

## Ejercicio y Restricción Alimenticia Aumentan el RNAm de Proteínas del Tránsito de $\text{Ca}^{2+}$ Miocárdico en Ratones

Mário Mateus Sugizaki<sup>1,2</sup>, Ana Paula Lima-Leopoldo<sup>2</sup>, Sandro José Conde<sup>2</sup>, Dijon Salome Campos<sup>2</sup>, Ricardo Damato<sup>2</sup>, André Soares Leopoldo<sup>2</sup>, André Ferreira do Nascimento<sup>2</sup>, Silvio de Assis Oliveira Júnior<sup>2</sup>, Antonio Carlos Cicogna<sup>2</sup>

Instituto de Ciências da Saúde - Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT, Campus de Sinop<sup>1</sup>, Cuiabá, MT; Faculdade de Medicina - Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus de Botucatu<sup>2</sup>, Botucatu, SP - Brasil

### Resumen

**Fundamento:** Entrenamiento físico (EF) aumenta la sensibilidad de las hormonas tiroideas (HT) y la expresión génica de estructuras moleculares envueltas en el movimiento intracelular de calcio del miocardio, mientras que la restricción alimenticia (RA) promueve efectos contrarios al EF.

**Objetivo:** Evaluar los efectos de la asociación EF y RA sobre los niveles plasmáticos de los HT y la producción de ARNm de los receptores HT y estructuras moleculares del movimiento de calcio del miocardio de ratones.

**Métodos:** Se utilizaron ratones Wistar Kyoto divididos en: control (C, n = 7), RA ( $R_{50}$ , n = 7), ejercicio físico (EX, n = 7) y ejercicio físico + RA ( $EX_{50}$ , n = 7). La RA fue de 50% y el EF fue natación (1 hora/día, cinco sesiones/semana, 12 semanas consecutivas). Se evaluaron las concentraciones séricas de triyodotironina ( $T_3$ ), tiroxina ( $T_4$ ) y hormona tireotrófica (TSH). El ARNm de la bomba de calcio del retículo sarcoplasmático (SERCA2a), fosfolamban (PLB), intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  (NCX), canal lento de calcio (canal-L), rianodina (RYR), calsequestrina (CQS) y receptor de HT ( $\text{TR}_{\alpha 1}$  y  $\text{TR}_{\beta 1}$ ) del miocardio fueron evaluados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real.

**Resultados:** RA redujo el  $T_4$ , TSH y ARNm del  $\text{TR}_{\alpha 1}$  y aumentó la expresión de la PLB, NCX y canal-L. EF aumentó la expresión del  $\text{TR}_{\beta 1}$ , canal-L y NCX. La asociación EF y RA redujo  $T_4$  y TSH y aumentó el ARNm del  $\text{TR}_{\beta 1}$ , SERCA2a, NCX, PLB y correlación del  $\text{TR}_{\beta 1}$  con la CQS y NCX.

**Conclusión:** Asociación EF y RA aumentó el ARNm de las estructuras moleculares calcio transiente, sin embargo el eje HT-receptor no parece participar de la transcripción génica de esas estructuras. (Arq Bras Cardiol 2011; 97(1):46-52)

**Palabras clave:** Ejercicio, restricción calórica, hormonas tiroideas, miocardio, proteínas de transporte, calcio.

### Introducción

Intervenciones como actividad física y restricción alimenticia (RA) han sido frecuentemente utilizadas procurando manutención de la salud o estética corporal. Entre tanto, dependiendo de la intensidad, duración y frecuencia de la RA y de la actividad física, pueden ocurrir daños al organismo<sup>1-7</sup>. Investigaciones muestran que esa asociación puede deprimir<sup>8</sup> o mejorar el desempeño cardíaco<sup>9,10</sup>.

Estructuras moleculares presentes en el sarcolema, canal lento de calcio tipo-L (canal-L) y el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  sodio/potasio (NCX), y presentes en el retículo sarcoplasmático, canal de rianodina, la calsequestrina (CQS), la bomba de calcio del retículo sarcoplasmático (SERCA2a) y la fosfolamban, están envueltas en el movimiento intracelular de calcio y participan en el proceso de contracción y relajación del músculo cardíaco<sup>11</sup>. Trabajos muestran que la RA promueve reducción

de la expresión génica de rianodina<sup>12</sup>, de la SERCA2<sup>13</sup>, de canal-L<sup>14</sup>, mientras que el entrenamiento físico (EF) aumenta el ARNm de la SERCA2<sup>15-17</sup>, de la rianodina<sup>18,19</sup> y del canal-L<sup>20</sup>. La transcripción de las estructuras moleculares envueltas en el movimiento intracelular de calcio puede ser modulada por las hormonas tiroideas (HT), vía receptores nucleares de HT<sup>21-23</sup>. Se sabe que la restricción alimenticia reduce la síntesis y liberación de las hormonas HT<sup>13</sup> y el ejercicio físico puede aumentar la liberación y/o la sensibilidad de esas hormonas<sup>21</sup>. Entre tanto, la relación entre RA, EF y las hormonas tiroideas no está establecida.

Hay escasa literatura que analiza la relación RA, entrenamiento físico, hormonas tiroideas y transcripción génica de estructuras moleculares del tránsito calcio miocárdico. Katzeff et al<sup>13</sup> verificaron reducción de los niveles plasmáticos de las hormonas HT y disminución de la expresión génica de SERCA2 de ratones restringidos. Iemitsu et al<sup>22</sup> mostraron que el entrenamiento físico aumentó la expresión de receptores  $\text{TR}_{\alpha 1}$  y  $\text{TR}_{\beta 1}$  y la transcripción génica de la SERCA2 en el miocardio de ratones añosos.

El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de la asociación del entrenamiento físico y de la RA sobre las concentraciones plasmáticas de las hormonas tiroideas y el

Correspondencia: Mário Mateus Sugizaki •

Av. Brasília, 1200 - Setor Industrial - 78550-000 - Sinop, MT - Brasil

E-mail: mario@ufmt.br, mario.sugizaki@ig.com.br

Artículo recibido el 07/09/10; revisado recibido el 09/09/10; aceptado el 25/02/11.

