período de experimento, nossos resultados demonstraram que, ao contrário de T_4 , GC-1, tanto em dose 1x quanto em doses elevadas não modifica a tolerância ao esforço físico de ratos com hipotireoidismo.

A importância dos hormônios tireoidianos na tolerância ao exercício é conhecida há longa data, pois, tanto a deficiência ou excesso de hormônios tireoidianos estão relacionados a uma diminuição significativa na capacidade funcional do organismo humano (14,15).

Estudos da fisiologia do exercício demonstram que a capacidade do organismo em tolerar esforços físicos é o reflexo de uma ação integrada dos sistemas respiratório, cardiovascular e muscular. Portanto, distúrbios que prejudicam a função de um desses sistemas, como nos casos de hipo ou hipertireoidismo, diminuem a *performance* durante o exercício (46).

Em nosso estudo, quando submetemos ratos hipotireoideos ao exercício físico na natação, observamos uma significativa diminuição na tolerância ao esforço quando comparados aos ratos eutireoideos. Esse achado confirma resultados anteriores que também observaram menor tolerância ao exercício de natação em ratos com hipotireoidismo experimental (47). A importância da função tireoidiana para a bom desempenho físico pode estar associada a regulação da expressão gênica da α MHC e β MHC do miocárdio pelos HTs (14). Estudos prévios em roedores constataram que o hormônio tireoidiano aumenta a expressão da α MHC, e ao contrário, diminui a expressão da β MHC (67). No hipotireoidismo a diminuição da α MHC reduz a contratilidade cardíaca e o aumento do volume de ejeção necessária para o exercício físico (14). Portanto, o *downregulation* da α MHC (a miosina rápida com mais alta atividade da ATPase) concomitante ao *upregulation* da β MHC (miosina lenta com baixa atividade da ATPase) (68), explicam até certo ponto a diminuição da contratilidade cardíaca associada ao hipotireoidismo e conseqüentemente, a redução da tolerância à natação dos animais com hipotireoidismo.

Interessantemente, os animais tratados com GC-1 não tiveram sua tolerância ao esforço afetada em relação ao grupo C. A explicação para tal fato é que estudo realizado com camundongos com hipotireoidismo tratados com GC-1 levou a um efeito inotrópico positivo em relação a camundongos hipotireóides sem tratamento. Neste estudo os animais tratados com GC-1 não aumentaram a expressão α MHC, mas, houve uma menor diminuição do β MHC (69).

Além da influência direta sobre o funcionamento da bomba cardíaca, estudos realizados em animais e pacientes, também demonstraram que o hipotireoidismo está associado à diminuição do fluxo sanguíneo na musculatura esquelética durante o esforço físico (15,70).

Da mesma forma que os animais hipotireóides, os ratos mantidos com doses elevadas de T_4 ($10\times T_4$) mas não de GC-1, também apresentaram diminuição da tolerância ao esforço no protocolo de natação (Figura 1). Camundongos tratados com altas doses de GC-1 tiveram aumento da α MHC para níveis eutireóides (69) o que pode explicar a preservação da função de bomba cardíaca destes animais, levando-os a não diminuírem a tolerância ao esforço. Além disso, animais em estado de hipertireoidismo ($10\times T_4$) apresentam aumento do diâmetro dos cardiomiócitos e hipertrofia ventricular. A exposição prolongada a altas concentrações de hormônio tireoidiano traz como consequência um aumento da taxa de trabalho do miocárdio devido à sobrecarga de volume sanguíneo, com ineficiente utilização de energia pelo miocárdio. Assim, a hipertrofia do cardiomiócito não é acompanhada por aumento na eficiência de bomba do coração, pois simultaneamente pode ocorrer uma diminuição da reserva cardíaca, com diminuição à tolerância ao exercício físico (71).

Os mecanismos envolvidos nesta resposta hipertrófica ao hormônio tireoidiano e sua ausência em seu agonista seletivo do receptor β podem ser entendidos a partir das vias biológicas de sinalização. Evidências mostram que o hormônio tireoidiano induz produção proteica e atua sobre os processos de sinalização iniciados na membrana plasmática e no citoplasma (72).

A via de sinalização da hipertrofia cardíaca mais estudada trata-se da ativação de uma lipídeoquinase, a fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K). A PI3K recruta a AKT (também conhecida como proteína quinase B - PKB) para a membrana plasmática a qual promove a fosforilação do fator de crescimento tecidual, *mammalian target of Rapamycin* (mTOR). A mTOR atua aumentando a síntese

proteica e ativando outras proteínas quinases S6 (S6K1 e S6K2) as quais aumentam a produção de proteínas, biossíntese ribossomal, divisão celular e hipertrofia (67,73-76).

