

Camila Bonomo

**RESISTÊNCIA À INSULINA, HORMÔNIOS TIREOIDIANOS E
EXPRESSÃO PROTÉICA DE GLUT4 EM MÚSCULOS
ESQUELÉTICOS DE RATOS COM INSUFICIÊNCIA CARDÍACA**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica, da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, para obtenção de título de mestre em Fisiopatologia em Clínica Médica – Ciências da Saúde.

Orientador: Profa. Adj. *Marina Politi Okoshi*

Botucatu
2011

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação - Campus De Botucatu - UNESP
Bibliotecária responsável: *Sulamita Selma Clemente Colnago* – CRB 8/4716

Bonomo, Camila.

Resistência à insulina, hormônios tireoidianos e expressão protéica de glut4 no músculo esquelético de ratos com insuficiência cardíaca / Camila Bonomo. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientadora: Marina Politi Okoshi

CAPES: 40101100

1. Insuficiência cardíaca. 2. Músculos - Efeito das drogas.

Palavras-chave: GLUT4; Hormônios tireoidianos; Insuficiência cardíaca; Músculo esquelético; Resistência à insulina

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus
pais VICENTE e ROSÂNGELA, ao meu
irmão RAPHAEL e ao meu noivo
LEONARDO

AGRADECIMENTOS

À FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP) pelo apoio financeiro (processo nº 2009/13564-4).

AGRADECIMENTOS À FAPESP (processo nº 200858655-4), ao CNPQ (processo nº 304998/2009-5) e à FUNDUNESP (00222/10-DFP).

À Profa. Dra. MARINA POLITI OKOSHI, pela competência na orientação, dedicação, otimismo e bom humor, qualidades que tornaram mais fácil a realização do trabalho. Obrigada pelo respeito e confiança!

Ao Prof. Dr. LEONARDO ANTÔNIO MAMEDE ZORNOFF, pela realização da cirurgia dos animais, pela paciência e disponibilidade.

Ao Prof. Dr. ANTÔNIO CARLOS CICOGNA, pela disponibilidade e paciência com que sempre ouviu minhas dúvidas.

Ao Prof. Dr. KATASHI OKOSHI, pela avaliação ecocardiográfica dos animais e pelo auxílio em várias etapas deste trabalho.

Aos Professores Dr. LEONARDO ANTÔNIO MAMEDE ZORNOFF e Dr. MARCOS MINICUCCI, pelas valiosas sugestões proferidas no exame de qualificação.

Aos funcionários do Laboratório Experimental da Clínica Médica, JOSÉ CARLOS GEORGETE, ANTÔNIO CARLOS DE LALLA, CAMILA RENATA CAMACHO, CORINA JULIETA CORRÊA, ELENIZE JAMAS PEREIRA, JOSÉ APARECIDO DE SOUZA, MÁRIO BAPTISTA BRUNO, ROGÉRIO MONTEIRO, SUELI CLARA, VÍTOR MARCOS SOUZA, pela boa convivência e auxílio na realização do trabalho.

Às funcionárias MÁRCIA REGINA DA SILVA, ANDRÉA CRISTINA DE MELO PINTO e VERA APARECIDA LELIS, pelo cuidado com que mantêm o laboratório sempre limpo e arrumado.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica, ANA MARIA MENGUE, ALEXANDRE LUIS LOUREIRO, BRUNO JOSÉ FAJIOLLI, ELISÂNGELA APARECIDA DA SILVA, LAURA ANDRADE CÂMARA, MÁRIO AUGUSTO DALLAQUA, RENATO BORGES PEREIRA, pela disponibilidade e atenção com que sempre me ajudaram.

Aos FUNCIONÁRIOS DA SEÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO, pela eficiência em resolver os problemas.

Às minhas amigas LAURA, LARISSA, CIBELE e CAROL pela amizade e companheirismo conquistado desde o aprimoramento.

Aos meus amigos MARCELO, DANIELE, ALINE e RICARDO pela amizade sólida que conquistamos nesses anos de convivência, pelo trabalho em equipe e pelo grande auxílio neste trabalho.

À PAULA FELIPPE MARTINEZ, pelo imenso auxílio neste trabalho, por estar sempre pronta para me ensinar e me ouvir, pela paciência, empenho e dedicação.

Ao SILVIO por estar sempre disposto a me auxiliar na estatística deste trabalho e por sempre me ajudar nas dúvidas.

Aos amigos do laboratório, FERNANDA, MARIA TERESA, MIRIANE, REGIANE, PRISCILA, BRUNA, DANIELLE, ADRIANA, PAULINHA, CARLOS, RODRIGO, CAMILA GIMENEZ, CAMILA ROSA, DIJON, ANDRÉ LEOPOLDO, ANA PAULA, ANDRÉ NASCIMENTO e RENATA.

Aos meus pais, VICENTE e ROSÂNGELA, pelo incentivo, apoio e confiança que sempre depositaram em mim em todas as minhas escolhas, e ao meu irmão RAPHAEL pelo companheirismo e amizade.

Aos meus padrinhos ROSE e GILMAR a quem tenho como pais e que sempre torceram por mim e estão presentes em todas as minhas conquistas.

Às minhas avós DULCE, BENEDICTA e ROSA, pela educação e carinho, o meu respeito e admiração.

À avó CIDA (*in memoriam*) e ao avô LEONARDO, por me aceitarem em sua família de braços abertos, a vocês meu eterno carinho.

À DEUS, por sempre me mostrar o caminho certo e abençoar minha vida!

Ao meu noivo LEONARDO, pela paciência e apoio nos momentos difíceis, por me deixar fazer parte de sua vida e por tornar meus dias mais fáceis e alegres.

SUMÁRIO

Resumo	iv
Introdução	1
Objetivos	6
Material e Métodos	8
Resultados	16
Discussão	28
Referências Bibliográficas	34

RESUMO

A insuficiência cardíaca caracteriza-se por redução da tolerância aos exercícios físicos devida à ocorrência precoce de fadiga e dispnéia. Nas últimas duas décadas, foi sugerido que anormalidades intrínsecas da musculatura esquelética periférica colaboram para a ocorrência dos sintomas. De fato, diversas alterações morfológicas, metabólicas e funcionais têm sido descritas em músculos esqueléticos, cujos mecanismos responsáveis não estão completamente esclarecidos. Como a insuficiência cardíaca é associada a resistência à insulina, foi proposto que essa anormalidade possa ter papel na alteração do metabolismo energético muscular. Recentemente, foi verificado que os níveis da proteína transportadora de glicose sensível à insulina GLUT4 encontram-se reduzidos no músculo esquelético de pacientes com insuficiência cardíaca e sem diabetes mellitus. A regulação da expressão do GLUT4 é influenciada pelas concentrações séricas dos hormônios tireoidianos que, frequentemente, estão reduzidas na insuficiência cardíaca. Não encontramos estudos relacionando a resistência à insulina e a expressão protéica do GLUT4 em músculos esqueléticos com concentrações séricas dos hormônios tireoidianos durante a insuficiência cardíaca. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar o grau de resistência à insulina e a expressão protéica do GLUT4 em músculos esqueléticos de ratos com insuficiência cardíaca e verificar se há associação entre essas variáveis e as concentrações séricas dos hormônios tireoidianos. Em ratos Wistar, insuficiência cardíaca foi induzida por infarto do miocárdio (grupo IM). Ratos submetidos a cirurgia sem ligação da artéria coronária constituíram o grupo Sham. Seis meses após a cirurgia, disfunção ventricular foi caracterizada por estudo ecocardiográfico e insuficiência cardíaca por dados patológicos obtidos durante a eutanásia. Uma semana antes do término do período experimental, foi realizado o teste de tolerância à insulina e, quatro dias após, o teste de tolerância à glicose. No momento do sacrifício, foi coletado sangue para a mensuração da glicemia, por técnica colorimétrica, e da concentração sérica de insulina, dos hormônios tireoidianos T₃ total e T₄ livre e do TSH por ELISA. A expressão protéica de GLUT4 foi determinada nos músculos esqueléticos sóleo e gastrocnêmio por Western blot. Análises estatísticas: teste t ou Mann Whitney e correlação de Pearson; nível de significância considerado de 5%. A avaliação ecocardiográfica mostrou que o

grupo IM apresentou dilatação das câmaras cardíacas esquerdas acompanhada de disfunção sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo em comparação ao Sham. A área sob a curva glicêmica corrigida pela glicemia basal e a área sob a curva glicêmica durante o teste de tolerância à insulina não diferiram entre os grupos. A glicemia e a concentração sérica de insulina foram maiores no grupo IM [glicemia: Sham 110,0 (105,5 - 120,5); IM 137,0 (132,0 - 155,5) mg/dL; $p = 0,007$; insulina: Sham $1,55 \pm 0,706$; IM $3,348 \pm 1,987$ ng/mL; $p = 0,03$]. Houve tendência para a relação entre concentração sérica de insulina e glicemia de jejum ser maior no grupo IM (Sham $0,043 \pm 0,016$; IM $0,074 \pm 0,043$ nmol/L; $p = 0,077$). Não encontramos diferenças significantes na expressão protéica de GLUT4 nos dois músculos analisados ou nas concentrações séricas de hormônios tireoidianos entre os grupos experimentais. No grupo IM, observamos correlação positiva entre a concentração sérica de T_3 e a expressão protéica de GLUT4 no músculo sóleo ($r = 0,950$; $p < 0,001$) e tendência para correlação positiva entre a concentração sérica de T_4 e a expressão de GLUT4 no sóleo ($r = 0,689$; $p = 0,059$). Em conclusão, ratos com insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio apresentam elevação da glicemia de jejum e da concentração sérica de insulina, com tendência para aumento da resistência à insulina. Apesar da concentração sérica de hormônios tireoidianos e da expressão protéica muscular de GLUT4 estarem preservadas, existe correlação positiva entre concentração sérica T_3 e expressão protéica de GLUT4 no músculo sóleo, sugerindo que o hormônio tireoidiano T_3 possa estar envolvido na regulação do GLUT4 e na resistência à insulina associada à insuficiência cardíaca.

INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca crônica constitui importante problema de saúde pública devida à sua grande prevalência e elevada morbimortalidade^{1,2}. Estatísticas dos Estados Unidos e da Europa mostram que a incidência média de insuficiência cardíaca é de um a cinco casos por mil habitantes por ano, dependendo da população analisada^{2,3}. De acordo com dados americanos, recentemente publicados, a prevalência da insuficiência cardíaca aumenta, de cerca de 0,2% da população na faixa etária de 20 a 39 anos, para aproximadamente 14 % dos idosos com mais de 80 anos².

A insuficiência cardíaca crônica caracteriza-se por redução da tolerância aos exercícios físicos com ocorrência precoce de fadiga e dispnéia. Embora os mecanismos responsáveis por esses sintomas venham sendo estudados nas últimas décadas, sua fisiopatogenia ainda não está completamente esclarecida⁴. Inicialmente, considerava-se que a redução da capacidade para exercícios e a ocorrência prematura de sintomas fossem causadas por diminuição da capacidade funcional do coração com conseqüente congestão pulmonar e redução da perfusão e oxigenação tecidual. Posteriormente, foi observado que há pobre correlação entre variáveis hemodinâmicas ou de função ventricular obtidas em repouso e tolerância ao exercício, tanto em humanos como em animais com insuficiência cardíaca⁵.