ARNm de los receptores HT, SERCA2a, canal-L, NCX, rianodina, calsequestrina y fosfolamban del miocardio de ratones.

## Métodos

### Animales y protocolo experimental

En el presente estudio fueron utilizados 28 ratones *Wistar-Kyoto* (WKY), con 60 días de edad, provenientes del Bioterio del Laboratorio Experimental del Departamento de Clínica Médica de la Facultad de Medicina de Botucatu. Durante la fase experimental, los animales fueron mantenidos en jaulas individuales, en ambiente con temperatura controlada ( $24 \pm 2^\circ \text{C}$ ), ciclo claro-oscuro (12:12 h) y alimentados con ración comercial y agua. El proyecto siguió normas establecidas en el *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* y los Principios Éticos en Experimentación Animal del *Colégio Brasileiro de Experimentação Animal* (Cobea) siendo aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de Botucatu - Unesp, bajo protocolo 575/2006.

Los ratones fueron divididos en cuatro grupos: *control* con ración *ad libitum* (C); restricción alimenticia de 50% ( $R_{50}$ ); ejercicio crónico con ración *ad libitum* (EX); ejercicio crónico con restricción alimenticia de 50% ( $EX_{50}$ ).

Los animales de los grupos C y EX recibieron ración comercial labina (Purina, Paulina, SP, Brasil) compuesta por 3,76% de grasa, 20,96% de proteína, 52,28% de carbohidrato, 9,60% de cenizas y 13,40% de humedad. Los animales de los grupos  $R_{50}$  y  $EX_{50}$  recibieron la misma ración comercial, sin embargo con una reducción de 50% de la cantidad media consumida por el grupo control. El período de RA fue de 90 días. El consumo de ración fue controlado diariamente y el peso de los animales fue monitoreado semanalmente.

El entrenamiento físico fue natación con sobrecarga de peso de 5% del peso corporal. Para las sesiones de natación, fueron utilizados tanques de fibra de vidrio con las siguientes dimensiones: 100 cm de largo, 80 cm de ancho y 80 cm de altura que contenían agua caliente a ( $32 \pm 1^\circ \text{C}$ ), mantenidos en el nivel de 60 cm. La sobrecarga de peso fue realizada por medio de plumas de pesca envueltas en esparadrapo y fijadas al tórax del ratón por medio de elástico. Fueron mantenidos a lo máximo seis animales por sesión de entrenamiento.

Los animales de los grupos EX y  $EX_{50}$  fueron sometidos a cinco sesiones de natación semanales, durante 12 semanas consecutivas. En la primera, segunda y tercera semana, los animales nadaron durante 30, 45 y 60 minutos, respectivamente, sin carga adicional. A partir de la cuarta semana, las sesiones de natación fueron de 60 minutos y con sobrecarga. Los ratones de esos grupos fueron previamente sometidos a un período de adaptación al agua. Durante una semana, fueron mantenidos durante 15 minutos en el interior del tanque conteniendo agua caliente, cuyo nivel inicial de agua era de 7,0 cm, siendo progresivamente aumentado, en el transcurso de la semana, hasta alcanzar la altura de 60 cm.

### Dosaje sérico de $T_3$ , $T_4$ y TSH

Previamente al sacrificio, los animales fueron mantenidos en ayuno de 12 horas y entonces fueron muertos por decapitación, previamente anestesiados con pentobarbital

sódico (0,1 ml/kg) y la sangre fue inmediatamente transferida a tubos de ensayo. Los dosajes de triyodotironina ( $T_3$ ), tiroxina ( $T_4$ ) y hormona tireotrófica (TSH) fueron determinados utilizando *kit* comercial específico para ratón, panel de tiroides (LINCOpex) en el laboratorio de análisis clínicos de la Gênese, São Paulo - Brasil.

### Evaluación de las características generales de los animales

Después de la colecta de sangre, el corazón fue removido, fueron disecados el atrio, el ventrículo derecho y el ventrículo izquierdo que fueron pesados y congelados para análisis de la expresión génica. Las variables morfológicas utilizadas para caracterizar cada grupo de animales fueron: peso corporal inicial (PCI) y final (PCF), peso del ventrículo izquierdo (VI), relación entre el peso del ventrículo izquierdo y el peso corporal final ( $VI/PCF \times 10^3$ ), peso del ventrículo derecho (VD), relación entre el peso del ventrículo derecho y el peso corporal final ( $VD/PCF \times 10^3$ ).

### Evaluación de la expresión génica por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real después de transcripción reversa

#### Extracción de ARN

Fragmentos del ventrículo izquierdo fueron rápidamente congelados en nitrógeno líquido y almacenados en freezer a  $-80^\circ \text{C}$ . La muestra congelada fue homogeneizada en aparato Polytron (Ika Ultra Turrax® T25 Basic, Wilmington, USA) después de adición de 1 ml de TRIzol® (Invitrogen Brasil, São Paulo) para cada 100 mg de tejido. El TRIzol®, solución monofásica de fenol y guanidina isotiocianato, tiene como finalidad mantener la integridad del ARN durante la lisis celular que ocurre en el proceso de homogeneización<sup>24</sup>.

La muestra homogeneizada fue transferida a un tubo e incubada a temperatura ambiente durante 5 minutos, para permitir la completa disociación del complejo núcleo-proteico. En seguida, fue adicionado cloroformo (Merck KGaA, Damstadt, Germany) en la proporción de 0,2 ml/1 ml TRIzol®; la muestra fue agitada, manualmente, con vigor por 15 segundos e incubada por 3 minutos a temperatura ambiente. Después de esa segunda incubación, el material fue centrifugado (Eppendorf 5804R, Hamburg, Germany), a 14.000 rpm durante 15 minutos a  $4^\circ \text{C}$ . En ese proceso la muestra quedó separada en tres fases: a) una inferior, de fenol-cloroformo y de coloración rosada, conteniendo ADN; b) una interfase blanca con proteínas; y c) una fase superior, acuosa, incolora, conteniendo ARN.