Por outro lado para que tal sinalização ocorra é necessária, primeiramente, a ligação do HT ao seu receptor no miocárdio. Como o miocárdio possui predominantemente receptor α , isto faz com que a ação do GC-1 sobre este órgão seja limitada. Assim, a ausência de alteração na morfometria dos cardiomiócitos nos grupos tratados com GC-1 e, por outro lado, a hipertrofia cardíaca apresentada pelo grupo 10xT4 pode ser explicada pela diferença de afinidade destas substâncias pela célula alvo.

Além do coração, a redução da tolerância ao exercício no hipertireoidismo, pode também estar relacionada a uma disfunção do músculo esquelético em função da redução da expressão das enzimas oxidativas e glicolíticas (76). Apesar de não termos avaliado a expressão genética ou o conteúdo protéico e bioquímico do músculo esquelético, em nosso estudo, os animais tratados com doses suprafisiológicas de T_4 , mas não GC-1, apresentaram atrofia do músculo sóleo. Sabe-se que estado de hipermetabolismo apresentado no hipertireoidismo tem com efeito direto na musculatura esquelética com perda de massa muscular e diminuição da proporção de fibras musculares do tipo I. Tais alterações levam os pacientes acometidos de tal disfunção à perda de força e resistência significativas para realização de trabalhos que exijam esforços (41).

Portanto, a ausência de efeitos adversos de GC-1 sobre o desempenho dos animais durante o exercício de natação, mesmo em doses elevadas, comprovam funcionalmente que o uso de GC-1 é seguro para o músculo cardíaco e esquelético. Estudos anteriores já demonstraram que doses elevadas de GC-1 aumenta o gasto energético sem causar danos teciduais e alteração no peso do coração (77). As explicações para a ausência de efeitos do GC-1 sobre o miocárdio e músculo esquelético se deve a predominância da expressão de TR α 1 nesses tecidos (1) assim como a distribuição farmacocinética de GC-1 que predomina em outros tecidos como fígado (69). Portanto, coletivamente, estes achados sugerem que GC-1 combinado com exercício pode ser seguro para tratamento de dislipidemias e obesidade.

Nosso estudo possui algumas limitações. Os ratos com hipotireoidismo experimental foram tratados somente durante oito semanas, não sabemos, portanto,

se o uso por um tempo mais prolongado de GC-1 poderá causar algum efeito sobre desempenho durante o exercício. Além disso, limitação quanto ao tipo de exercício que foi realizado no ambiente aquático, que apesar de termos seguido um protocolo que considera um período de adaptação dos animais, este não é seu meio natural de vida. Outros estudos, com utilização de diferentes modelos animais e de exercício físico, assim como o uso prolongado de GC-1 poderá esclarecer melhor essas questões.

6 SUMÁRIO DOS RESULTADOS

- ✓ GC-1 não altera a tolerância ao esforço de ratos wistar com hipotireoidismo;
- ✓ GC-1 não altera o diâmetro dos cardiomiócitos de ratos wistar com hipotireoidismo
- ✓ GC-1 não altera o peso relativo do músculo sóleo de ratos wistar com hipotireoidismo.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que GC-1, em dose 1x ou elevadas, não altera tolerância ao esforço físico, assim como não modifica o diâmetro dos cardiomiócitos. Portanto, sugere-se que o uso de GC-1 e talvez outros agonistas seletivos β tireoidianos possam ser utilizados conjuntamente com a prática regular de exercícios físicos, uma estratégia fundamental para o tratamento da obesidade e outras doenças metabólicas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sun ZQ, Ojamaa K, Coetzee WA, Artman M, Klein I. Effects of thyroid hormone on action potential and repolarizing currents in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 2000; 278:E302–E307.
2. Sjögren M1, Alkemade A, Mittag J, Nordström K, Katz A, Rozell B et.al. Hypermetabolism in mice caused by the central action of an unliganded thyroid hormone receptor alpha1. *EMBO Journal*. 2007; 26: 4535–4545.
3. Xing W, Govoni KE, Donahue LR, Kesavan C, Wergedal J, Long C, Bassett JH, Gogakos A, Wojcicka A, Williams GR, Mohan S: Genetic evidence that thyroid hormone is indispensable for prepubertal insulin-like growth factor-I expression and bone acquisition in mice. *J Bone Miner Res*. 2012; 27: 1067–1079.
4. Pramfalk C, Pedrelli M, Parini P. Role of thyroid receptor β in lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1812(8):929-37.
5. Barra GB, Velasco LFR, Pessanha RP, Campos AM, Moura FN, Dias SMG et.al. Mecanismo molecular da ação do hormônio tireoideano. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2004; 48(1):25-39.
6. Grover GJ, Mellström K, Malm J. Therapeutic potential for thyroid hormone receptor-beta selective agonists for treating obesity, hyperlipidemia and diabetes. *Curr Vasc Pharmacol*. 2007;5(2):141-54.
7. Baxter JD, Webb P. Thyroid hormone mimetics: potential applications in atherosclerosis, obesity and type 2 diabetes. *Nat Rev Drug Discov*. 2009; 8(4): 308-320.
8. Chiellini G, Apriletti JW, Yoshihara HA, Baxter JD, Ribeiro RC, Scanlan TS. A high, affinity subtype-selective agonist ligand for the thyroid hormone receptor. *Chem Biol*.1998;5(6):299-306.
9. Johansson L, Rudling M, Scanlan TS, Lundåsen T, Webb P, Baxter J et.al. Selective thyroid receptor modulation by GC-1 reduces serum lipids and stimulates steps of reverse cholesterol transport in euthyroid mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102(29):10297-302.
10. Freitas FR, Capelo LP, O'Shea PJ, Jorgetti V, Moriscot AS, Scanlan TS et.al. The thyroid hormone receptor beta-specific agonist GC-1 selectively affects the bone development of hypothyroid rats. *J Bone Miner Res*. 2005;20(2):294-304.