Como não foi confirmada a suposição inicial que a capacidade para exercícios fosse diretamente relacionada ao grau de disfunção ventricular, foi levantada a hipótese que alterações primárias da musculatura esquelética periférica pudessem ter papel na tolerância reduzida aos exercícios físicos⁵⁻⁸. De fato, a partir de 1990, diversas anormalidades passaram a ser descritas em músculos esqueléticos de pacientes ou animais com insuficiência cardíaca crônica. Entre as alterações relatadas encontram-se atrofia da musculatura esquelética⁹⁻¹³, alteração da densidade capilar¹⁴, anormalidades da matriz extracelular^{15,16}, perda de mitocôndrias e modificações no padrão das fibras musculares esqueléticas¹⁷⁻²⁰. Além das alterações morfológicas e bioquímicas, também foram observadas importantes anormalidades metabólicas como redução da atividade das enzimas oxidativas, decréscimo do conteúdo muscular de fosfatos de alta energia e da razão NAD/NADH, alterações da função mitocondrial e do sistema de

transferência de energia, e redução da capacidade oxidativa de músculos lentos e rápidos²¹⁻²⁸. Em humanos, as alterações metabólicas musculares foram significativamente correlacionadas à redução da tolerância aos exercícios físicos²⁹. Como foi observada depleção anormal de fosfocreatina e acidose na ausência de alterações do fluxo sanguíneo para o músculo esquelético, durante exercício físico, pôde-se concluir que as anormalidades metabólicas musculares na insuficiência cardíaca são intrínsecas e não decorrentes apenas de má perfusão tecidual³⁰.

O conjunto das alterações musculares que ocorrem em doentes com falência cardíaca crônica foi denominado miopatia associada à insuficiência cardíaca. Embora seu mecanismo fisiopatológico seja ainda desconhecido, alguns fatores têm sido responsabilizados pelo desenvolvimento da miopatia como inatividade física, anormalidades neuroendócrinas e ativação inflamatória³¹⁻³⁸.

Mais recentemente, foi aventado que resistência à insulina possa ter papel na alteração do metabolismo energético muscular durante a insuficiência cardíaca^{39,40}. Desde a década passada, vem sendo descrito que a insuficiência cardíaca é caracterizada por estado de resistência à insulina^{39,41,42}. Além disso, foi verificado que a resistência à insulina constitui preditor independente de sobrevida e está associada com a capacidade funcional dos músculos esqueléticos e com variáveis que refletem a severidade da doença como consumo de oxigênio, teste de caminhada de seis minutos e classe funcional da insuficiência cardíaca^{42,43}. A resistência à insulina, ao reduzir a disponibilidade de glicose para as células musculares esqueléticas, pode ter papel na diminuição da capacidade funcional muscular em pacientes com insuficiência cardíaca.

Os mecanismos responsáveis pelo aumento da resistência à insulina na insuficiência cardíaca ainda não são conhecidos. Diversos mecanismos têm sido propostos como redução da massa muscular e do fluxo sanguíneo muscular, hiperatividade simpática, ativação inflamatória, alteração das concentrações séricas de adiponectina e leptina, e disfunção endotelial⁴².

Em condições fisiológicas, o músculo esquelético é o sistema que utiliza a maior quantidade de glicose do organismo e a proteína transportadora de glicose sensível à insulina GLUT4 constitui o principal sistema de transporte

para a captação celular de glicose⁴⁴. Após interação da insulina com seu receptor na membrana celular, ocorre ativação de cascata de sinalização intracelular que leva à fosforilação de vários substratos incluindo o substrato do receptor da insulina (IRS), a fosfatidilinositol 3-quinase, e a proteína quinase B. O resultado final de eventos é a translocação de vesículas contendo GLUT4 para a membrana celular permitindo, assim, o influxo de glicose para dentro da célula. O transporte de glicose para as células musculares é dependente da concentração de GLUT4 na superfície celular^{45,46}.

Recentemente, foi observado que os níveis de GLUT4 encontram-se reduzidos no músculo esquelético de pacientes com insuficiência cardíaca e sem diabetes mellitus e a magnitude de sua redução é proporcional à severidade da insuficiência cardíaca⁴⁰. Também no miocárdio, a captação de glicose e a expressão protéica do GLUT4 encontram-se diminuídas durante a insuficiência cardíaca⁴⁷. Embora em diabetes experimental e em pacientes com diabetes tipo 2, a redução do GLUT4 pareça ser responsável pelo desenvolvimento de resistência à insulina⁴⁸, o significado da diminuição do GLUT4 na insuficiência cardíaca ainda não está definido. Também não são conhecidos os fatores envolvidos na redução do GLUT4 na insuficiência cardíaca.

Em condições normais, a expressão do GLUT4 nos músculos esqueléticos é regulada, principalmente, por três fatores: concentração sérica de hormônios tireoidianos, níveis celulares de AMPc, e grau de atividade contrátil do músculo⁴⁴. Como redução da atividade física é comumente observada na insuficiência cardíaca, é possível que a inatividade tenha papel importante na expressão do GLUT4 na musculatura esquelética. Na insuficiência cardíaca, outro fator que pode estar envolvido na expressão do GLUT4 na insuficiência cardíaca é a concentração sérica dos hormônios tireoidianos.

Em doenças agudas ou crônicas como sepse e inanição, ocorrem alterações primárias na concentração sérica do hormônio tireoidiano triiodotironina (T_3) caracterizadas por redução de seus valores e relacionadas a modificações em seu metabolismo⁴⁹. Também na insuficiência cardíaca, foi observada alteração nas concentrações séricas de T_3 . Em estudos populacionais, foi verificado que pacientes com doença cardíaca frequentemente apresentam

diminuição da concentração sérica de T_3 e que esse hormônio parece ser importante marcador de gravidade da doença^{50,51}. O grau de redução da concentração de T_3 é proporcional à severidade da falência cardíaca e os valores de T_3 são inversamente proporcionais à mortalidade cardiovascular ou geral^{50,51}.

Não encontramos na literatura estudos relacionando a resistência à insulina e a expressão protéica do GLUT4 em músculos esqueléticos com os níveis séricos dos hormônios tireoidianos durante a insuficiência cardíaca crônica. Neste trabalho, levantamos a hipótese que, na insuficiência cardíaca, a resistência à insulina e a expressão protéica do GLUT4 estão associadas à concentração sérica de hormônios tireoidianos, particularmente o T_3 .

OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi determinar marcadores de resistência à insulina e a expressão protéica do GLUT4 em músculos esqueléticos periféricos de ratos com insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio e verificar se há associação entre essas variáveis e as concentrações séricas dos hormônios tireoidianos.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório Experimental do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. O protocolo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, sob protocolo número FMB-PE-25/2009.

Ratos Wistar machos, com dois meses de idade e peso corporal entre 200 e 250 g, provenientes do Biotério Central do Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, UNESP, foram mantidos em gaiolas coletivas, com quatro ratos por caixa, em ambiente com temperatura controlada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) e com ciclos de luminosidade de 12 h. Os ratos foram alimentados com ração comercial Purina e água *ad libitum*.

Indução de infarto do miocárdio

O infarto do miocárdio (IM) foi induzido de acordo com o método previamente descrito em nosso laboratório^{12,13}. Em resumo, os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (60 mg/kg) e submetidos a toracotomia lateral esquerda. Após exteriorização do coração, o átrio esquerdo foi afastado e a artéria coronária esquerda ligada com fio mono-nylon 5.0 entre a saída da artéria pulmonar e o átrio esquerdo. A seguir, o coração foi recolocado no tórax, os pulmões inflados com pressão positiva e o tórax fechado por sutura com fio de algodão 10. Os animais pertencentes ao grupo controle (Sham) foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém sem a ligação da artéria coronária. Cinquenta ratos foram submetidos ao infarto do miocárdio e 10 à cirurgia simulada. Entre os animais infartados, 20 sobreviveram até o final do período experimental; no grupo Sham, oito ratos sobreviveram até o final do estudo.

Ao final do período experimental, de seis meses, os animais foram submetidos a ecocardiograma transtorácico e eutanasiados dois dias após. Insuficiência cardíaca foi patologicamente caracterizada, no momento da eutanásia, pela presença de hipertrofia ventricular direita (relação peso do ventrículo direito/peso corporal maior que 0,8 mg/g)⁵²⁻⁵⁴ e congestão pulmonar (peso dos pulmões, em valores absoluto ou normalizados pelo peso corporal,

maior que dois desvios padrão acima da média do grupo Sham)⁵⁵. Os ratos com infarto do miocárdio que não tiveram hipertrofia ventricular direita e congestão pulmonar foram excluídos do presente estudo.

Teste de tolerância à insulina (ITT)

Uma semana antes do final do período experimental, foi realizado o teste de tolerância à insulina. As coletas sanguíneas foram realizadas na cauda, após os animais serem submetidos a período de jejum de 6 horas. A coleta de sangue foi realizada na condição basal e após administração intraperitoneal de insulina regular (Novolin R, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) em dose equivalente a 1,5 UI/kg. Amostras de sangue foram coletadas nos momentos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. O glicosímetro ACCU-CHEK GO KIT (Roche Diagnostic Brazil Ltda) foi utilizado para mensuração da concentração sanguínea de glicose. Para avaliação do perfil glicêmico durante o teste, foi calculada a área sob a curva glicêmica para ambos os grupos.

Teste de tolerância à glicose (GTT)

Quatro dias após a realização do teste de tolerância à insulina, foi realizado o teste de tolerância à glicose. Após jejum de 12 horas, foi administrada por via intraperitoneal solução de glicose a 25% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), em dose equivalente a 2,0 g/kg. Amostras de sangue foram coletadas na cauda nos momentos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos para avaliação da glicemia em glicosímetro. Da mesma forma como no ITT, foi calculada a área sob a curva glicêmica para ambos os grupos.

Avaliação Estrutural e Funcional do Coração por Ecocardiograma

A avaliação das estruturas cardíacas e da função do ventrículo esquerdo (VE) foi realizada por ecocardiograma transtorácico utilizando equipamento da Philips (HDI 5000) dotado de transdutor eletrônico

multifrequencial operando em 12 MHz. Os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilidino (1,0 mg/kg), por via intraperitoneal. Após tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo para realização do exame. As variáveis foram obtidas de acordo com a metodologia previamente descrita em nosso laboratório⁵⁶⁻⁵⁸. Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas manualmente, em cinco ciclos cardíacos consecutivos, de acordo com as recomendações da American Society of Echocardiography⁵⁹, validadas no modelo de ratos infartados⁶⁰. O diâmetro diastólico do VE (DDVE) e a espessura diastólica da parede posterior (EDPP) e do septo interventricular (EDSIV) foram mensurados no momento do ciclo cardíaco correspondente ao diâmetro máximo da cavidade. O diâmetro sistólico do VE (DSVE) foi obtido no momento em que a cavidade apresentava o diâmetro mínimo. Foram mensurados também os diâmetros do átrio esquerdo (AE) e da aorta (AO). As medidas diastólica e sistólica da área da cavidade do VE foram avaliadas por planimetria, nas mesmas imagens bidimensionais utilizadas para aquisição das imagens em modo monodimensional para medir os diâmetros do VE. A função sistólica do VE foi avaliada pela porcentagem de encurtamento endocárdico ($\% \Delta D = (DDVE - DSVE) / DDVE \times 100$), velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP) e porcentagem de variação da área da cavidade ($\% \Delta A$). O fluxo diastólico transmitral foi obtido com o transdutor posicionado no corte apical quatro câmaras, permitindo as medidas da onda E (E), onda A (A) e do tempo de desaceleração da onda E (TDE). O tempo entre o final da ejeção do VE e o início do enchimento diastólico ventricular, correspondente ao tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), foi também mensurado. A frequência cardíaca (FC) foi calculada pelo intervalo de tempo entre dois batimentos consecutivos.