La porción de ARN fue transferida a un tubo con 0,5 ml de alcohol isopropílico (Merck KGaA, Damstadt, Germany). La muestra fue agitada manualmente 10 veces por inversión, incubada durante 10 minutos a temperatura ambiente y, posteriormente, centrifugada a 14.000 rpm durante 10 minutos a  $4^\circ \text{C}$ . El *pellet* fue lavado con alcohol etílico 75% (Merck KGaA, Damstadt, Germany) en la proporción de 1 ml/1 ml de TRIzol® y centrifugado a 7.500 rpm por 5 minutos a  $4^\circ \text{C}$ . Después de que se descartó alcohol etílico, el *pellet* fue secado 10 minutos a temperatura ambiente. El sedimento de ARN fue diluido en 30  $\mu\text{l}$  de agua ultrapura e incubado 10 minutos a  $60^\circ \text{C}$  en baño María (Fanem mod 100, São Paulo,

Brasil); ese procedimiento tuvo como finalidad inactivar la posible presencia de RNase.

El ARN fue analizado con auxilio de un espectrofotómetro (GeneCuant® ARN/ADN Calculator, Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, England) por la absorbancia en 260 nm. La pureza del ARN fue constatada por la razón de las absorbancias en 260/280 nm. Las muestras cuyas razones fueron inferiores a 1,6 fueron descartadas por presentar contaminación por proteínas.

### Verificación de la integridad del ARN por electroforesis

Muestras de 1,0 µl de ARN total diluidas en 8,0 µl de agua ultrapura y 1,0 µl de colorante (Orange G, Acros Organics, New Jersey, USA), fueron aplicadas en gel de agarosa 1% (0,3 g agarosa, 30 ml de TAE Buffer 1x, 3,0 µl de bromuro de etidio) y sometidas a un voltaje de 60 mV (Power Pac Basic® Bio-Rad) durante 20 minutos. La integridad del ARN fue constatada por la visualización de las bandas de ARN ribosómico, 28S y 18S, y ausencia de rastros de ARN en el gel. Las muestras que se mostraron íntegras fueron utilizadas como sustrato para la transcripción reversa.

### Transcripción reversa del ARN (RT)

Las muestras de ARN del músculo cardíaco fueron sometidas a transcripción reversa por la acción de la enzima transcriptasa reversa, utilizando *kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR*® (Invitrogen, Brasil, Son Paulo). Las muestras utilizadas en el experimento fueron incubadas en un termociclador (Mastercycler Gradient Eppendorf® Hamburg, Germany). Inicialmente una mezcla conteniendo 1.000 ng/ml de ARN total, 1,0 ml de *dNTP mix* 10 mM, 1,0 ml de random hexamers (50 ng/ml) y 8,0 ml de H<sub>2</sub>O DEPC (dietil pirocarbonato) fue incubada durante 5 minutos a 65° C. A continuación, después de adición de 9,0 ml de una solución conteniendo, 2,0 ml de tampón RT 10x, 4,0 ml de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2,0 ml de DTT 0.1 M y 1,0 ml de inhibidor de RNase, *RNaseOUT*®, la mezcla fue incubada por 2 minutos a 25° C. Después del agregado de 1,0 ml de la enzima *SuperScript II*®, se procedió a nueva incubación de 10, 50 y 15 minutos a 25° C, 42° C y 70° C, respectivamente. Después de adición de 1,0 ml de RNase H la solución fue incubada 20 minutos a 37° C.

Para chequear la calidad de la transcripción reversa, fueron empleados los métodos:

1) *Control positivo* - El *kit* contiene un ARN transcrito a partir del gen de la cloranfenicol acetiltransferasa y *primers* controles A y B. Esos *primers*, en la reacción en cadena de la polimerasa, generan un producto de 500 pares de base (pb);

2) *Control negativo* - Para comprobar la ausencia de ADN genómico residual una muestra de ARN fue sometida a la reacción de RT, sin embargo la enzima *SuperScript II*® fue substituida por 1,0 ml de H<sub>2</sub>O DEPC. Ese producto fue utilizado en las reacciones de PCR y la ausencia de ADN genómico residual fue confirmada por la ausencia de productos de amplificación.

### Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Alícuotas de la reacción de RT conteniendo 2,0 µg de cADN fueron adicionadas a una mezcla conteniendo *TaqMan*® *Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems) y ensayo

customizado conteniendo primers "sense" y "anti-sense" y sonda *Taqman*® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) específicos para cada gen, y el volumen completado para 25 ml con agua tratada con DEPC. Las reacciones fueron realizadas por triplicado para cada gen blanco en el Sistema *Real Time PCR 7500* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para cada muestra fue planteado un gráfico de amplificación mostrando aumento del *reporter dye* fluorescente ( $\Delta Rn$ ) en cada ciclo de la PCR. A partir de ese gráfico, fue determinado el ciclo donde la reacción cruza el umbral de detección (*cycle threshold - C<sub>t</sub>*), basado en la variabilidad de los datos de la *baseline* obtenidos a partir de los ciclos iniciales de la PCR. Los *primers* para los genes analizados (cuadro 1) fueron obtenidos por medio del software *Primer Express*® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), a partir de secuencias publicadas en el GenBank (www.pubmed. con). La cuantificación relativa de cada gen, normalizada por la referencia endógena (ciclofilina), fue realizada de acuerdo con el *User Bulletin #2* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### Análisis estadístico

Los resultados experimentales fueron expresados como media ± DE. Las comparaciones entre los grupos fueron realizadas por análisis de varianza (ANOVA) de los factores, ejercicio y dieta, seguida con el test de Tukey. Las relaciones entre el ARNm de la SERCA2a, PLB, CQS, NCX, canal-L y RYR2 y receptores de las hormonas tiroideas, TR<sub>β1</sub> y TR<sub>α1</sub>, fueron medidas por el coeficiente de correlación de Pearson. El nivel de significación fue de 5%.

