

# Exercício e Restrição Alimentar Aumentam o RNAm de Proteínas do Trânsito de $\text{Ca}^{2+}$ Miocárdico em Ratos

*Upregulation of mRNA Myocardium Calcium Handling in Rats Submitted to Exercise and Food Restriction*

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

## Resumo

**Fundamento:** Treinamento físico (TF) aumenta a sensibilidade dos hormônios tireoidianos (HT) e a expressão gênica de estruturas moleculares envolvidas no movimento intracelular de cálcio do miocárdio, enquanto a restrição alimentar (RIA) promove efeitos contrários ao TF.

**Objetivo:** Avaliar os efeitos da associação TF e RIA sobre os níveis plasmáticos dos HT e a produção de mRNA dos receptores HT e estruturas moleculares do movimento de cálcio do miocárdio de ratos.

**Métodos:** Utilizaram-se ratos Wistar Kyoto divididos em: controle (C, n = 7), RIA (R<sub>50</sub>, n = 7), exercício físico (EX, n = 7) e exercício físico + RIA (EX<sub>50</sub>, n = 7). A RIA foi de 50% e o TF foi natação (1 hora/dia, cinco sessões/semana, 12 semanas consecutivas). Avaliaram-se as concentrações séricas de triiodotironina (T<sub>3</sub>), tiroxina (T<sub>4</sub>) e hormônio tireotrófico (TSH). O mRNA da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA2a), fosfolamban (PLB), trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (NCX), canal lento de cálcio (canal-L), rianodina (RYR), calsequestrina (CQS) e receptor de HT (TR<sub>α1</sub> e TR<sub>β1</sub>) do miocárdio foram avaliados por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.

**Resultados:** RIA reduziu o T<sub>4</sub>, TSH e mRNA do TR<sub>α1</sub> e aumentou a expressão da PLB, NCX e canal-L. TF aumentou a expressão do TR<sub>β1</sub>, canal-L e NCX. A associação TF e RIA reduziu T<sub>4</sub> e TSH e aumentou o mRNA do TR<sub>β1</sub>, SERCA2a, NCX, PLB e correlação do TR<sub>β1</sub> com a CQS e NCX.

**Conclusão:** Associação TF e RIA aumentou o mRNA das estruturas moleculares cálcio transiente, porém o eixo HT-receptor não parece participar da transcrição gênica dessas estruturas. (Arq Bras Cardiol. 2011; [online].ahead print, PP.0-0)

**Palavras-chave:** Exercício, restrição calórica, hormônios tireoideanos, miocárdio, proteínas de transporte, cálcio.

## Abstract

**Background:** Chronic exercise and food restriction (FR) have directionally opposite changes in transcription of molecular structures of calcium handling and thyroid hormone (TH) status.

**Objective:** Evaluate the association of chronic exercise and FR on serum thyroid hormones and gene transcription of molecular structures of intracellular calcium transients and thyroid receptors in myocardium of rats.

**Methods:** Male Wistar Kyoto rats, divided into two groups: control (C, n = 7), FR (R<sub>50</sub>, n = 7), chronic exercise (EX, n = 7) and chronic exercise + FR (EX<sub>50</sub>, n = 7). FR was of 50% and exercise was swimming (1 hour/day, 5 days/week, during 12 weeks). Serum concentrations of T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> and TSH were determined. The mRNA gene expression of the sarcoplasmic reticulum calcium pump (SERCA2a), phospholamban (PLB), Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger (NCX), calcium channel L-type (L-channel), ryanodine (RYR), calsequestrin (CQS) and HT receptor (TR<sub>α1</sub> and TR<sub>β1</sub>) of the myocardium was performed by PCR real-time.

**Results:** FR reduced serum levels of T<sub>4</sub> and TSH and TR<sub>α1</sub> mRNA and increased the expression of PLB, NCX and L-channel. Exercise increased the TR<sub>β1</sub> receptor, L-channel and NCX. The association of exercise and FR reduced plasma T<sub>4</sub> and TSH, TR<sub>β1</sub> mRNA increase, SERCA2a, NCX and PLB, and there was a significant correlation of TR<sub>β1</sub> with CQS and NCX.