Eutanásia e Coleta de Tecidos para Análise

Dois dias após a realização do ecocardiograma, os animais foram colocados em jejum por período de 12 horas, pesados, anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/kg) e eutanasiados por decapitação. Após coleta do

sangue, o coração foi retirado por toracotomia mediana. Os átrios e os ventrículos direito (VD) e esquerdo, incluindo o septo, foram dissecados e pesados separadamente. O sangue foi centrifugado a 25°C por 5 minutos a 5000 rpm; amostras do soro foram separadas e armazenadas a -80°C para dosagens bioquímicas. A seguir, o tecido epitelial dos membros pélvicos direito e esquerdo foram removidos e os músculos gastrocnêmio e sóleo foram dissecados. Imediatamente após, os músculos foram pesados e separados em amostras que foram congeladas em nitrogênio líquido e conservadas a -80°C.

Para avaliar o grau de edema nos tecidos, foram coletados os pulmões e fragmentos do fígado, ventrículos direito, esquerdo e átrios, e calculadas as relações peso úmido/peso seco de cada órgão.

Análise Histológica do Coração

Amostras anelares do VE foram fixadas em solução de formol a 10% por 24 horas. A seguir, foram lavadas em água corrente por 24 h e transferidas para solução com etanol 70%. Para cálculo do tamanho do infarto, foi realizado corte do VE na distância de 5 a 6 mm do ápice. Os valores obtidos nesta região correspondem à média dos valores obtidos em cortes de todo o coração⁶¹. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina e examinados em microscópio Leica DM LS acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a computador dotado de programa analisador de imagem (Image Pro-plus, Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). O tamanho do infarto, expresso em porcentagem do VE, foi determinado pela razão entre a soma dos comprimentos epicárdico e endocárdico do segmento infartado e a soma das circunferências epicárdica e endocárdica totais^{62,63}.

Dosagem de insulina e glicemia

A concentração sérica de insulina foi determinada utilizando kits específicos ELISA (Rat/Mouse Insulin Assay EZRMI-13K, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), de acordo com as especificações do fabricante. A leitura foi

realizada com auxílio de leitor de micro placa (Spectra MAX 190, Molecular Devics, Sunnyvale, CA, USA). Na mesma amostra do soro, foi mensurada a glicemia por técnica enzimática colorimétrica, utilizando kit glicose mono reagente (Bioclin[®]). A dosagem foi realizada no Laboratório Clínico da Faculdade de Medicina Veterinária do Campus de Botucatu, UNESP. Para analisar o grau de resistência à insulina, foi avaliada a relação entre a concentração sérica de insulina e a glicemia de jejum⁶⁴.

Análise da expressão protéica de GLUT4

A expressão protéica de GLUT4 nos músculos sóleo e gastrocnêmio (porção superficial) foi realizada pela técnica Western blot seguindo as seguintes etapas: extração tecidual de proteínas, eletroforese em gel, transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose, identificação das proteínas por anticorpos específicos e quantificação das bandas por densitometria. A expressão protéica do GLUT4 foi normalizada pela expressão da proteína constitucional β -actina, no músculo sóleo, e pela expressão da proteína GAPDH, no gastrocnêmio.

Inicialmente, fragmentos musculares (80-100 mg) foram homogeneizados com 800 μ L de tampão de extração contendo NaCl 150 mM, 1,0% TritonX-100, 0,5% desoxicolato de sódio, 0,1 % SDS, Tris 50 mM (ph 8,0), ortovanadato de sódio 1 mM, NaF 10 mM e inibidores de proteases (P2714, Sigma-Aldrich). A seguir, o homogenato foi centrifugado por 20 min, a 12000 rpm a 4° C, para eliminação de material insolúvel. O sobrenadante foi coletado e separado em alíquotas, que foram armazenadas a -80° C. Uma das alíquotas foi utilizada para quantificação de proteína pelo método de Bradford. Para a proteína alvo, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % a 4° C (30 min a 50 V e 2 h a 120 V), com 50 μ g de proteína. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em sistema de transferência úmida por 90 min a 120 V, 4° C. A seguir, a membrana foi incubada em solução de leite desnatado 5 % em temperatura ambiente por 2 h para prevenir ligações inespecíficas com os anticorpos primário e secundário. Posteriormente, a membrana foi lavada com TBST (tampão contendo Tris, NaCl e Tween 20) e

incubada durante a noite, a 4° C, com anticorpo primário específico para a proteína GLUT4 mouse monoclonal IgG₁ (IF8, SC-53566, diluição 1:400, Santa Cruz Biotechnology). No dia subsequente, a membrana foi lavada com TBST e incubada à temperatura ambiente por 90 min com anticorpo secundário (conjugado a peroxidase) adequado para ligação com o anticorpo primário, de acordo com recomendação do fabricante. A seguir, a membrana foi incubada com Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce Protein Research Products, Rockford, USA) para detecção do anticorpo ligado à membrana e foi obtida a auto-radiografia. Após obtenção do filme com as bandas referentes à proteína alvo, a membrana foi incubada com Restore Western Blot Stripping Buffer (Pierce Protein Research Products, Rockford, USA) para remoção dos anticorpos ligados à membrana. A seguir, foi realizado novamente o processo de bloqueio e a membrana foi incubada durante a noite, a 4° C, com anticorpo primário para as proteínas constitutivas β-actina mouse IgG₁ (ACTBD11B7, sc-81178, diluição 1:1000, Santa Cruz Biotechnology) ou GAPDH (6C5, sc-32233, diluição 1:10.000, Santa Cruz Biotechnology). O procedimento foi realizado da mesma forma como descrito anteriormente até a detecção do sinal e obtenção da auto-radiografia. Os filmes foram, então, escaneados e as bandas quantificadas por densitometria utilizando-se *software* específico. Na Figura 2, observam-se bandas representativas para a proteína alvo (GLUT4) e para as proteínas constitutivas, β-actina e GAPDH.

Dosagens hormonais

As dosagens de hormônio estimulante da tireóide (TSH), T₃ total e tiroxina (T₄) livre foram obtidas por quimioluminescência, realizadas pela empresa Vidavet Laboratório de Análises Veterinárias Ltda (Botucatu, SP, Brasil).

Análise Estatística

Os dados estão expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75. A comparação entre os grupos foi realizada utilizando-se teste *t* ou Mann Whitney. Para verificar o grau de associação entre as variáveis foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson. O nível de significância considerado foi de 5%.

RESULTADOS

Caracterização dos Grupos Experimentais e Variáveis Corporais

Como referido, insuficiência cardíaca, caracterizada por congestão pulmonar e hipertrofia ventricular direita, esteve presente em oito ratos infartados, que constituíram o grupo IM. No grupo Sham (n=8), nenhum animal apresentou essas características.

As variáveis corporais dos animais estão expostas na Tabela 1. O peso corporal (PC) e o peso do VE, em valores absolutos ou normalizados pelo PC, foram semelhantes entre os grupos Sham e IM. O peso do VD e dos átrios e as relações VD/PC e átrios/PC foram maiores no grupo IM. Os pesos dos pulmões e a relação pulmão/PC foram maiores no grupo IM. As relações entre peso úmido e peso seco do VD, VE, pulmão e fígado foram maiores no grupo IM que no Sham. Os pesos dos músculos sóleo e gastrocnêmio, absolutos ou normalizados para o PC, foram semelhantes entre os grupos.

No grupo IM, a porcentagem de área infartada do VE foi de $49,4 \pm 4,12$ %.

Avaliação Ecocardiográfica

As variáveis estruturais cardíacas estão apresentadas na Tabela 2. Os diâmetros diastólico e sistólico do VE, o diâmetro do átrio esquerdo, a relação entre o diâmetro do átrio esquerdo e da aorta, os valores do diâmetro diastólico do VE e do átrio esquerdo normalizados pelo peso corporal, e as espessuras diastólicas do septo interventricular e da parede posterior do VE foram significativamente maiores no grupo IM. O diâmetro da aorta foi estatisticamente menor no grupo IM que no Sham.

Os resultados da avaliação das variáveis funcionais do VE estão expostos na Tabela 3. A frequência cardíaca foi maior no grupo IM que no Sham. As variáveis de função sistólica do VE porcentagem de encurtamento endocárdico, velocidade de encurtamento da parede posterior do VE e % de variação de área do VE foram menores no grupo IM. Quanto à função diastólica, a onda E mitral e a relação E/A foram significativamente maiores no grupo IM, e a onda A mitral e o

tempo de desaceleração da onda E mitral foram menores no grupo IM que no Sham. O tempo de relaxamento isovolumétrico foi semelhante entre os grupos.

Teste de tolerância à insulina

A área sob a curva glicêmica durante o teste de tolerância à insulina não diferiu entre os grupos (Sham 1.775 ± 61 ; IM: 1.691 ± 133 ; $p= 0,12$).

Teste de tolerância à glicose

A área sob a curva glicêmica corrigida pela glicemia basal foi semelhante entre os grupos (Sham 10.841 ± 3.752 ; IM 8.186 ± 3.001 ; $p=0,14$).

Concentração sérica de glicose, insulina e relação insulina/glicemia

A glicemia, avaliada por técnica enzimática colorimétrica, em soro coletado no momento da eutanásia, foi maior no grupo IM [Sham $110,0$ ($105,5 - 120,5$); IM $137,0$ ($132,0 - 155,5$) mg/dL; $p = 0,007$; Figura 1]. A concentração sérica de insulina foi maior no grupo IM (Sham $1,55 \pm 0,706$; IM $3,348 \pm 1,987$ ng/mL; $p = 0,03$; Figura 1). Houve tendência para a relação entre concentração sérica de insulina e glicemia de jejum ser maior no grupo IM (Sham $0,043 \pm 0,016$; IM $0,074 \pm 0,043$ nmol/L; $p = 0,077$; Figura 1). Não encontramos correlação entre a relação concentração sérica de insulina e glicemia de jejum e variáveis ecocardiográficas como diâmetro do átrio esquerdo normalizado pelo peso corporal, diâmetro diastólico do VE normalizado pelo peso corporal, porcentagem de encurtamento endocárdico e porcentagem de variação de área do VE.

Análise da expressão protéica de GLUT4 por Western Blot

A expressão da proteína transportadora de glicose (GLUT4) nos músculos sóleo e gastrocnêmio foi semelhante entre os grupos (sóleo: Sham

1,061 ± 0,490; IM: 1,285 ± 0,496 unidades arbitrárias; p = 0,38; gastrocnêmio: Sham 1,036 ± 0,439; IM 1,156 ± 0,455 unidades arbitrárias; p = 0,60; Figura 2). Não observamos correlação entre a expressão do GLUT4 e a relação concentração sérica de insulina/glicemia de jejum.