## Resultados

Las características generales de los animales están presentadas en la tabla 1. Los pesos corporales iniciales y

Cuadro 1 - Primers utilizados

Gen	Código
SERCA2a	Rn00568762_m1
PLB	Rn01434045m_1
RyR2	Rn01470303_m1
CSQ2	Rn00567508_m1
NCX	Rn00570527_m1
Canal de calcio tipo-L	Rn00709287_m1
TR <sub>α1</sub>	Rn00579692m1
TR <sub>β1</sub>	Rn00562044_m1
Ciclofilina	Rn00690933_m1

SERCA2a - Calcio ATPase del retículo sarcoplasmático (RS), isoforma cardíaca responsable por la captación de Ca<sup>2+</sup> para el RS; PLB - fosfolambam, proteína que actúa como inhibidor de la captación de Ca<sup>2+</sup> de la SERCA2a; RyR2 - receptor rianodina, vía de salida del Ca<sup>2+</sup> del RS para el citosol; CSQ - calsequestrina, proteína abundante en el interior del RS que actúa como reservorio de Ca<sup>2+</sup>; NCX - intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> presente en el sarcolema, responsable por la expulsión del Ca<sup>2+</sup> al medio extracelular; Canal de calcio tipo-L - canal lento de Ca<sup>2+</sup> del sarcolema, es abierto por la llegada potencial de acción; TR<sub>α1</sub> - receptor de hormona tiroidea; TR<sub>β1</sub> - receptor de hormona tiroidea; Ciclofilina - gen constitutivo, utilizado en la normalización de la cantidad del producto transcripto del gen-blanco.

las relaciones VD/PCF no fueron diferentes entre los grupos. Los animales con restricción, R<sub>50</sub> y EX<sub>50</sub>, presentaron pesos corporales finales, del VI, VD, atrio y consumo de ración, significativamente inferiores a los respectivos controles (C vs R<sub>50</sub> y EX vs EX<sub>50</sub>). Los animales entrenados, EX y EX<sub>50</sub>, presentaron reducción en los pesos corporales finales en relación a los ratones C y R<sub>50</sub> respectivamente. Los ratones EX aumentaron el peso del atrio en relación a los animales C. La relación VI/PCF aumentó significativamente en los animales EX<sub>50</sub> cuando fueron comparados a los animales EX.

La tabla 2 presenta los resultados de la evaluación del ARNm por la técnica de PCR en tiempo real. Se verificó que los animales R<sub>50</sub> aumentaron la expresión del NCX, canal de calcio-L y PLB y redujeron la expresión del TR<sub>α1</sub> en relación a los ratones controles. Los animales del grupo EX aumentaron la expresión del NCX, canal-L y del receptor TR<sub>β1</sub> en relación a los animales controles. La asociación del entrenamiento físico y RA, grupo EX<sub>50</sub>, aumentó la expresión de la SERCA2a, NCX y PLB en relación a los animales EX y R<sub>50</sub>. Además de eso, los animales EX<sub>50</sub> presentaron aumento en la expresión del TR<sub>β1</sub> cuando fueron comparados a los ratones R<sub>50</sub>.

Los dosajes séricos de T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> y TSH están presentados en la tabla 3. No hubo alteración en la concentración sérica del T<sub>3</sub> por la acción de la RA o entrenamiento físico. Los ratones entrenados, EX, no presentaron alteración de las concentraciones séricas de T<sub>4</sub> y TSH. Entre tanto, se verificó significativa reducción del T<sub>4</sub> y TSH en los grupos R<sub>50</sub> y EX<sub>50</sub> en relación a los respectivos controles (C vs R<sub>50</sub> y EX vs EX<sub>50</sub>).

Los coeficientes de correlación y las significaciones entre ARNm de las estructuras del tránsito calcio y receptores de hormonas tiroideas están en la tabla 4. Están presentadas solamente las correlaciones positivas (r > 0,70) en el grupo EX<sub>50</sub>, ya que el objetivo de ese estudio fue evaluar la asociación y entrenamiento físico y restricción alimenticia sobre la transcripción génica de estructuras moleculares envueltas en el tránsito de calcio y la influencia del eje HT - receptor en el miocardio. Así, los coeficientes de correlación para los grupos C, R<sub>50</sub> y EX fueron presentados para definir las participaciones de los factores ejercicio, restricción alimenticia y asociación entre los dos factores.

Se observó que el gen del TR<sub>β1</sub> presenta más correlaciones con las estructuras moleculares del tránsito de calcio que el gen TR<sub>α1</sub> (tab. 4). Aunque los ARNm del canal-L y PLB hayan presentado aumento significativo en los ratones EX<sub>50</sub>, esos genes no presentaron correlación con los genes del TR<sub>α1</sub> o TR<sub>β1</sub>. El ARNm de la rianodina tuvo significativa correlación con el

Tabla 2 - Evaluación del ARNm por PCR tiempo real

	C n = 7	R <sub>50</sub> n = 7	EX n = 7	EX <sub>50</sub> n = 7
Canal-L	1,00 ± 0,34	2,34 ± 0,48 *	3,60 ± 0,76 *	2,74 ± 0,76*
NCX	1,00 ± 0,32	1,89 ± 0,56 *	2,48 ± 0,33*	3,13 ± 0,52 *†‡
RyR2	1,00 ± 0,18	1,08 ± 0,17	1,11 ± 0,23	1,26 ± 0,23
Serca2a	1,00 ± 0,36	0,92 ± 0,27	1,04 ± 0,24	1,42 ± 0,10 *†‡
PLB	1,00 ± 0,09	1,25 ± 0,19 *	1,14 ± 0,22	1,51 ± 0,26 *†‡
CSQ2	1,00 ± 0,29	1,03 ± 0,21	1,07 ± 0,22	1,27 ± 0,25
TR <sub>α1</sub>	1,00 ± 0,29	0,67 ± 0,16 *	0,78 ± 0,23	0,86 ± 0,26
TR <sub>β1</sub>	1,00 ± 0,29	0,96 ± 0,25	1,47 ± 0,40*	1,66 ± 0,17*†

Valores expresados en media ± desviación estándar; C - ratones-control; R<sub>50</sub> - ratones con restricción de ingestión alimenticia (RA) de 50%; EX - ratones entrenados; EX<sub>50</sub> - ratones entrenados con RA de 50%; RyR2 - canal rianodina; Serca2a - bomba de calcio del retículo sarcoplasmático; PLB - fosfolamban; CSQ2 - calsequestrina; NCX - intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>; TR - receptor de hormona tiroidea; \* versus C; † versus R<sub>50</sub>; ‡ versus EX, ANOVA, Tukey, p < 0,05.