11. Villicev CM, Freitas FR, Aoki MS, Taffarel C, Scanlan TS, Moriscot AS et.al. Thyroid hormone receptor b-specific agonist GC-1 increases energy expenditure and prevents fat-mass accumulation in rats. *J Endocrinol.* 2007;193(1):21-9.
12. Miyabara EH, Aoki M.S., Soares A.G. Thyroid hormone receptor- β -selective agonist GC-24 spares skeletal muscle type I to II fiber shift. *Cell Tissue Res.* 2005; 321(2):233–41.
13. Grover GJ, Mellström K, Ye L, Malm J, Li YL, Bladh LG, et.al. Selective thyroid hormone receptor-beta activation: a strategy for reduction of weight, cholesterol, and lipoprotein (a) with reduced cardiovascular liability. *Proc Natl Acad Sci.* 2003; 100(17):10067-72.
14. Gonçalves A, Resende ES, Fernandes ML, Costa AM. Effect of thyroid hormones on cardiovascular and muscle systems and on exercise tolerance: a brief review. *Arq Bras Cardiol.* 2006;87(3):e45-7.
15. Kahaly GJ, Kampmann C, Mohr-Kahaly S. Cardiovascular hemodynamics and exercise tolerance in thyroid disease. *Thyroid.* 2002; 12(6):473-81.
16. Davis JP, Davis FB, Mousa SA, Luidens MK, Lin HY. Membrane receptor for thyroid hormone: physiologic and pharmacologic implications. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 2011; 51:99-115.
17. Abel ED, Ahima RS, Boers ME, Elmquist JK, Wondisford FE. Critical role for thyroid hormone receptor beta2 in the regulation of paraventricular thyrotropin-releasing hormone neurons. *J Clin Invest.* 2001;107:1017-23.
18. Jameson JL. Mechanisms of thyroid hormone action. In: DeGroot LJP, Jameson JL, editors. *Endocrinology.* 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001.p.1327-44.
19. Carvalho GA, Ramos HE. Thyroid hormone resistance syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2004;48:83-92.
20. Cheng SY. Thyroid hormone receptor mutations and disease: beyond thyroid hormone resistance. *Trends Endocrinol Metab.* 2005;16:176-82.
21. Lazar, M. A. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr. Rev.* 1993;14(2):184–193.
22. Abel ED, Moura EG, Ahima RS, Campos-Barros A, Pazos-Moura CC, Boers ME et al. Dominant inhibition of thyroid hormone action selectively in the pituitary of thyroid hormone receptor-beta null mice abolishes the regulation of thyrotropin by thyroid hormone. *Mol Endocrinol.* 2003; 17(9): 1767-76.