Dosagem das concentrações séricas de hormônios tireoidianos

As concentrações séricas dos hormônios tireoidianos TSH, T₃ total e T₄ livre foram semelhantes entre os grupos (TSH: Sham 0,16 ± 0,06; IM 0,12 ± 0,04 ng/dL; p = 0,20; T₃ total: Sham 88,9 ± 7,17; IM 94,3 ± 5,85 ng/dL; p = 0,11; T₄ livre: Sham 1,80 ± 0,18; IM 1,80 ± 0,38 ng/dL; p = 1,0; Figura 3). No grupo IM, observamos correlação positiva entre a concentração sérica de T₃ e a expressão protéica de GLUT4 no músculo sóleo (r = 0,950; p < 0,001; Figura 4). Adicionalmente, houve tendência para correlação positiva entre a concentração sérica de T₄ e a expressão protéica de GLUT4 no sóleo do grupo IM (r = 0,689; p = 0,059; Figura 5). No músculo gastrocnêmio do grupo IM, não detectamos correlação entre concentração sérica de T₃ ou T₄ e expressão de GLUT4. Da mesma forma, no grupo IM, não encontramos correlação entre concentração sérica dos hormônios tireoidianos e variáveis ecocardiográficas como diâmetro do átrio esquerdo normalizado pelo peso corporal, diâmetro diastólico do VE normalizado pelo peso corporal, porcentagem de encurtamento endocárdico e porcentagem de variação de área do VE.

Tabela 1. Variáveis corporais dos animais

Variáveis	Sham (n=8)	IM (n=8)	Valor de <i>p</i>
PC (g)	465 (458 - 483)	495 (444 - 532)	0,38
VE (g)	0,86 (0,84 - 0,93)	1,05 (0,84 - 1,14)	0,16
VD (g)	0,23 (0,22 - 0,25)	0,54 (0,46 - 0,59)	< 0,001
Átrios (g)	0,09 (0,08 - 0,10)	0,31 (0,21 - 0,40)	< 0,001
VE/PC (mg/g)	1,88 (1,82 - 1,93)	2,01 (1,85 - 2,15)	0,11
VD/PC (mg/g)	0,50 ± 0,05	1,05 ± 0,13	< 0,001
Átrios/PC (mg/g)	0,18 (0,18 - 0,22)	0,64 (0,45 - 0,77)	< 0,001
Pulmões (g)	1,88 ± 0,21	3,31 ± 0,42	< 0,001
Pulmões/PC (mg/g)	3,50 ± 1,48	6,87 ± 1,19	< 0,001
VD úmido/seco	3,91 ± 0,18	4,30 ± 0,21	0,001
VE úmido/seco	3,96 (3,84 - 4,09)	4,17 (4,11 - 4,21)	0,021
Pulmão úmido/seco	4,62 ± 0,12	4,80 ± 0,06	0,002
Fígado úmido/seco	3,13 ± 0,17	3,30 ± 0,12	0,04
Gastrocnêmio (g)	2,68 ± 0,27	2,65 ± 0,34	0,84
Gastrocnêmio/PC (mg/g)	5,71 ± 0,55	5,42 ± 0,36	0,23
Sóleo (g)	0,23 ± 0,01	0,23 ± 0,03	0,71
Sóleo/PC (mg/g)	0,49 ± 0,02	0,47 ± 0,05	0,15

Sham: ratos submetidos à cirurgia simulada para indução do infarto do miocárdio; IM: ratos com infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca; n: número de animais; PC: peso corporal; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75; teste *t* ou Mann Whitney.

Tabela 2. Variáveis estruturais cardíacas analisadas por ecocardiograma

Variáveis	Sham (n=8)	IM (n=8)	Valor de p
DDVE (mm)	8,20 ± 0,50	10,90 ± 0,58	<0,001
DDVE/PC (mm/kg)	16,4 ± 1,13	21,9 ± 1,77	<0,001
DSVE (mm)	3,90 ± 0,42	8,89 ± 0,94	<0,001
EDPP (mm)	1,44 ± 0,07	1,71 ± 0,24	0,008
EDSIV (mm)	1,44 (1,39 - 1,50)	1,67 (1,54 - 1,88)	0,001
AO (mm)	3,82 ± 0,14	3,48 ± 0,19	0,002
AE (mm)	5,75 (5,55 - 5,85)	8,67 (7,98 - 9,43)	<0,001
AE/AO	1,49 ± 0,08	2,50 ± 0,36	<0,001
AE/PC (mm/kg)	11,5 ± 0,70	17,4 ± 1,84	<0,001

Sham: ratos submetidos à cirurgia simulada para indução do infarto do miocárdio; IM: animais com infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca; n: número de animais; DDVE e DSVE: diâmetros diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo (VE), respectivamente; PC: peso corporal; EDPP e EDSIV: espessura diastólica da parede posterior do VE e do septo interventricular, respectivamente; AO: diâmetro da aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75; teste *t* ou Mann Whitney.

Tabela 3. Variáveis funcionais do ventrículo esquerdo analisadas por ecocardiograma

Variáveis	Sham (n=8)	IM (n=8)	Valor de <i>p</i>
FC (bpm)	257 ± 17	292 ± 27	0,009
ΔD (%)	52,5 ± 3,92	18,5 ± 6,41	< 0,001
VEPP (mm/s)	36,0 ± 3,42	21,3 ± 6,73	< 0,001
%Δ área	68,6 ± 4,81	33,2 ± 10,28	< 0,001
Onda E (cm/s)	78,1 ± 6,12	113 ± 16,8	< 0,001
Onda A (cm/s)	49,3 ± 10,8	21,5 ± 8,8	< 0,001
E/A	1,64 ± 0,32	6,03 ± 2,31	< 0,001
TDE (ms)	47,6 ± 10,6	31,3 ± 6,1	0,002
TRIV (ms)	33,0 (30,0 - 33,0)	27,0 (24,0 - 30,5)	0,13

Sham: ratos submetidos à cirurgia simulada para indução do infarto do miocárdio; IM: animais com infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca; n: número de animais; FC: frequência cardíaca; ΔD: encurtamento endocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo (VE); E/A: razão entre picos de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; TDE: tempo de desaceleração da onda E mitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico do VE. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75; teste *t* ou Mann Whitney.

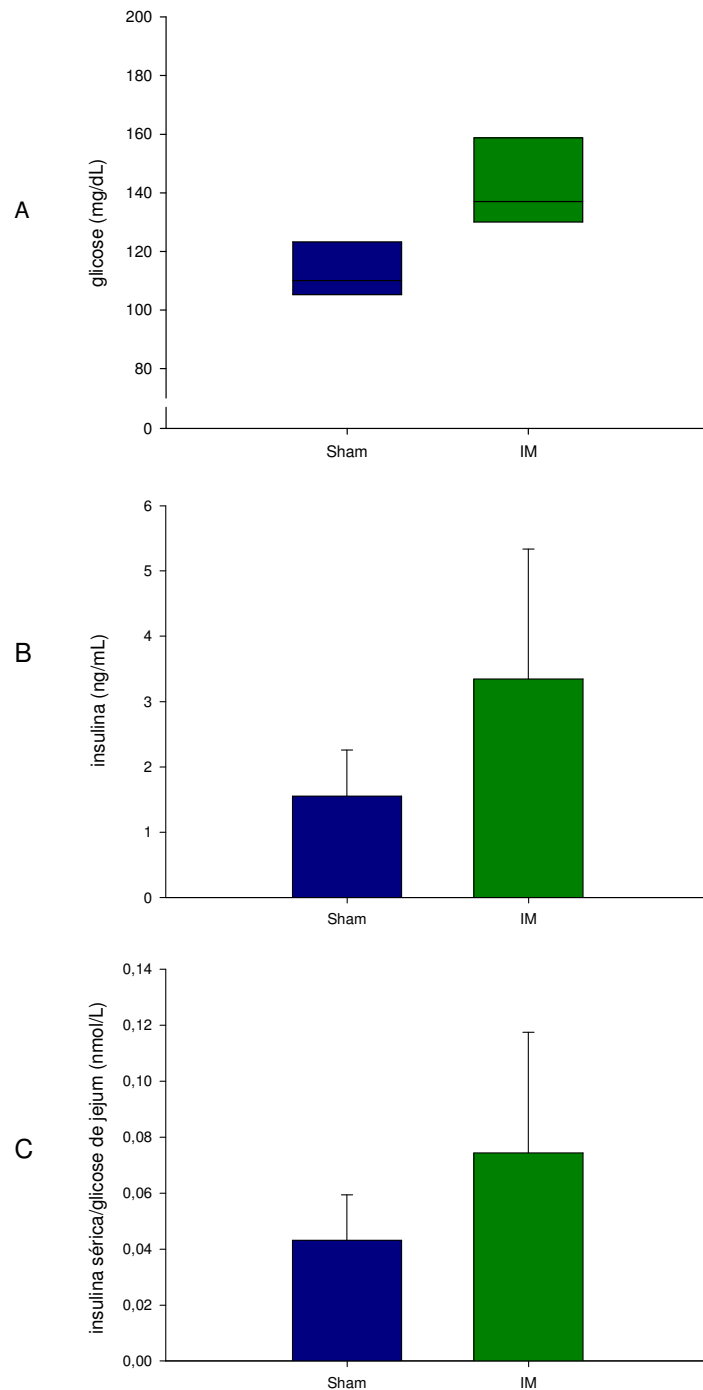


Figura 1. A: Concentração sérica de glicose; $p=0,01$; B: concentração sérica de insulina; $p=0,03$; C: relação entre insulina sérica e glicemia de jejum; $p=0,07$ para os grupos Sham (ratos submetidos à cirurgia simulada para indução do infarto do miocárdio, $n=8$) e IM (animais com infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca, $n=8$). Dados expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75.

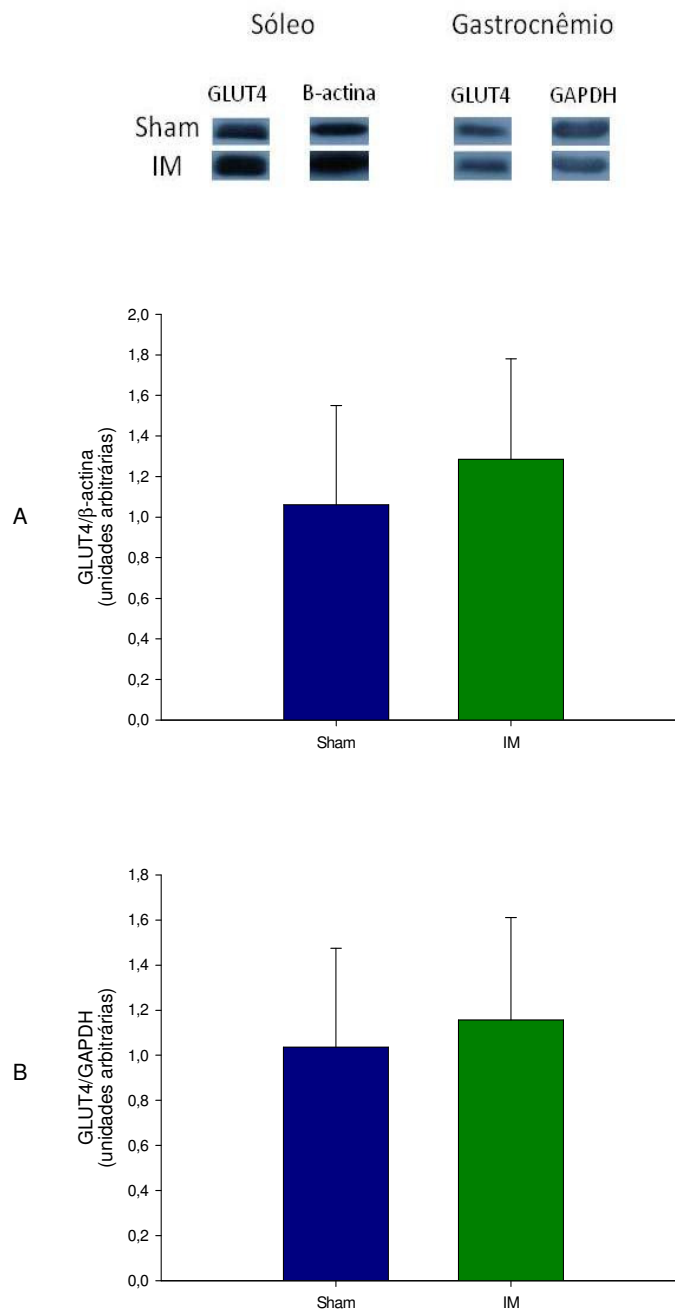


Figura 2. A: Expressão protéica de GLUT4 no músculo sóleo analisada pela técnica de *Western blot* e normalizada pela expressão protéica de β -actina; B: Expressão protéica de GLUT4 no músculo gastrocnêmio analisada pela técnica de *Western blot* e normalizada pela expressão protéica de GAPDH, nos grupos Sham (ratos submetidos à cirurgia simulada para indução do infarto do miocárdio, n=8) e IM (animais com infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca, n=8). Dados expressos em média \pm desvio padrão; $p > 0,05$.