Tabla 3 - Concentración plasmática de los hormonas tiroideas

	C n = 7	R <sub>50</sub> n = 7	EX n = 7	EX <sub>50</sub> n = 7
T <sub>3</sub> (mg/dl)	4,35 ± 1,32	3,11 ± 1,34	5,52 ± 2,72	3,96 ± 2,36
T <sub>4</sub> (mg/dl)	242 ± 29	113 ± 17 *	191 ± 61	126 ± 6 *†
TSH (mg/dl)	6,35 ± 1,77	1,94 ± 0,75 *	5,07 ± 3,13	1,54 ± 0,66 *†

Valores expresados en media ± desviación estándar; C - ratones-control; R<sub>50</sub> - ratones con restricción de ingestión alimenticia (RA) de 50%; EX - ratones entrenados; EX<sub>50</sub> - ratones entrenados con RA de 50%; T<sub>3</sub> - triyodotironina; T<sub>4</sub> - tiroxina; TSH - hormona tireotrófica; \* versus C; † versus EX - ANOVA, Tukey, p < 0,05.

Tabla 1 - Características generales de los animales

	C n = 7	R <sub>50</sub> n = 7	EX n = 7	EX <sub>50</sub> n = 7
Consumo de ración (g)	20,2 ± 2,3	10,1 ± 1,1 *	20,7 ± 2,5	10,4 ± 1,2 *
PCI (g)	292 ± 12	291 ± 21	294 ± 10	293 ± 17
PCF (g)	354 ± 19	219 ± 8*	333 ± 16 *	207 ± 8 *†‡
VI (g)	0,694 ± 0,064	0,462 ± 0,016 *	0,672 ± 0,053	0,474 ± 0,024 *
VD (g)	0,213 ± 0,030	0,126 ± 0,019 *	0,217 ± 0,050	0,149 ± 0,022 *
Atrio (g)	0,059 ± 0,006	0,042 ± 0,005 *	0,077 ± 0,013 *	0,049 ± 0,006 *†
VI/PCF (mg/g)	1,962 ± 0,139	2,135 ± 0,142	2,017 ± 0,122	2,284 ± 0,100 *†
VD/PCF (mg/g)	0,601 ± 0,069	0,571 ± 0,069	0,654 ± 0,177	0,721 ± 0,121

Valores expresados en media ± desviación estándar; C - ratones-control; R<sub>50</sub> - ratones con restricción de ingestión alimenticia (RA) de 50%; EX - ratones entrenados; EX<sub>50</sub> - ratones entrenados con RA de 50%; PCI - peso corporal inicial (g); PCF - peso corporal final (g); VI - peso del ventrículo izquierdo (g); VD - peso del ventrículo derecho (g); \* versus C; † versus R<sub>50</sub>; ‡ versus EX - ANOVA, Tukey, p < 0,05.

**Tabla 4 - Coeficiente de correlación de Pearson entre ARNm de proteínas del tránsito de calcio y receptores de hormonas tiroideas**

	C n = 7	R <sub>50</sub> n = 7	EX n = 7	EX <sub>50</sub> n = 7
NCX x TR <sub>α1</sub>	r = 0,09 p = 0,85	r = 0,18 p = 0,71	r = 0,16 p = 0,73	r = 0,73 p = 0,06
RyR2 x TR <sub>β1</sub>	r = 0,78 p = 0,037	r = 0,80 p = 0,03	r = 0,69 p = 0,09	r = 0,96 p = 0,0007
Serca2a x TR <sub>β1</sub>	r = 0,11 p = 0,82	r = 0,67 p = 0,09	r = 0,69 p = 0,09	r = 0,72 p = 0,07
CSQ2 x TR <sub>β1</sub>	r = 0,32 p = 0,49	r = -0,46 p = 0,30	r = 0,04 p = 0,93	r = 0,91 p = 0,004

C - ratones-control; R<sub>50</sub> - ratones con restricción de ingestión alimenticia (RA) de 50%; EX - ratones entrenados; EX<sub>50</sub> - ratones entrenados con RA de 50%; RyR2 - rianodina; Serca2a - bomba de calcio del retículo sarcoplasmático; PLB - fosfolamban; CSQ2 - calsequestrina; NCX - intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>; TR - receptor de hormona tiroidea; r - coeficiente de correlación; p - nivel de significación.

ARNm del TR<sub>β1</sub> en todos grupos y fue mayor en la asociación de la RA con entrenamiento físico. El ARNm de la SERCA2a también presentó buena correlación con el ARNm del TR<sub>β1</sub> en los grupos R<sub>50</sub>, EX y EX<sub>50</sub> a pesar de no ser estadísticamente significativo, lo que puede ser decurrente del bajo número de muestras. Los genes calsequestrina y NCX presentaron correlación con el ARNm TR<sub>β1</sub> y TR<sub>α1</sub>, respectivamente, solamente en el grupo EX<sub>50</sub> indicando la dependencia de la asociación de los dos factores. Es interesante resaltar que el ARNm de la CQS y RYR2 presentaron fuerte correlación con TR<sub>β1</sub> en los animales EX<sub>50</sub>. Entre tanto, no hubo aumento de expresión génica de la CQS y RYR2 en ese grupo. Contrariamente, el gen NCX aumentó, pero presentó correlación apenas con el gen TR<sub>α1</sub>. El gen de la SERCA2a fue el único que presentó correlación con el ARNm de la TR<sub>β1</sub> y aumento en la expresión génica en los animales EX<sub>50</sub>.

## Discusión

El objetivo de este estudio fue evaluar la participación de las hormonas tiroideas en la asociación entre la severa restricción alimenticia y entrenamiento físico y la correlación entre los receptores de HT y la expresión génica de las estructuras moleculares envueltas en el movimiento de calcio intracelular del miocardio. Los resultados de este estudio mostraron que el entrenamiento físico asociado a la severa RA promovió aumento significativo del ARNm de la SERCA2a, del canal-L, de la fosfolamban y del intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>. Esas alteraciones fueron acompañadas por elevación en la expresión de los receptores de hormonas tiroideas (TR<sub>β1</sub>) a pesar de que los niveles séricos de T<sub>3</sub> estaban normales y T<sub>4</sub> y TSH reducidos.