23. Forrest D, Hanebuth E, Smeyne RJ, Everds N, Stewart CL, Wehner JM et.al. Recessive resistance to thyroid hormone in mice lacking thyroid hormone receptor β : evidence for tissue-specific modulation of receptor function. *EMBO J*. 1996; 15:3006–3015
24. Wikstrom L, Johansson C, Salto C, Barlow C, Campo-Barros A, Baas F, et al. Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor α 1 *EMBO J* 1998; 17:455–461.
25. Schwartz HL, Strait KA, Ling NC, Oppenheimer JH. Quantitation of rat tissue thyroid hormone binding receptor isoforms by immunoprecipitation of nuclear triiodothyronine binding capacity. *J Biol Chem*. 1992; 267:11794–11799.
26. He H, Giordano FJ, Hilal-Dandan R, Choi D-J, Rockman HA, McDonough PM, et.al. Overexpression of the rat sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase gene in the heart of transgenic mice accelerates calcium transients and cardiac relaxation. *J Clin Invest*. 1997; 100:380–389.
27. Klein I and Ojamaa K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N Engl J Med* 2001; 344: 501–509.
28. Pantos C, Mourouzis I, Markakis K, Tzagoulis N, Panagiotou M, Cokkinos DV. Long-term thyroid hormone administration reshapes left ventricular chamber and improves cardiac function after myocardial infarction in rats. *Basic Res Cardiol*. 2008;103(4):308-18.
29. Kinugawa K, Yonekura K, Ribeiro RC, Eto Y, Aoyagi T, Baxter JD et al. Regulation of thyroid hormone receptor isoforms in physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 2001;28;89(7):591-8.
30. Ojamaa K, Kenessey A, Klein I. Thyroid hormone regulation of phospholamban phosphorylation in the rat heart. *Endocrinology*. 2000; 141(6):2139–2144.
31. Wehrens XH, Lehnart SE, Marks AR (2005) Intracellular calcium release and cardiac disease. *Annu Rev Physiol*. 2005; 67:69–98.
32. Kuzman JA, Thomas TA, Vogelsang KA, Said S, Anderson BE, Gerdes AM. Effects of induced hyperthyroidism in normal and cardiomyopathic hamsters. *J Appl Physiol*. 2005; 99(4):1428-33.
33. Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther*. 2010;128(1):191-227

34. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling – concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35(3):569-82.
35. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev.* 2011; 91:1447–531.
36. Adams GR, Haddad F, McCue SA, Bodell PW, Zeng M, Qin L, et al. Effects of spaceflight and thyroid deficiency on rat hindlimb development. II. Expression of MHC isoforms. *J Appl Physiol.* 2000; 88: 904–916.
37. Simonides WS, van Hardeveld C. Thyroid hormone as a determinant of metabolic and contractile phenotype of skeletal muscle. *Thyroid.* 2008; 18:205–16.
38. Vadászová A., Zachařová G., Macháčová K, Jirmanová I, Soukup T. Influence of thyroid status on the differentiation of slow and fast muscle phenotypes. *Physiol Res.* 2004;53 Suppl 1:S57-61.
39. Reuters VS, Teixeira, PFS, Castro, CLN, Almeida CP, Cardoso HR, Porciúncula IM. Disfunções músculo-esqueléticas em pacientes com hipotireoidismo subclínicos. *Acta Fisiátrica.* 2003; 10(1):7-11.
40. Reuters VS, Buescu A, Reis FAA, Almeida CP, Teixeira PFS; Antônio J. Leal Costa AJL et al. Avaliação clínica e da função muscular em pacientes com hipotireoidismo subclínico. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006;50(3):523-31
41. Santos KB, Paula KC, Barreto NDM, Cruz Filho RA, Figueiredo WC, Nóbrega ACL. Função muscular esquelética e composição corporal de pacientes com hipertireoidismo submetidos ao treinamento contra resistência. *Rev Bras Med Esporte* 2001;7:18-23.
42. Takashi Y, Mishima T, Sakamoto M, Sugiyama M, Matsunaga S, Wada M. Oxidation of myosin heavy chain and reduction in force production in hyperthyroid rat soleus. *J Appl Physiol.* 2006;100(5):1520-6.
43. Vadászová A, Hudecová S, Křiřanová O, Soukup T. Levels of myosin heavy chain mRNA transcripts and content of protein isoforms in the slow soleus muscle of 7-month-old rats with altered thyroid status. *Physiol Res.* 2006;55(2):221-5.
44. Bassett Jr DR, Howley ET. Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2000;32(1):70–84.
45. Bassett Jr DR, Howley ET. Maximal oxygen uptake: “classical” versus “contemporary” viewpoints. *Med. Sci. Sports Exerc.* 29:591–603, 1997.