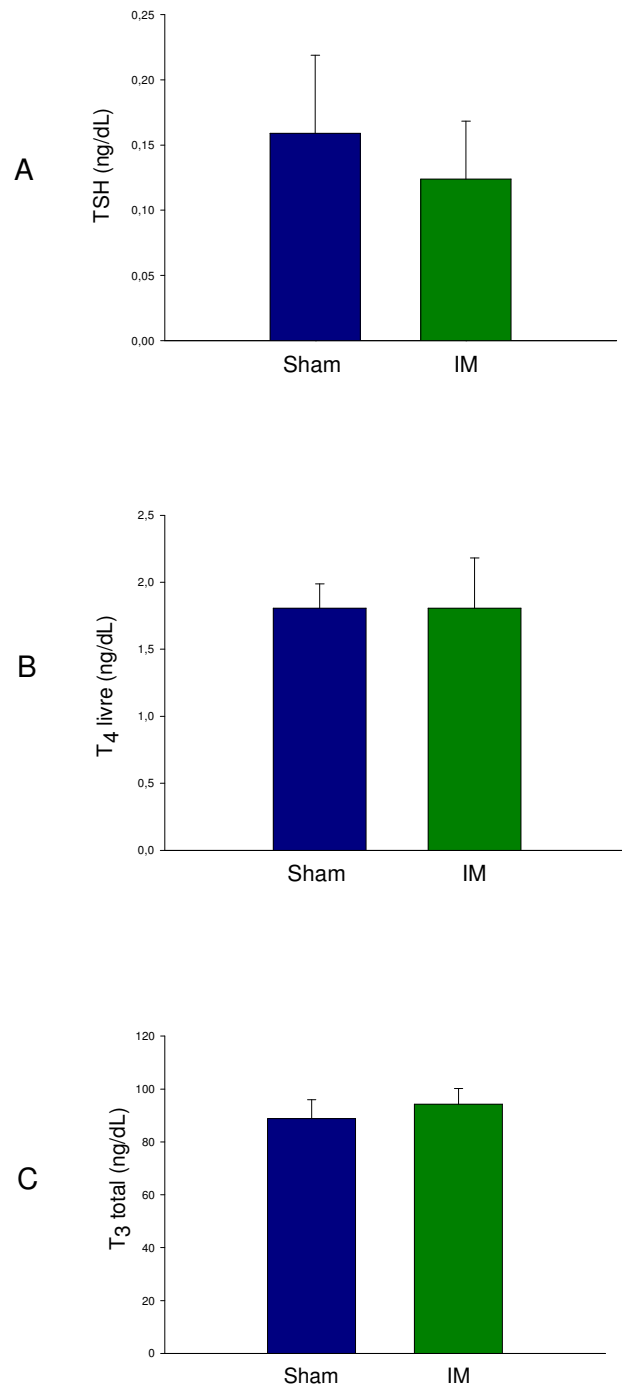


Figura 3. Concentrações séricas: A, hormônio tireoestimulante (TSH); B, triiodotironina total (T₃ total); e C, tiroxina livre (T₄ livre) para os grupos Sham (ratos submetidos à cirurgia simulada para indução do infarto do miocárdio, n=8) e IM (animais com infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca, n=8). Dados expressos em média ± desvio padrão; p>0,05.

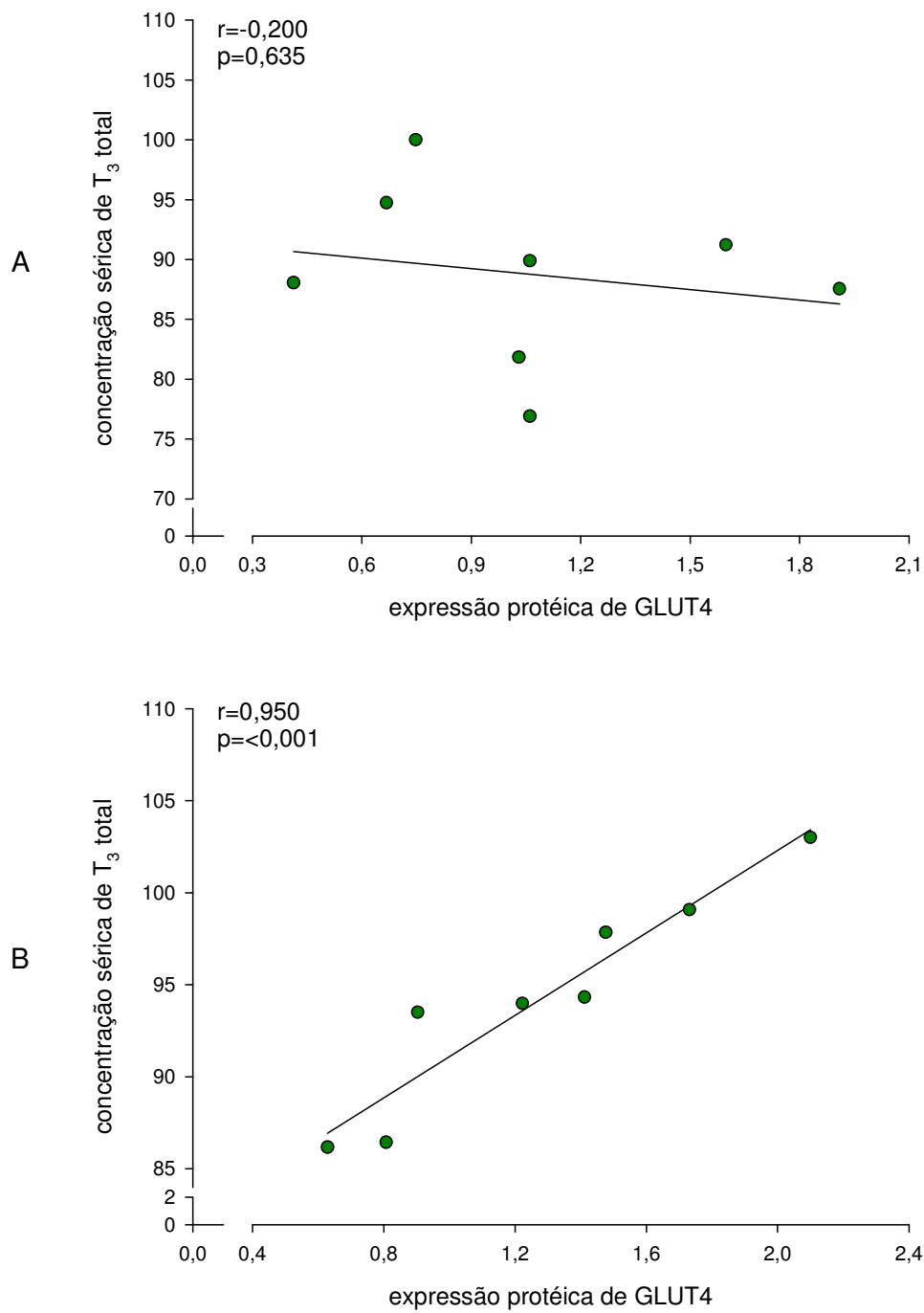


Figura 4. Diagrama de dispersão entre a expressão protéica de GLUT4 no músculo sóleo e a concentração sérica de T_3 nos grupos Sham (A) e IM (B); correlação de Pearson.

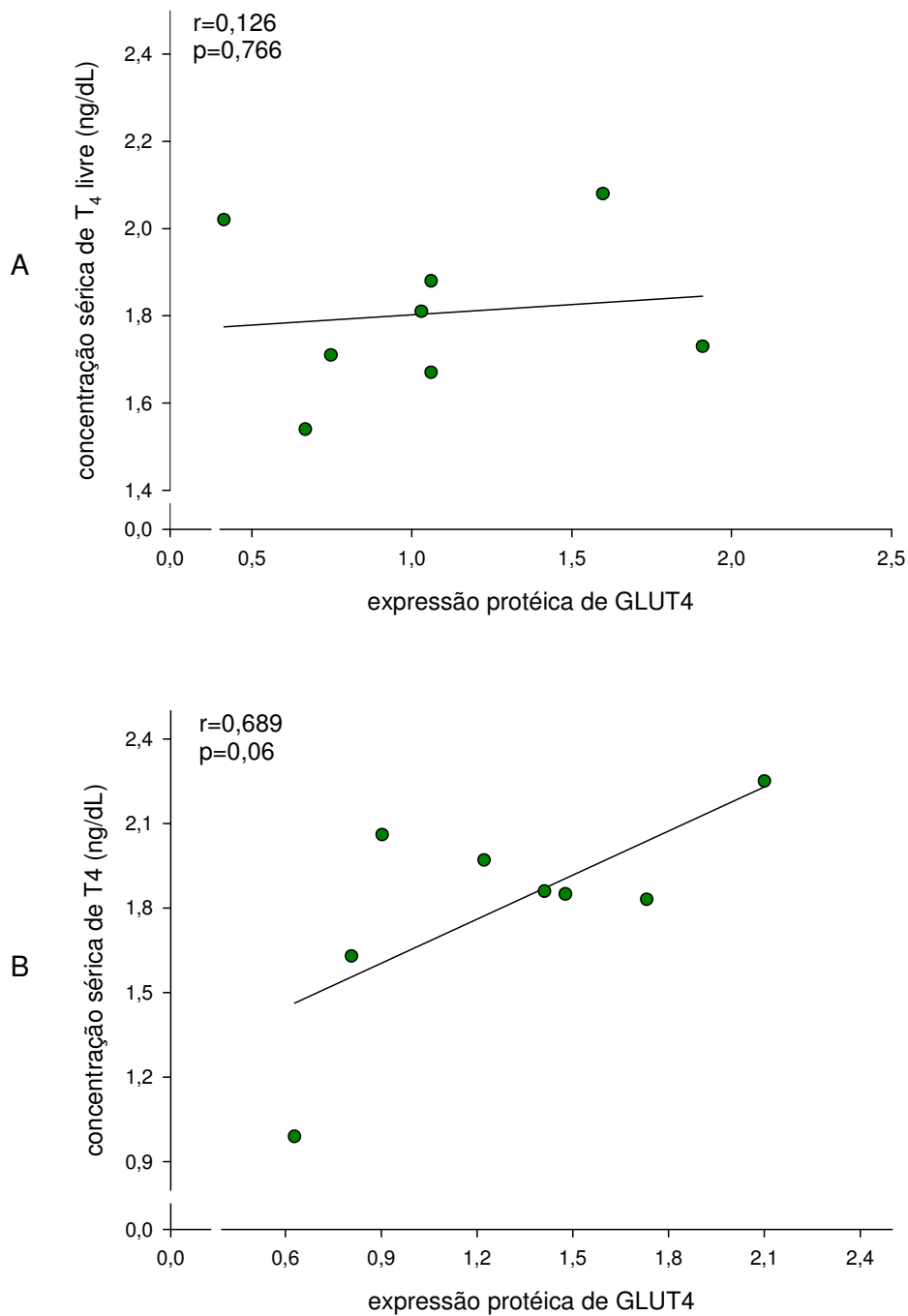


Figura 5. Diagrama de dispersão entre a expressão protéica de GLUT4 no músculo sóleo e a concentração sérica de T₄ nos grupos Sham (A) e IM (B); correlação de Pearson.

DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos marcadores de resistência à insulina e a expressão protéica do GLUT4 em músculos esqueléticos periféricos de ratos com insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio. Adicionalmente, analisamos se há associação entre essas variáveis e as concentrações séricas de hormônios tireoidianos, particularmente de T₃.

Os principais resultados do trabalho mostram que ratos com insuficiência cardíaca apresentam aumento da glicemia de jejum e da concentração sérica de insulina com tendência para resistência à insulina. A expressão protéica de GLUT4 não difere entre os grupos Sham e insuficiência cardíaca, em ambos os músculos esqueléticos avaliados, sóleo e gastrocnêmio. Apesar da concentração sérica de hormônios tireoidianos não diferir entre os grupos, há correlação positiva entre concentração sérica de T₃ e expressão protéica de GLUT4 no músculo sóleo e tendência para correlação positiva entre concentração sérica de T₄ e expressão de GLUT4 no mesmo músculo.

A insuficiência cardíaca foi induzida por infarto do miocárdio decorrente de ligadura da artéria coronária esquerda. O modelo experimental de infarto é muito utilizado, pois é prático, de baixo custo, mimetiza causas frequentes de insuficiência cardíaca em humanos, a isquemia e o infarto, e apresenta boa reprodutibilidade dos resultados quando comparados aos estudos clínicos subsequentes^{65,66}. Além disso, cursa com o desenvolvimento de insuficiência cardíaca esquerda de lenta evolução, semelhantemente ao que se observa em humanos⁵⁴. O tamanho do infarto do miocárdio é fator determinante para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca pós-infarto, tanto em humanos como em animais de experimentação. Neste estudo, a mensuração histológica da área infartada mostrou o grande comprometimento das paredes ventriculares, de aproximadamente 50 % do VE, no grupo de ratos com infarto do miocárdio.

Insuficiência cardíaca foi caracterizada, patologicamente, pela detecção de congestão pulmonar, caracterizada por peso dos pulmões em valores absolutos e normalizados pelo peso corporal maior que dois desvios padrão acima da média do grupo Sham, e hipertrofia ventricular direita caracterizada pela relação entre peso do ventrículo direito e peso corporal maior que 0,8 mg/g^{53,55}. O grau de congestão pulmonar, quando determinado levando em conta o peso

total dos pulmões, é variável fidedigna para o diagnóstico de insuficiência cardíaca em ratos⁵⁵. A hipertrofia ventricular direita é decorrente de hipertensão pulmonar resultante de aumento da pressão de enchimento do átrio esquerdo⁶⁷. Portanto, a hipertrofia ventricular direita, embora apareça mais tardiamente na evolução da insuficiência cardíaca com origem em câmaras cardíacas esquerdas, é uma das características mais determinantes para o diagnóstico de insuficiência cardíaca em ratos⁶⁷⁻⁷⁰. Em nosso estudo, foram selecionados para compor o grupo IM somente os ratos que apresentaram congestão pulmonar e hipertrofia do ventrículo direito. Finalmente, a relação peso úmido/peso seco dos ventrículos esquerdo e direito, pulmão e fígado, maior no grupo IM, mostra a presença de congestão pulmonar e sistêmica nos animais com insuficiência cardíaca.

Para documentar a presença de disfunção ventricular no grupo IM, foi realizada avaliação das estruturas cardíacas e da função do VE por ecocardiograma transtorácico. Os resultados mostraram que o grupo IM apresentou dilatação das câmaras cardíacas esquerdas acompanhada de disfunção sistólica e diastólica do VE. É importante ressaltar que, no grupo IM, o aumento substancial da relação E/A e a redução do tempo de desaceleração da onda E mitral indicam grau avançado de disfunção diastólica.

A avaliação da musculatura esquelética foi realizada nos músculos sóleo e gastrocnêmio, que apresentam características fenotípicas distintas. O músculo sóleo é oxidativo com predomínio de fibras do tipo I e isoformas das cadeias pesadas de miosina (MyHC) tipo I. Já o músculo gastrocnêmio é glicolítico com predomínio de fibras do tipo II e isoformas das MyHC tipo II. No gastrocnêmio, utilizamos sua porção branca, que tem predomínio de fibras tipo IIB. Estudos prévios de nosso grupo mostraram que os dois músculos são sensíveis a alterações em seu fenótipo durante insuficiência cardíaca aguda ou crônica^{11-13,15,18,19}.

Os ratos com insuficiência cardíaca apresentaram aumento da glicemia de jejum e da concentração sérica de insulina, com tendência para aumento da resistência à insulina ($p=0,077$). Em ratos, ainda há dificuldade em estabelecer índice para avaliação da resistência à insulina. A relação entre concentração sérica de insulina e glicemia de jejum tem sido utilizada em

roedores⁶⁴, à semelhança do índice HOMA, frequentemente usado em humanos em substituição à técnica do *clamp* da glicose^{71,72}.

Nas últimas duas décadas, a resistência à insulina tem sido definida como uma característica de pacientes com falência cardíaca^{39-41,73}. Ensaios clínicos mostraram que a resistência à insulina ocorre independentemente da etiologia da insuficiência cardíaca e está diretamente associada à gravidade e à progressão da doença^{39,43}. Em nosso estudo, é possível que a pequena amostra analisada e a grande variabilidade dos resultados em ambos os grupos experimentais tenham sido responsáveis pelo encontro de tendência em vez de definida resistência à insulina no grupo de ratos com insuficiência cardíaca.

Os mecanismos responsáveis pela resistência à insulina na insuficiência cardíaca ainda não estão completamente esclarecidos. Potenciais fatores como ativação inflamatória e estimulação do sistema nervoso simpático não foram confirmados em estudos clínicos em pacientes com insuficiência cardíaca compensada⁷⁴. Recentemente, foi sugerido que variações na expressão do GLUT4 em músculos esqueléticos possam estar envolvidas no desenvolvimento de resistência à insulina na insuficiência cardíaca⁴⁰. Em estudo com 29 pacientes com insuficiência cardíaca e sem diabetes mellitus, Doehner et al.⁴⁰ observaram redução da expressão protéica de GLUT4 em músculo esquelético. Adicionalmente, o grau de diminuição do GLUT4 foi associado à resistência à insulina e à gravidade da doença. Entretanto, em nosso estudo não observamos diferença na expressão protéica de GLUT4 em ambos os músculos sóleo e gastrocnêmio entre os grupos controle e insuficiência cardíaca. Como não identificamos na literatura estudos que tenham avaliado a expressão muscular de GLUT4 em roedores com insuficiência cardíaca, não temos como comparar nossos resultados com o de outros autores. Neste estudo, a expressão do GLUT4 foi analisada em homogenato de tecido muscular, conforme descrito em outros trabalhos^{75,76}. Entretanto, é possível que análises em frações de membrana celular possam ser mais específicas para detectar variações do GLUT4 envolvido no transporte de glicose induzido pela insulina⁷⁷. Assim, estudos adicionais são necessários para esclarecer esse tópico.

Os hormônios tireoidianos têm papel fundamental no adequado funcionamento do sistema cardiovascular, tanto em condições fisiológicas, como em situações patológicas^{78,79}. Em estudos clínicos e experimentais, foi documentado que os hormônios tireoidianos influenciam a frequência cardíaca, contratilidade miocárdica, função ventricular sistólica e diastólica e resistência vascular periférica por meio de ações genômicas e não genômicas⁷⁹⁻⁸².

Na insuficiência cardíaca, é relativamente comum o encontro de diminuição da concentração sérica do T₃, tanto em sua forma livre como total, com valores de T₄ e TSH dentro da faixa da normalidade^{50,79,83,84}. Em ensaios clínicos, 13 a 30% dos pacientes com insuficiência cardíaca apresentam redução da concentração sérica de T₃, situação esta conhecida como síndrome do T₃ baixo. A diminuição do T₃ constitui importante preditor independente de mortalidade em pacientes com insuficiência cardíaca e está associada ao grau de disfunção ventricular e de gravidade da doença^{78,79}. Atualmente, apesar do elo entre insuficiência cardíaca e concentração sérica de T₃ estar bem documentado, ainda há dúvidas se a redução do T₃ constitui apenas marcador de severidade da doença. Vários autores, porém, acreditam que a diminuição do T₃ possa contribuir para a progressiva deterioração da função cardíaca e remodelação miocárdica^{78,79}. De fato, em modelos experimentais de agressão cardíaca, a administração de hormônios tireoidianos melhorou a função ventricular e marcadores de remodelação miocárdica como as concentrações da isoforma- α das cadeias pesadas de miosina e da proteína Serca-2 (bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático)⁸⁵⁻⁸⁸. Adicionalmente, foi observado que as concentrações séricas de hormônios tireoidianos podem estar normais em situações de depressão dos níveis teciduais cardíacos dos hormônios⁸⁹.

Além dos efeitos cardiovasculares diretos, os hormônios tireoidianos podem modular fatores associados ao risco para desenvolver doença cardiovascular como os lípides plasmáticos e a resistência à insulina^{44,75,90,91}. Atualmente, acredita-se que a influência dos hormônios tireoidianos na resistência à insulina seja decorrente de sua ação sobre o GLUT4^{75,90-92}. Por exemplo, ratos com hipotireoidismo perinatal apresentam diminuição da expressão gênica e protéica do GLUT4 no músculo cardíaco^{90,92} e esquelético⁹⁰.

Inversamente, a administração de T_3 estimula a expressão de GLUT4 e o transporte de glicose em músculo esquelético de ratos^{75,91}.

Neste estudo, as concentrações séricas de hormônios tireoidianos e de TSH não diferiram entre os grupos Sham e insuficiência cardíaca. Entretanto, apesar de não termos encontrado diferenças nos hormônios tireoidianos e na expressão protéica do GLUT4 entre os dois grupos estudados, observamos correlação positiva entre a concentração sérica de T_3 e a expressão de GLUT4 no músculo sóleo dos ratos com insuficiência cardíaca. Além disso, verificamos tendência para correlação positiva entre a concentração sérica de T_4 e a expressão de GLUT4 também no músculo sóleo dos ratos infartados. Essas correlações não foram observadas no grupo Sham. Portanto, é possível que variações nos níveis teciduais dos hormônios tireoidianos possam ter influenciado a expressão do GLUT4. Em ratos, a expressão do GLUT4 é aproximadamente cinco vezes maior em músculos oxidativos, como o sóleo, do que em músculos glicolíticos, como o gastrocnêmio. Esse fato pode explicar o encontro de correlação estatisticamente significativa apenas no músculo sóleo⁹³.