Los protocolos de RA y entrenamiento físico promovieron importantes alteraciones morfológicas (tab. 1). Las reducciones del peso corporal, peso del VD y peso del VI inducidas por la RA están asociadas al grado de restricción calórica. Restricción alimenticia, exceso de ingestión o estado de ayuno alteran el gasto energético y la composición corporal<sup>25</sup>. La reducción del gasto energético durante la restricción alimenticia ha sido documentada y representa un mecanismo de conservación

de energía, que previene la pérdida de peso corporal en exceso<sup>25</sup>. Las cámaras cardíacas fueron reducidas en la misma proporción de la reducción de peso corporal, como es observado por las relaciones VI/PC y VD/PC. La disminución del peso corporal por el entrenamiento físico está asociada al aumento del gasto energético decurrente de las sesiones de entrenamiento físico; las relaciones VI/PC y VD/PC fueron mantenidas en relación al grupo control. La asociación del EF y RA intensificó la reducción de peso corporal, sin embargo preservó la masa del VI y del VD y mantuvo las relaciones VI/PC y VD/PC cuando fueron comparados con los ratones R<sub>50</sub>. Así, los resultados referentes a las cámaras cardíacas indican que la RA promovió significativa reducción de la masa cardíaca y el entrenamiento físico, aislado o asociado a RA, no promovió hipertrofia cardíaca. Esos resultados fueron semejantes a los constatados en estudios anteriores<sup>10</sup>.

La RA, aislada o en ratones entrenados, redujo los niveles de T<sub>4</sub> y TSH, mientras que el entrenamiento físico no alteró los niveles séricos de las hormonas tiroideas. A pesar de que la RA redujo el nivel sérico de T<sub>3</sub> en 29% en ambos grupos (R<sub>50</sub> y EX<sub>50</sub>), esa reducción no fue de magnitud suficiente para mostrar diferencia estadística entre los grupos. La ausencia de alteración en los niveles de T<sub>3</sub> puede ser decurrente del dosaje del T<sub>3</sub> total y no del T<sub>3</sub> libre, que es la forma activa de la hormona. Datos de literatura indican que, en estados de ayuno y severa restricción calórica, ocurren acentuado aumento de T<sub>3</sub> reverso<sup>13</sup>. Así es posible que la relación entre T<sub>3</sub> libre y T<sub>3</sub> reverso haya sido reducida en los animales sometidos a RA. Se cree que la privación de energía puede modular la concentración sérica de T<sub>3</sub> y reducir la actividad o concentración de yodotironina deiodinasa que convierte T<sub>4</sub> en T<sub>3</sub><sup>26</sup>. La significativa reducción de los niveles séricos de T<sub>4</sub> y TSH inducido por la RA indica estado de hipotiroidismo, lo que también fue observado en estudios experimentales<sup>8,13,27,28</sup> y clínicos<sup>29</sup>. El mecanismo responsable por la reducción de los niveles plasmáticos de las hormonas tiroideas inducida por la RA puede estar relacionado a la propia reducción en el consumo energético. La reducción de los niveles de hormonas tiroideas está relacionada al mecanismo de conservación de energía, una vez que esas hormonas son los principales responsables por el gasto energético<sup>25</sup>. Considerando que el gasto energético es reducido en la restricción alimenticia, sería esperada reducción de los niveles de HT. El entrenamiento físico no promovió alteraciones en los niveles plasmáticos de las hormonas tiroideas. Este resultado difiere del observado por Iemitsu et al<sup>22</sup> y Katzeff et al<sup>13</sup>, que verificaron aumento en los niveles séricos de T<sub>4</sub>. Esa discrepancia de resultados puede haber sido decurrente del tipo, intensidad y volumen de entrenamiento físico. En conclusión, mientras que la RA promovió el estado de hipotiroidismo, el entrenamiento físico parece no tener efecto directo sobre la acción de las hormonas tiroideas.

En el corazón de ratones, más de 70% de todos los receptores HT son TR<sub>α1</sub>, con TR<sub>β1</sub> constituyendo apenas 30%<sup>30</sup>. La hormona tiroidea se liga a elementos responsivos de tiroides (receptores de HT) en regiones promotoras de varios genes, regulando la transcripción de genes blanco en el corazón incluyendo intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>, rianodina, canal de calcio tipo-L y principalmente SERCA2a y fosfolamban<sup>30</sup>.

Esa regulación por el HT es un importante mecanismo en el proceso de contracción y relajación del miocardio<sup>31</sup>.

Los resultados de este estudio indican que el estado de hipotiroidismo inducido por la RA redujo la expresión del gen  $TR_{\alpha 1}$ , receptor predominante del miocardio. Ese resultado era esperado, una vez que la reducción de HT acarrea *feedback* negativo en el receptor HT. El entrenamiento físico, aislado o asociado a RA, aumentó la expresión del  $TR_{\beta 1}$  sin alterar los niveles de  $TR_{\alpha 1}$ . La escasa literatura sobre el papel de los receptores  $TR_{\alpha 1}$  y  $TR_{\beta 1}$  en la transcripción génica de proteínas del tránsito de calcio del miocardio. Kinugawa et al<sup>21</sup> mostraron que el  $TR_{\alpha 1}$  está relacionado con transcripción de la  $\alpha$ -MHC y síntesis proteica miocárdica, mientras que el  $TR_{\beta 1}$  está relacionado con SERCA2a, el propio  $TR_{\beta 1}$  e inhibición de la  $\beta$ -MCH. Así, nuestros datos sugieren que la reducción del gen  $TR_{\alpha 1}$  por la RA podría ser un mecanismo asociado a la pérdida de masa cardíaca; la ausencia de hipertrofia en los animales entrenados podría ser decurrente de la manutención de los niveles de  $TR_{\alpha 1}$ .