46. Kahaly GJ. Cardiovascular and atherogenic aspects of subclinical hypothyroidism. *Thyroid*. n.10, p.665-79, 2000.
47. Casimiro-Lopes G, Alves SB, Salerno VP, Passos MC, Lisboa PC, Moura EG. Maximum acute exercise tolerance in hyperthyroid and hypothyroid rats subjected to forced swimming. *Horm Metab Res*.2008;40:276-80.
48. Vigário PS, Chachamovitz DSO, Teixeira PFS, Santos MA, Oliveira F. Impacto do hipotireoidismo subclínico na resposta cárdio-pulmonar em esforço e na recuperação. *Arq Bras Endocrinol Metab*. vol. 51, n. 9, p. 1485-92, 2007.
49. Mainenti MRM, Teixeira PFS, Oliveira FP, Vaisman M. Effect of hormone replacement on exercise cardiopulmonary reserve and recovery performance in subclinical hypothyroidism. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. n.43, p. 1095-1101,2010.
50. Gonçalves A, Fernandes MLMP, Lamounier RPMS, Costa AM, Resende ES. Efeito da L-tiroxina sódica na tolerância ao esforço em mulheres com hipotireoidismo subclínico. *Brasília Med* 48(1): 12-18, 2011.
51. Borngraeber S., Budny MJ, Chiellini G, Cunha-Lima ST, Togashi M, Webb P et.al. Ligand selectivity by seeking hydrophobicity in thyroid hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci*. 2003; 100(26): 15358–15363.
52. Berkenstam, A., Kristensen, J., Mellström, K. ,et al.The thyroid hormone mimetic compound KB2115 lowers plasma LDL cholesterol and stimulates bile acid synthesis without cardiac effects in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2008; 105(2), 663-667.
53. Baxter JD, Dillmann WH, West BL, Huber R, Furlow JD, Fletterick RJ et al. Selective modulation of thyroid hormone receptor action. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2001,76(1-5):31-42.
54. Bleicher L, Aparicio R, Nunes FM, Martinez L, Gomes Dias SM, Figueira AC et.al. Structural basis of GC-1 selectivity for thyroid hormone receptor isoforms. *BMC Struct Biol*. 2008; 31(8): 8.
55. Duntas LH. Thyroid disease and lipids. *Thyroid*. 2002;12(4):287–93
56. Rush J, Danzi S, Klein I. Role of thyroid disease in the development of statin-induced myopathy. *The Endocrinologist*. 2006;16:279–285.
57. Tancevski I, Demetz E, Eller P, Duwensee K, Hofer J, Heim C et al. The liver-selective thyromimetic T-0681 influences reverse cholesterol transport and atherosclerosis development in mice. *PLoS One*. 2010;5:e8722.

58. Baxter JD, Webb P, Grover G, Scanlan TS. Selective activation of thyroid hormone signaling pathways by GC-1: a new approach to controlling cholesterol and body weight. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2004;15, 4:154-57.
59. Grover, GJ. Effects of the Thyroid Hormone Receptor Agonist GC-1 on Metabolic Rate and Cholesterol in Rats and Primates: Selective Actions Relative to 3,5,3-Triiodo-L-Thyronine. *Endocrinology*. 2008;145(4):1656–1661.
60. Venditti P, Chiellini G, Di Stefano L, Napolitano G, Zucchi R, Columbano A, et al. The TR β -selective agonist, GC-1, stimulates mitochondrial oxidative processes to a lesser extent than triiodothyronine. *Journal of Endocrinology*. 2010; 205: 279–289.
61. Amorim, BS, Ueta CB, Freitas BC, Nassif RJ, Gouveia CH, Christoffolete MA et al. A TR β -selective agonist confers resistance to diet-induced obesity. *Journal of Endocrinology*. 2009. 203, 291-299.
62. Castillo M, Freitas BC, Rosene ML, Drigo RA, Grozovsky R, Maciel RM et al. Impaired metabolic effects of a thyroid hormone receptor beta-selective agonist in a mouse model of diet-induced obesity. *Thyroid*. 2010; 20(5): 545-53.
63. Lancha Júnior, A. H. Resistência ao exercício físico: efeito da suplementação nutricional de carnitina, aspartato e asparagina. [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo;1991.
64. Stevens GA, Singh GM, Lu Y, Danaei G, Lin JK, Finucane MM., et al. National, regional, and global trends in adult overweight and obesity prevalences. *Popul Health Metr*. 2012;10(1):22.
65. Shaw JE, Sicree RA; Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2010; 87(1): 4-14.
66. Graf H, Carvalho GA. Fatores interferentes na interpretação e dosagens laboratoriais no diagnóstico de hiper e hipotireoidismo. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002;46(1):51-64.
67. Ojamaa K. Signaling mechanisms in thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy. *Vascul Pharmacol*. 2010;52(3-4):113-9.
68. Wiersinga WM. The role of thyroid hormone nuclear receptors in the heart: evidence from pharmacological approaches. *Heart Fail Rev*. 2010;15(2):121-4.
69. Trost SU, Swanson E, Gloss B, Wang-Iverson DB, Zhang H, Volodarsky T et al. The thyroid hormone receptor- β -selective agonist GC-1 differentially affects plasma lipids and cardiac activity. *Endocrinology*. 2000 Sep;141(9):3057-64.