Em conclusão, ratos com insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio apresentam elevação da glicemia de jejum e da concentração sérica de insulina, com tendência para aumento da resistência à insulina. Apesar da concentração sérica de hormônios tireoidianos e da expressão protéica muscular de GLUT4 estarem preservados na insuficiência cardíaca, existe forte correlação positiva entre concentração sérica T_3 e expressão protéica de GLUT4 no músculo sóleo, sugerindo que o hormônio tireoidiano possa estar envolvido na regulação do GLUT4 e na resistência à insulina associada à insuficiência cardíaca.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tang ASL, Wells GA, Talajic M, Arnold MO, Sheldon R, Connolly S, Hohnloser SH, Nichol G, Birnie DH, Sapp JL, Yee R, Healey JS, Rouleau JL. Cardiac-resynchronization therapy for mild-to-moderate heart failure. *N Engl J Med*. 2010;363:2385-2395.
2. Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G, Ferguson TB, Ford E, Furie K, Gillespie C, Go A, Greenlund K, Haase N, S. H, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott MM, Meigs J, Mozaffarian D, Mussolino M, Nichol G, Roger VL, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Stafford R, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong ND, Wylie-Rosett J. Heart disease and stroke statistics - 2010 update. A report from the American Heart Association. *Circulation*. 2010;121:e46-e215.
3. Bleumink GS, Knetsch AM, Sturkenboom MC, Straus SM, Hofman A, Deckers JW, Witteman JC, Stricker BH. Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure. The Rotterdam Study. *Eur Heart J*. 2004;25:1614-1619.
4. Strassburg S, Springer J, Anker SD. Muscle wasting in cardiac cachexia. *Intern J Biochem Cell Biol*. 2005;37:1938-1947.
5. Harrington D, Anker SD, Coats AJS. Preservation of exercise capacity and lack of peripheral changes in asymptomatic patients with severely impaired left ventricular function. *Eur Heart J*. 2001;22:392-399.
6. Florea VG, Mareyev VY, Achilov AA, Popovici MI, Coats AJS, Belenkov YN. Central and peripheral components of chronic heart failure: determinants of exercise tolerance. *Int J Cardiol*. 1999;70:51-56.
7. Minotti JR, Pillay P, Oka R, Wells L, Christoph I, Massie BM. Skeletal muscle size: relationship to muscle function in heart failure. *J Appl Physiol*. 1993;75:373-381.

8. Wilson JR, Mancini D, Dunkman B. Exertional fatigue due to intrinsic skeletal muscle dysfunction in patients with heart failure. *Circulation*. 1993;87:470-475.
9. Mancini DM, Walter G, Reichel N, Lenkinski R, McCully KK, Mullen JL, Wilson JR. Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure. *Circulation*. 1992;85:1364-1373.
10. Anker SD, Coats AJS. Cardiac cachexia. A syndrome with impaired survival and immune and neuroendocrine activation. *Chest*. 1999;115:836-847.
11. Carvalho RF, Cicogna AC, Campos GER, Lopes FS, Sugisaki MM, Nogueira CR, Dal Pai-Silva M. Heart failure alters MyoD and MRF4 expressions in rat skeletal muscle. *Int J Exp Path*. 2006;87:219-225.
12. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, Carvalho RF, Oliveira Jr SA, Lima ARR, Campos DHS, Damatto RL, Nogueira CR, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. Chronic heart failure-induced skeletal muscle atrophy, necrosis, and myogenic regulatory factors changes. *Med Sci Monit*. 2010;16:374-383.
13. Lima ARR, Martinez PF, Okoshi K, Guizoni DM, Zornoff LAM, Campos DHS, Oliveira Jr SA, Bonomo C, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. Myostatin and follistatin expression in skeletal muscles of rats with chronic heart failure. *Int J Exp Path*. 2010;91:54-62.
14. Schieffer B, Wollert KC, Berchtold M, Saal K, Schieffer E, Hornig B, Riede UN, Drexler H. Development and prevention of skeletal muscle structural alterations after experimental myocardial infarction. *Am J Physiol*. 1995;269:1507-1513.
15. Carvalho RF, Dariolli R, L.A. JJ, Sugizaki MM, Okoshi MP, Cicogna AC, Felisbino SL, Dal Pai-Silva M. Heart failure alters matrix metalloproteinase gene expression and activity in rat skeletal muscle. *Int J Exp Pathol*. 2006;87:437-443.
16. Filippatos GS, Kanatselos C, Manolatos DD, Vougas B, Sideris A, Kardara D, Anker SD, Kardaras F, Uhal B. Studies on apoptosis and fibrosis in skeletal

- musculature: A comparison of heart failure patients with and without cardiac cachexia. *Int J Cardiol.* 2003;90:107-113.
17. Sullivan MJ, Green HJ, Cobb FR. Altered skeletal muscle metabolic response to exercise in chronic heart failure. Relation to skeletal muscle aerobic enzyme activity. *Circulation.* 1991;84:1597-1607.
 18. Carvalho RF, Cicogna AC, Campos GER, Assis JMF, Padovani CR, Okoshi MP, Dal Pai-Silva M. Myosin heavy chain expression and atrophy in rat skeletal muscle during transition from cardiac hypertrophy to heart failure. *Int J Exp Path.* 2003;84:201-206.
 19. Damatto RL, Martinez PF, Lima ARR, Cezar MDM, Campos DHS, Oliveira Jr SA, Guizoni DM, Bonomo C, Okoshi K, Okoshi MP. Myogenic regulatory factors and myostatin/follistatin expression in heart failure-induced skeletal muscle phenotype changes. *Eur Heart J.* 2010;31:427.
 20. Lima ARR, Martinez PF, Damatto RL, Zornoff LAM, Cezar MDM, Guizoni DM, Bonomo C, Rosa CM, Okoshi K, Okoshi MP. Heart failure-induced myosin heavy chain changes in rat diaphragm muscle are not related to gene expression of myogenic regulatory factors. *Eur Heart J.* 2010;31:426.
 21. Martinez PF, Seiva FRF, Damatto RL, Lima ARR, Cezar MDM, Bonomo C, Guizoni DM, Zornoff LAM, Okoshi K, Novelli ELB, Okoshi MP. Influência da N-acetilcisteína sobre o estresse oxidativo de músculo esquelético de ratos infartados. *Arq Bras Cardiol.* 2010;95:1.
 22. De Sousa E, Veksler V, Bigard X, Mateo P, Ventura-Clapier R. Heart failure affects mitochondrial but not myofibrillar intrinsic properties of skeletal muscle. *Circulation.* 2000;102:1847-1853.
 23. Arnolda L, Brosnan J, Rajagopalan B, Radda GK. Skeletal muscle metabolism in heart failure in rats. *Am J Physiol Heart Cell Physiol.* 1991;261:H434-H442.
 24. Zoll J, Monassier L, Garnier A, N'Guessan B, Mettauer B, Veksler V, Piquard F, Ventura-Clapier R, Geny B. ACE inhibition prevents myocardial infarction-

- induced skeletal muscle mitochondrial dysfunction. *J Appl Physiol.* 2006;101:385-391.
25. Pfeifer C, Musch TI, Mcallister RM. Skeletal muscle oxidative capacity and exercise tolerance in rats with heart failure. *Med Sci Sports Exerc.* 2001;33:542-548.
 26. Sullivan MJ, Green HJ, Cobb FR. Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. *Circulation.* 1990;81:518-527.
 27. Drexler H, Riede U, Münzel T, König H, Funke E, Just H. Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure. *Circulation.* 1992;85:1751-1759.
 28. Bernocchi P, Ceconi C, Pedersini P, Pasini E, Curello S, Ferrari R. Skeletal muscle metabolism in experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28:2263-2273.
 29. Nagai T, Okita K, Yonezawa K, Yamada Y, Hanada A, Ohtsubo M, Morita N, Murakami T, Nishijima H, Kitabatake A. Comparisons of the skeletal muscle metabolic abnormalities in the arm and leg muscles of patients with chronic heart failure. *Circ J.* 2004;68:573-579.
 30. Schulze PC, Gielen S, Schuler G, Hambrecht R. Chronic heart failure and skeletal muscle catabolism: effects of exercise training. *Int J Cardiol.* 2002;85:141-149.
 31. Niebauer J, Pflaum CD, Clark AL, Strasburger CJ, Hooper J, Poole-Wilson PA, Coats AJ, Anker SD. Deficient insulin-like growth factor I in chronic heart failure predicts altered body composition, anabolic deficiency, cytokine and neurohormonal activation. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32:393-397.
 32. Anker SD, Negassa A, Coats AJS, Afzal R, Poole-Wilson PA, Cohn JN, Yusuf S. Prognostic importance of weight loss in chronic heart failure and the effect of treatment with angiotensin-converting-enzyme inhibitors: an observational study. *Lancet.* 2003;361:1077-1083.

33. Anker SD, von Haehling S. Inflammatory mediators in chronic heart failure. An overview. *Heart*. 2004;90:464-470.
34. Janssen SP, Gayan-Ramirez G, Van den Bergh A, Herijgers P, Maes K, Verbeken E, Decramer M. Interleukin-6 causes myocardial failure and skeletal muscle atrophy in rats. *Circulation*. 2005;111:996-1005.
35. Dalla Libera L, Sabbadini R, Renken C, Ravara B, Sandri M, Betto R, Angelini A, Vescovo G. Apoptosis in the skeletal muscle of rats with heart failure is associated with increased serum levels of TNF- α and sphingosine. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:1871-1878.
36. Schulze PC, Gielen S, Adams V, Linke A, Möbius-Winkler S, Erbs S, Kratzsch J, Hambrecht R, Schuler G. Muscular levels of proinflammatory cytokines correlate with a reduced expression of insulin-like growth factor-1 in chronic heart failure. *Basic Res Cardiol*. 2003;98:267-274.
37. Reid MB, Lännergren J, Westerblad H. Respiratory and limb muscle weakness induced by tumor necrosis factor- α . *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:479-484.
38. Li X, Moody MR, Engel D, Walker S, Clubb FJ, Sivasubramanian N, Mann DL, Reid MB. Cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- α causes oxidative stress and contractile dysfunction in mouse diaphragm. *Circulation*. 2000;102:1690-1696.
39. Swan JW, Anker SD, Walton C, Godsland IF, Clark AL, Leyva F, Stevenson JC, Coats AJS. Insulin resistance in chronic heart failure: relation to severity and etiology of heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1997;30:527-532.
40. Doehner W, Gathercole D, Ciccoira M, Krack A, Coats AJS, Camici PG, Anker SD. Reduced glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle predicts insulin resistance in non-diabetic chronic heart failure patients independently of body composition. *Int J Cardiol*. 2010;138:19-24.
41. Swan JW, Godsland IF, Clark AL, Coats AJS, Oliver MF. Insulin resistance in chronic heart failure. *Eur Heart J*. 1994;15:1528-1532.