Los efectos de las intervenciones, RA y EF, resultaron en alteraciones en el ARNm de las estructuras moleculares reguladoras del tránsito de calcio (tab. 2). El aumento de la SERCA2a y PLB en los ratones EX<sub>50</sub> observados en este estudio sugiere que el proceso de recaptura de calcio por el retículo sarcoplasmático (RS) puede estar facilitado. La explicación para esa hipótesis se basa en los datos referentes a los efectos de la RA que, aisladamente, promovió solamente aumento de la PLB indicando empeoramiento en el proceso de recaptura de calcio por el RS. Como ese proceso es dependiente de ATP y, en la severa restricción alimenticia, se necesita economía de energía, el aumento de la fosfolamban podrá acarrear reducción de la actividad de la SERCA2a. Cuando la RA fue asociada al entrenamiento físico hubo aumento proporcional de la SERCA2a y de la PLB, indicando que el entrenamiento físico protegió al miocardio de los daños provocados por la RA. La mejora en el proceso de recaptura de calcio por el RS inducido por el entrenamiento físico está de acuerdo con estudios de Kemi et al<sup>22</sup> que observaron aumento de la recaptura de calcio en el miocardio decurrente de la elevación de la SERCA2a y fosfolamban fosforilada (PLB-thr17) en ratones entrenados. El aumento del canal de calcio-L observado en los animales EX<sub>50</sub> sugiere un aumento del influjo de calcio en el sentido de mejorar la respuesta contráctil. La elevación del gen NCX tendría como finalidad compensar el aumento del influjo de calcio por los canales lentos de calcio sarcolemal.

En este estudio no fue posible relacionar los receptores HT con las estructuras moleculares del tránsito de calcio en el miocardio de ratones entrenados y sometidos a severa RA, considerando que el test de correlación no mostró significación en el ARNm de la SERCA2a, PLB, NCX, canal-L con los receptores  $TR_{\alpha 1}$  o  $TR_{\beta 1}$ . Datos de literatura muestran asociación de las estructuras moleculares envueltas en el movimiento de calcio con receptores de HT inducidos por el entrenamiento o estado de hipotiroidismo; Iemitsu et al<sup>22</sup> verificaron aumento significativo en la expresión de los receptores  $TR_{\alpha 1}$  y  $TR_{\beta 1}$  acompañado de aumento en la expresión de la SERCA2a por el entrenamiento físico. En condiciones de hipotiroidismo, la insuficiencia de la tiroides

está asociada a disminución de la SERCA2a y aumento de la fosfolamban<sup>23</sup>, aumento en la expresión del NCX<sup>33</sup> y niveles de canal-L inalterados<sup>34</sup> o aumentados<sup>35</sup>.

Los mecanismos moleculares para el aumento de la transcripción génica de la SERCA2, PLB y NCX en el ejercicio aislado o asociado a la RA aun no están aclarados; como fue citado anteriormente, nuestros hallazgos sugieren que los HT y/o receptores de HT no participan en la transcripción génica de las estructuras moleculares del tránsito de calcio en ese grupo de animales. El proceso de remodelación cardíaca es consecuente de estímulos extracelulares que activan señales citosólicas complejas, con números puntos de integración, y procesos transcripcionales nucleares. Entre los estímulos extracelulares los agonistas de receptores acoplados a proteína G (angiotensina, endotelinas, catecolaminas), citocinas y factores de crecimiento (IGF, TGF, FGF) son los principales candidatos que podrían, por lo tanto, estimular la transcripción génica de estructuras del movimiento de calcio<sup>36,37</sup>. Entre tanto, no existen datos de literatura que permitan especular sobre los mecanismos responsables por el aumento de la transcripción génica de la SERCA2, PLB y NCX en la interacción ejercicio y restricción alimenticia.

#### Limitaciones del estudio

Nuestros hallazgos de expresión génica de ARNm obtenidos por medio de PCR cuantitativo de la SERCA2a, fosfolamban, intercambiador  $Na^+/Ca^{+2}$ , canal de calcio tipo-L, calsequestrina y receptores de HT pueden no traducirse en formación de proteínas. Datos recientes obtenidos en nuestro laboratorio verificaron significativa reducción de la expresión proteica del canal tipo-L en ratones con severa RA, contrariando nuestros hallazgos de aumento de ARNm de la misma proteína<sup>14</sup>. Por lo tanto, la continuidad de esos hallazgos será la determinación de la expresión proteica por Western Blot. Tampoco fue posible establecer una relación de causa-efecto de los hormonas tiroideas y/o receptores de HT con el ARNm del tránsito de calcio; serían necesarios estudios con tratamiento de HT o utilizando animales monoclonales específicos para HT.

En conclusión, los datos del trabajo mostraron aumento de la expresión de ARNm de las estructuras moleculares envueltas en el movimiento intracelular de calcio en animales sometidos a severa restricción y entrenamiento físico. A pesar de que la asociación EF y RA induce estado de hipotiroidismo, el eje HT-receptor no parece participar de la transcripción del ARNm de las proteínas del tránsito de calcio del miocardio.

#### Potencial Conflicto de Intereses

Declaro no haber conflicto de intereses pertinentes.

#### Fuentes de Financiación

FAPESP financió el presente estudio.

#### Vinculación Académica

No hay vinculación de este estudio a programas de post grado.