70. Xiang GD, Pu J, Sun H, Zhao L, Yue L, Hou J. Regular aerobic exercise training improves endothelium-dependent arterial dilation in patients with subclinical hypothyroidism. *Eur J Endocrinol.*2009;161(5): 755-61.
71. Weltman NY, Wang D, Redetzke RA., Gerdes AM. Longstanding hyperthyroidism is associated with normal or enhanced intrinsic cardiomyocyte function despite decline in global cardiac function. *Plos One.* 2012; 7(10):e46655.
72. Davis PJ, Davis FB. Nongenomic actions of thyroid hormone on the heart. *Thyroid.* 2002 Jun;12(6): 459-66.
73. DeBosch B, Treskov I, Lupu TS, Weinheimer C, Kovacs A, Courtois M et al. Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation.* 2006;113(17): 2097-104..
74. Walsh K. Akt signaling and growth of the heart. *Circulation.* 2006;113(117): 2032-34.
75. Dillmann W. Cardiac hypertrophy and thyroid hormone signaling. *Heart Fail Rev.* 2010;15(2):125-32.
76. Kahaly G, Hellermann J, Mohr-Kahaly S, Treese N. Impaired cardiopulmonary exercise capacity in patients with hyperthyroidism. *Chest.* 1996;109(1):57–61.
77. Venditti P, Chiellini G, Bari A, Di Stefano L, Zucchi R, Columbano A et.al. T3 and the thyroid hormone beta-receptor agonist GC-1 differentially affect metabolic capacity and oxidative damage in rat tissues. *J Exp Biol.* 2009;212(7):986-93

APÊNDICE A – PASSO A PASSO DA PREPARAÇÃO HISTOLÓGICA

Passo I: Inclusão do material em parafina

- Fixação do material em formol
- Corte do músculo cardíaco e colocar em K7
- Disposição do material em álcool 70% por 30 minutos
- Disposição do material em álcool 85% por 30 minutos
- Disposição do material em álcool 95% por 30 minutos
- Disposição do material em álcool absoluto I por 30 minutos
- Disposição do material em álcool absoluto II por 30 minutos
- Disposição do material em álcool absoluto III por 30 minutos
- Retirar o excesso de álcool em papel toalha
- Disposição em Xilol I por 30 minutos
- Disposição em Xilol II por 30 minutos
- Disposição em Xilol III por 30 minutos
- Retirar o excesso em papel toalha
- Parafina I
- Parafina II
- Parafina III
- Inclusão em bloco de parafina

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

Passo II: Hidratar (desparafinizar)

- Xilol III por 10 minutos
- Xilol II por 10 minutos
- Xilol I por 10 minutos
- Retirar o excesso em papel toalha
- Álcool absoluto III por 30 segundos
- Álcool absoluto II por 10 segundos
- Álcool absoluto I por 10 segundos
- Álcool 95% por 10 segundos
- Álcool 85% por 10 segundos
- Álcool 70% por 10 segundos

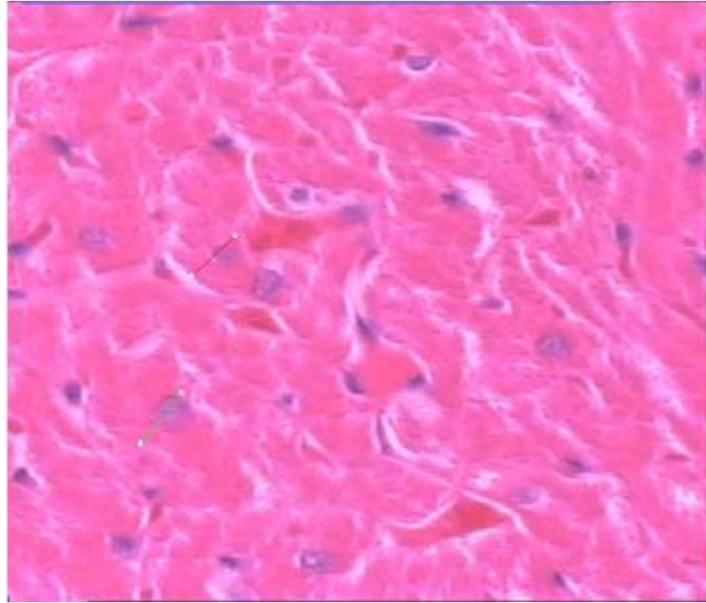
- Água corrente por 20 minutos
- Água destilada por 5 minutos
- Clorada com hematoxilina de Harris por 30 segundos
- Água corrente por 20 minutos
- Água destilada por 5 minutos
- Corado com eosin/floxina de 1 minutos, 30 segundos e 2 minutos
- Água corrente para retirar excesso de eosina
- Água destilada por 4 segundos