42. Al Zadjali MA, Godfrey V, Khan F, Choy A, Doney AS, Wong AK, Petrie JR, Struthers AD, Lang CC. Insulin resistance is highly prevalent and is associated with reduced exercise tolerance in nondiabetic patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53:747-753.
43. Doehner W, Rauchhaus M, Ponikowski P, Godsland IF, von Haehling S, Okonko DO, Leyva F, Proudler AJ, Coats AJS, Anker SD. Impaired insulin sensitivity as an independent risk factor for mortality in patients with stable chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:1019-1026.
44. Zorzano A, Palacin M, Guma A. Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* 2005;183:43-58.
45. Zhou L, Chen H, Xu P, Cong LN, Sciacchitano S, Li Y, Graham D, Jacobs AR, Taylor SI, Quon MJ. Action of insulin receptor substrate-3 (IRS-3) and IRS-4 to stimulate translocation of GLUT4 in rat adipose cells. *Mol Endocrinol.* 1999;13:505-514.
46. Tsakiridis T, McDowell HE, Walker T, Downes CP, Hundal HS, Vranic M, Klip A. Multiple roles of phosphatidylinositol 3-kinase in regulation of glucose transport, amino acid transport, and glucose transporters in L6 skeletal muscle cells. *Endocrinology.* 1995;136:4315-4322.
47. Nikolaidis LA, Sturzu A, Stolarski C, Elahi D, Shen YT, Shannon RP. The development of myocardial insulin resistance in conscious dogs with advanced dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res.* 2004;61:297-306.
48. Zisman A, Peroni OD, Abel ED, Michael MD, Mauvais-Jarvis F, Lowell BB, Wojtaszewski JF, Hirshman MF, Virkamaki A, Goodyear LJ, Kahn CR, Kahn BB. Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat Med.* 2000;6:924-928.
49. Irwin K. Endocrine disorders and cardiovascular disease. In: Libby P, Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, eds. *Braunwald's Heart Disease.* 8th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008:2033-2047.

50. Iervasi G, Pingitore A, Landi P, Raciti M, Ripoli A, Scarlattini M, L'Abbate A, Donato L. Low-T3 syndrome: a strong prognostic predictor of death in patients with heart disease. *Circulation*. 2003;107:708-713.
51. Pingitore A, Landi P, Taddei MC, Ripoli A, L'Abbate A, Iervasi G. Triiodothyronine levels for risk stratification of patients with chronic heart disease. *Am J Med*. 2005;118:132-136.
52. Ribeiro HB, Okoshi K, Cicogna AC, Bregagnollo EA, Rodrigues MAM, Padovani CR, Aragon FF, Jamas E, Okoshi MP. Estudo evolutivo da morfologia e função cardíaca em ratos submetidos a estenose aórtica supra-avalvar. *Arq Bras Cardiol*. 2003;81:562-568.
53. Cicogna AC, Robinson KG, Conrad CH, Singh K, Squire R, Okoshi MP, Bing OHL. Direct effects of colchicine on myocardial function. Studies in hypertrophied and failing spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1999;33:60-65.
54. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, Oliveira Jr SA, Campos DHS, Lima ARR, Damatto RL, Padovani CR, Cicogna AC, Okoshi MP. Echocardiographic detection of congestive heart failure in postinfarction rats. *Eur Heart J*. 2009;30:291.
55. Woodiwiss AJ, Tsotetsi OJ, Sprott S, Lancaster EJ, Mela T, Chung ES, Meyer TE, Norton GR. Reduction in myocardial collagen cross-linking parallels left ventricular dilatation in rats models of systolic chamber dysfunction. *Circulation*. 2001;103:155-160.
56. Okoshi K, Fioretto JR, Okoshi MP, Cicogna AC, Aragon FF, Matsubara LS, Matsubara BB. Food restriction induces in vivo ventricular dysfunction in spontaneously hypertensive rats without impairment of in vitro myocardial contractility. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37:607-613.
57. Okoshi K, Matsubara LS, Okoshi MP, Cicogna AC, Fioretto JR, Padovani CR, Aragon FF, Matsubara BB. Food restriction-induced myocardial dysfunction

- demonstrated by the combination of in vivo and in vitro studies. *Nutr Res.* 2002;22:1353-1364.
58. Fioretto JR, Queiroz SS, Padovani CR, Matsubara LS, Okoshi K, Matsubara BB. Ventricular remodeling and diastolic myocardial dysfunction in rats submitted to protein-calorie malnutrition. *Am J Physiol.* 2002;282:H1327-H1333.
59. Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation.* 1978;58:1072-1083.
60. Solomon SD, Greaves SC, Ryan M, Finn P, Pfeffer MA, Pfeffer JM. Temporal dissociation of left ventricular function and remodeling following experimental myocardial infarction in rats. *J Card Fail.* 1999;5:213-223.
61. Oh B-H, Ono S, Rockman HR, Ross J. Myocardial hypertrophy in the ischemic zone induced by exercise in rats after coronary reperfusion. *Circulation.* 1993;87:598-607.
62. Kalkman EAJ, van Suylen RJ, van Disk JPM, Saxena PR, Schoemaker RG. Chronic aspirin treatment affects collagen deposition in non-infarcted myocardium during remodelling after coronary artery ligation in rat. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27:2483-2494.
63. Minicucci MF, Azevedo PS, Duarte DR, Matsubara BB, Matsubara LS, Campana AO, Paiva SAR, Zornoff LAM. Comparison of different methods to measure experimental chronic infarction size in the rat model. *Arq Bras Cardiol.* 2007;89:83-87.
64. Sedova L, Seda O, Krenova D, Kren V, Kazdova L. Isotretinoin and fenofibrate induce adiposity with distinct effect on metabolic profile in a rat model of the insulin resistance syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2004;28:719-725.

65. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res.* 1979;44:503-512.
66. Pfeffer MA, Braunwald E, Moyer LA, Basta L, Brown EJJ, Cuddy TE, Davis BR, Geltman EM, Goldman S, Flaker GC. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after acute myocardial infarction: results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med.* 1992;327:669-677.
67. Bing OHL, Brooks WW, Robinson KG, Slawsky MT, Hayes JA, Litwin SE, Sen S, Conrad CH. The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27:383-396.
68. Bing OHL, Brooks WW, Conrad CH, Sen S, Perreault CL, Morgan JP. Intracellular calcium transients in myocardium from spontaneously hypertensive rats during the transition to heart failure. *Circ Res.* 1991;68:1390-1400.
69. Conrad CH, Brooks WW, Robinson KG, Bing OHL. Impaired myocardial function in spontaneously hypertensive rats with heart failure. *Am J Physiol.* 1991;260:H136-H145.
70. Brooks WW, Healey N, Sen S, Conrad CH, Bing OHL. Oxygen cost of stress development in hypertrophied and failing hearts from the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 1993;21:56-64.
71. Geloneze B, Tambascia MA. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006;50:208-215.
72. Vasques ACJ, Rosado LEFPL, Alfenas RCG, Geloneze B. Análise crítica do uso dos índices do *Homeostasis Model Assessment* (HOMA) na avaliação da resistência à insulina e capacidade funcional das células-beta pancreáticas. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52:32-39.

73. Paolisso G, De Riu S, Marrazzo G, Verza M, Varricchio M, D'Onofrio F. Insulin resistance and hyperinsulinemia in patients with chronic congestive heart failure. *Metabolism*. 1991;40:972-977.
74. Doehner W, Rauchhaus M, Godsland IF, Egerer K, Niebauer J, Sharma R, Cicoira M, Florea VG, Coats AJ, Anker SD. Insulin resistance in moderate chronic heart failure is related to hyperleptinaemia, but not to norepinephrine or TNF-alpha. *Int J Cardiol*. 2002;83:73-81.
75. Casla A, Rovira A, Wells JA, Dohm GL. Increased glucose transporter (GLUT4) protein expression in hyperthyroidism. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;171:182-188.
76. Furugen A, Kobayashi M, Narumi K, Watanabe M, Otake S, Itagaki S, Iseki K. AMP-activated protein kinase regulates the expression of monocarboxylate transporter 4 in skeletal muscle. *Life Sci*. 2011;88:163-168.
77. Barros RPA, Machado UF, Warner M, Gustafsson J. Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ERbeta and ERalpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:1605-1608.
78. Gerdes AM, Iervasi G. Thyroid replacement therapy and heart failure. *Circulation*. 2010;122:385-393.
79. Galli E, Pingitore A, Iervasi G. The role of thyroid hormone in the pathophysiology of heart failure: clinical evidence. *Heart Fail Rev*. 2010;15:155-169.
80. Klein I, Ojamaa K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N Engl J Med*. 2001;344:501-509.
81. Kahaly GJ, Dillmann WH. Thyroid hormone action in the heart. *Endocr Rev*. 2005;26:704-728.
82. Klein I, Danzi S. Thyroid disease and the heart. *Circulation*. 2007;116:1725-1735.

83. Ascheim DD, Hryniewicz K. Thyroid hormone metabolism in patients with congestive heart failure: the low triiodothyronine state. *Thyroid*. 2002;12:511-515.
84. Opasich C, Pacini F, Ambrosino N, Riccardi PG, Febo O, Ferrari R, Cobelli F, Tavazzi L. Sick euthyroid syndrome in patients with moderate-to-severe chronic heart failure. *Eur Heart J*. 1996;17:1860-1866.
85. Ito K, Kagaya Y, Shimokawa H. Thyroid hormone and chronically unloaded hearts. *Vascul Pharmacol*. 2010;52:138-141.
86. Chang KC, Figueredo VM, Schreur JH, Kariya K, Weiner MW, Simpson PC, Camacho SA. Thyroid hormone improves function and Ca²⁺ handling in pressure overload hypertrophy. Association with increased sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and alpha-myosin heavy chain in rat hearts. *J Clin Invest*. 1997;100:1742-1749.
87. Minatoya Y, Ito K, Kagaya Y, Asaumi Y, Takeda M, Nakayama M, Takahashi J, Iguchi A, Shirato K, Shimokawa H. Depressed contractile reserve and impaired calcium handling of cardiac myocytes from chronically unloaded hearts are ameliorated with the administration of physiological treatment dose of T3 in rats. *Acta Physiol*. 2007;189:221-231.
88. Ojamaa K, Kenessey A, Shenoy R, Klein I. Thyroid hormone metabolism and cardiac gene expression after acute myocardial infarction in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;279:E1319-E1324.
89. Liu Y, Redetzke RA, Said S, Pottala JV, de Escobar GM, Gerdes AM. Serum thyroid hormone levels may not accurately reflect thyroid tissue levels and cardiac function in mild hypothyroidism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294:H2137-H2143.
90. Ramos S, Goya L, Alvarez C, Martín MA, Agote M, Escrivá F, Pascual-Leone AM. Different role of insulin in GLUT-1 and -4 regulation in heart and skeletal muscle during perinatal hypothyroidism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;281:E1073-E1081.

91. Weinstein SP, O'Boyle E, Haber RS. Thyroid hormone increases basal and insulin-stimulated glucose transport in skeletal muscle. The role of GLUT4 glucose transporter expression. *Diabetes*. 1994;43:1185-1189.
92. Castelló A, Rodríguez-Manzaneque JC, Camps M, Pérez-Castillo A, Testar X, Palacín M, Santos A, Zorzano A. Perinatal hypothyroidism impairs the normal transition of GLUT4 and GLUT1 glucose transporters from fetal to neonatal levels in heart and brown adipose tissue. Evidence for tissue-specific regulation of GLUT4 expression by thyroid hormone. *J Biol Chem*. 1994;269:5905-5912.
93. Kern M, Wells JA, Stephens JM, Elton CW, Friedman JE, Tapscott EB, Pekala PH, Dohm GL. Insulin responsiveness in skeletal muscle is determined by glucose transporter (Glut4) protein level. *Biochem J*. 1990;270:397-400.