## Referencias

1. Keenan KP, Laroque P, Ballam GC, Soper KA, Dixit R, Mattson BA, et al. The effects of diet, ad libitum overfeeding, and moderate dietary restriction on the rodent bioassay: the uncontrolled variable in safety assessment. *Toxicol Pathol.* 1996;24(6):757-68.
2. Venditti P, Di Meo S. Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. *Arch Biochem Biophys.* 1996;331(1):63-8.
3. Lesourd BM, Mazari L. Immune responses during recovery from protein-energy malnutrition. *Clin Nutr.* 1997;16(Suppl 1):37-46.
4. Torun B, Chew F. Protein-energy malnutrition. In: Shils ME, Ross AC. (eds). *Modern nutrition in health and disease.* Baltimore: Williams & Wilkins; 1999. p.936-88.
5. Liu J, Yeo HC, Overvik-Douki E, Hagen T, Doniger SJ, Chyu DW, et al. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J Appl Physiol.* 2000;89(1):21-8.
6. Ramsey JJ, Harper ME, Weindruch R. Restriction of energy intake, energy expenditure, and aging. *Free Radic Biol Med.* 2000;29(10):946-68.
7. Perez AC, Cabral de Oliveira AC, Estevez E, Molina AJ, Prieto JC, Alvarez AI. Mitochondrial, sarcoplasmic membrane integrity and protein degradation in heart and skeletal muscle in exercised rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2003;134(2):199-206.
8. Haddad F, Bodell PW, McCue SA, Herrick RE, Baldwin KM. Food restriction-induced transformations in cardiac functional and biochemical properties in rats. *J Appl Physiol.* 1993;74(2):606-12.
9. Broderick TL, Driedzic WR, Gillis M, Jacob J, Belke T. Effects of chronic food restriction and exercise training on the recovery of cardiac function following ischemia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2001;56(1):B33-7.
10. Sugizaki MM, Dal Pai-Silva M, Carvalho RF, Padovani CR, Bruno A, Nascimento AF, et al. Exercise training increases myocardial inotropic response in food restricted rats. *Int J Cardiol.* 2005;112(2):191-201.
11. Opie LH, Bers DM. Excitation-contraction coupling and calcium. In: Opie LH (ed). *Heart physiology: from cell to circulation.* 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 159-85.
12. Vizotto VA, Carvalho RF, Sugizaki MM, Lima AP, Aragon FF, Padovani CR, et al. Down-regulation of the cardiac sarcoplasmic reticulum ryanodine channel in severely food-restricted rats. *Braz J Med Biol Res.* 2007;40(1):27-31.
13. Katzef HL, Powell SR, Ojamaa K. Alterations in cardiac contractility and gene expression during low-T3 syndrome: prevention with T3. *Am J Physiol.* 1997;273(5 Pt 1):E951-6.
14. De Tomasi LC, Bruno A, Sugizaki MM, Lima-Leopoldo AP, Nascimento AF, Junior SA, et al. Food restriction promotes downregulation of myocardial L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Can J Physiol Pharmacol.* 2009;87(6):426-31.
15. Buttrick PM, Malhotra A, Scheuer J. Effects of systolic overload and swim training on cardiac mechanics and biochemistry rats. *J Appl Physiol.* 1988;64(4):1466-71.
16. Tate CA, Hergason T, Hyek MF, McBride RP, Chen M, Richardson MA, et al. SERCA2a and mitochondrial cytochrome oxidase expression are increased in hearts of exercise-trained old rats. *Am J Physiol.* 1996;271(1 Pt 2):H68-72.
17. Wisloff U, Loennechen JP, Falck G, Beisvag V, Currie S, Smith G, et al. Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. *Cardiovasc Res.* 2001;50(3):495-508.
18. Stauffer B, Mitro G, Moore RL. Chronic treadmill running does not influence ryanodine binding to rat myocardium. *Med Sci Sports Exerc.* 1993;25(5):S98.
19. Lankford EB, Korzick DH, Palmer BM, Stauffer BL, Cheung JY, Moore RL. Endurance exercise alters the contractile responsiveness of rat heart to extracellular Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>. *Med Sci Sports Exerc.* 1998;30(10):1502-9.
20. Mokolke EA, Palmer BM, Cheung JY, Moore RL. Endurance training does not affect intrinsic calcium current characteristics in rat myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1997;273(3 Pt 2):H1193-7.
21. 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;89(7):591-8.
22. Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, Tanabe T, Takanashi M, Matsuda M, et al. Exercise training improves cardiac function-related gene levels through thyroid hormone receptor signaling in aged rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286(5):H1696-705.
23. Dillmann WH. Biochemical basis of thyroid hormone action in the heart. *Am J Med.* 1990;88(6):626-30.
24. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.
25. Passadore MD, Griggio MA, Nunes MT, Luz J. Effects of ageing on the energy balance of food-restricted rats. *Acta Physiol Scand.* 2004;181(2):193-8.
26. Katzef HL, O'Connell M, Horton ES, Danforth Jr E, Young JB, Landsberg L. Metabolic studies in human obesity during overnutrition and undernutrition: thermogenic and hormonal responses to norepinephrine. *Metabolism.* 1986;35(2):166-75.
27. Katzef HL, Selgrad C. Maintenance of thyroid hormone production during exercise-induced weight loss. *Am J Physiol.* 1991;261(3 Pt 1):E382-8.
28. Cokelaere M, Decuyper E, Flo G, Darras VM, Kühn ER. Influence of feeding pattern on thyroid hormones in long-term food-restricted rats. *Horm Metab Res.* 1996;28(7):315-8.
29. Fontana L, Klein S, Holloszy JO, Premachandra BN. Effect of long-term calorie restriction with adequate protein and micronutrients on thyroid hormones. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(8):3232-5.
30. Dillmann WH. Cellular action of thyroid hormone on the heart. *Thyroid.* 2002;12(6):447-52.
31. Carr AN, Kranias EG. Thyroid hormone regulation of calcium cycling proteins. *Thyroid.* 2002;12(6):453-7.
32. Kemi OJ, Ellingsen O, Ceci M, Grimaldi S, Smith GL, Condorelli G, et al. Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca<sup>2+</sup> cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;43(3):354-61.
33. Arai M, Otsu K, MacLennan DH, Periasamy M. Regulation of sarcoplasmic reticulum gene expression during cardiac and skeletal muscle development. *Am J Physiol.* 1992;262(3 Pt 1):C614-20.
34. Seppet EK, Kolar F, Dixon IM, Hata T, Dhalla NS. Regulation of cardiac sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> channels and Ca<sup>2+</sup> transporters by thyroid hormone. *Mol Cell Biochem.* 1993;129(2):145-59.
35. Hawthorn MH, Gengo P, Wei XY, Rutledge A, Moran JF, Gallant S, et al. Effect of thyroid status on beta-adrenoceptors and calcium channels in rat cardiac and vascular tissue. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1988;337(5):539-44.
36. Franchini KG. Hipertrofia cardíaca: mecanismos moleculares. *Rev Bras Hipertens.* 2001;8(1):125-42.
37. Swynghedauw B. Phenotypic plasticity of adult myocardium: molecular mechanisms. *J Exp Biol.* 2006;209(Pt 12):2320-7.