Passo III: Desidratar

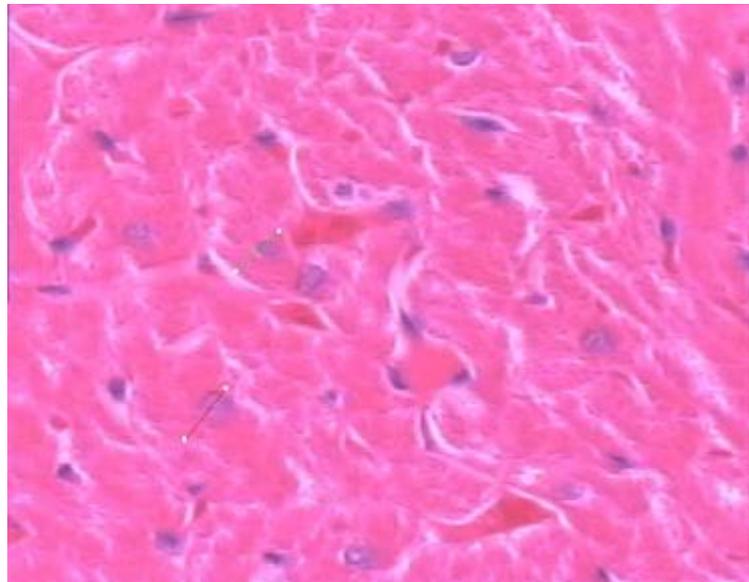
- Álcool 70% por 10 segundos
- Álcool 85% por 10 segundos
- Álcool 95% por 10 segundos
- Álcool absoluto I por 10 segundos
- Álcool absoluto II por 10 segundos
- Álcool absoluto III por 10 segundos
- Retirar o excesso de álcool em papel toalha
- Xilol I por 30 segundos
- Xilol II por 30 segundos
- Xilol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

**APÊNDICE B - AMOSTRAS DE IMAGENS HISTOLÓGICAS DOS
CARDIOMIÓCITOS DOS ANIMAIS DOS DIFERENTES GRUPOS**

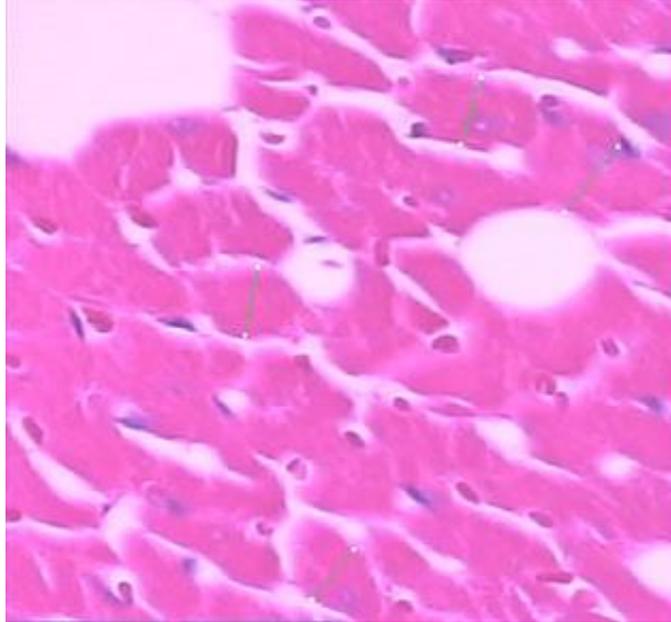
GRUPO CONTROLE



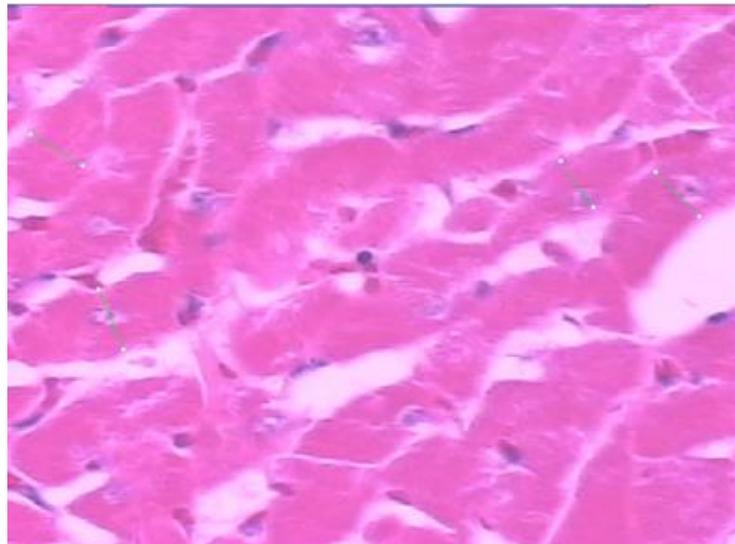
GRUPO HIPO



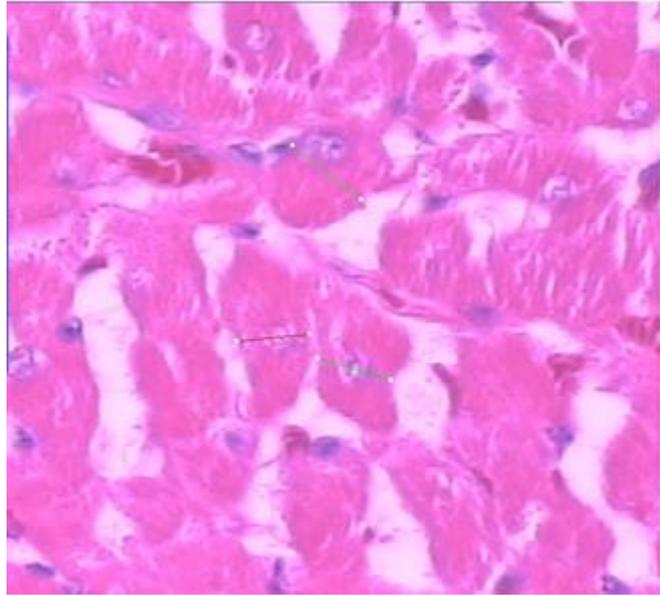
GRUPO T4



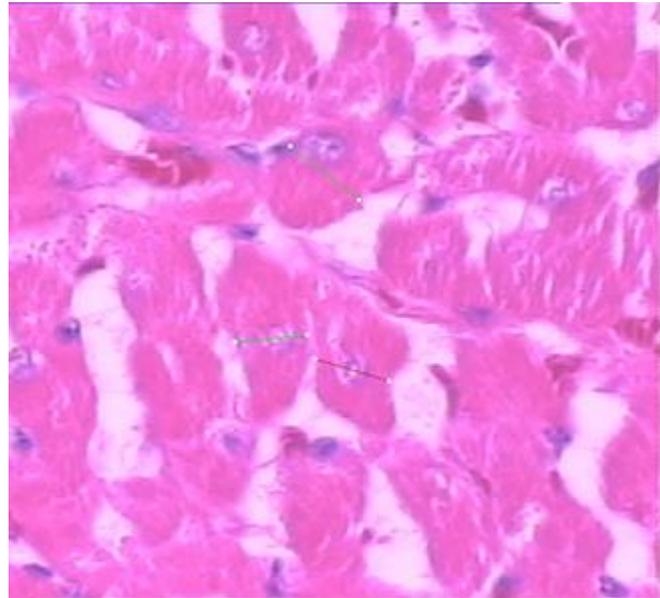
GRUPO 10XT4



GRUPO GC-1



GRUPO 10XGC-1



ANEXO A – DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO PROJETO NO CEUA/UNB

	Universidade de Brasília Instituto de Ciências Biológicas Comitê de Ética no Uso Animal
Brasília, 12 de setembro de 2011.	
	DECLARAÇÃO
Declaramos que o projeto intitulado "EFEITO DO AGONISTA SELETIVO DO RECEPTOR β1 TIREOIDIANO (GC-1) SOBRE PERFIL LIPÍDICO, FUNÇÃO CARDÍACA, MUSCULATURA ESQUELÉTICA E TOLERÂNCIA AO ESFORÇO DE RATOS WISTAR HIPOTIREÓIDES." , UnBDOC n.º 119158/2010, sob responsabilidade do Prof. Francisco de Assis Rocha Neves, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.	
	 Prof. Aline Pio-Taylor Coordenadora do CEUA