**Conclusion:** Chronic exercise and food restriction increased the mRNA of transient Ca<sup>2+</sup> proteins; however, TH-receptor axis cannot participate in the transcription of mRNA of myocardial calcium transient proteins. (Arq Bras Cardiol. 2011; [online].ahead print, PP.0-0)

**Keywords:** Exercise; caloric restriction; thyroid hormones; myocardium; carrier proteins; calcium.

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

Correspondência: Mário Mateus Sugizaki •

Av. Brasília, 1200 - Setor Industrial - 78550-000 - Sinop, MT - Brasil  
E-mail: mario@ufmt.br, mario.sugizaki@ig.com.br

Artigo recebido em 07/09/10; revisado recebido em 09/09/10; aceito em 25/02/11.

## Introdução

Intervenções como atividade física e restrição alimentar (RIA) têm sido frequentemente utilizadas visando manutenção da saúde ou estética corporal. Entretanto, dependendo da intensidade, duração e frequência da RIA e da atividade física, podem ocorrer prejuízos ao organismo<sup>1-7</sup>. Pesquisas mostram que essa associação pode deprimir<sup>8</sup> ou melhorar o desempenho cardíaco<sup>9,10</sup>.

Estruturas moleculares presentes no sarcolema, canal lento de cálcio tipo-L (canal-L) e o trocador sódio/potássio (NCX), e presentes no retículo sarcoplasmático, canal de rianodina, a calsequestrina (CQS), a bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA2a) e a fosfolamban, estão envolvidas no movimento intracelular de cálcio e participam no processo de contração e relaxamento do músculo cardíaco<sup>11</sup>. Trabalhos mostram que a RIA promove redução da expressão gênica de rianodina<sup>12</sup>, da SERCA2<sup>13</sup>, de canal-L<sup>14</sup>, enquanto o treinamento físico (TF) aumenta o mRNA da SERCA2<sup>15-17</sup>, da rianodina<sup>18,19</sup> e do canal-L<sup>20</sup>. A transcrição das estruturas moleculares envolvidas no movimento intracelular de cálcio pode ser modulada pelos hormônios tireoidianos (HT), via receptores nucleares de HT<sup>21-23</sup>. Sabe-se que a restrição alimentar reduz a síntese e liberação dos hormônios HT<sup>13</sup> e o exercício físico pode aumentar a liberação e/ou a sensibilidade desses hormônios<sup>21</sup>. Entretanto, a relação entre RIA, TF e os hormônios tireoidianos não está estabelecida.

Há escassa literatura que analisa a relação RIA, treinamento físico, hormônios tireoidianos e transcrição gênica de estruturas moleculares do tráfego cálcio miocárdico. Katzeff e cols.<sup>13</sup> verificaram redução dos níveis plasmáticos dos hormônios HT e decréscimo da expressão gênica de SERCA2 de ratos restritos. Iemitsu e cols.<sup>22</sup> mostraram que o treinamento físico aumentou na expressão de receptores TR<sub>α1</sub> e TR<sub>β1</sub> e a transcrição gênica da SERCA2 no miocárdio de ratos idosos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da associação do treinamento físico e da RIA sobre as concentrações plasmáticas dos hormônios tireoidianos e o mRNA dos receptores HT, SERCA2a, canal-L, NCX, rianodina, calsequestrina e fosfolamban do miocárdio de ratos.

## Métodos

### Animais e protocolo experimental

No presente estudo foram utilizados 28 ratos *Wistar-Kyoto* (WKY), com 60 dias de idade, provenientes do Biotério do Laboratório Experimental do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu. Durante a fase experimental, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura controlada (24 ± 2° C), ciclo claro-escuro (12:12 h) e alimentados com ração comercial e água. O projeto seguiu normas estabelecidas no *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* e os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Cobea) sendo aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp, sob protocolo de 575/2006.

Os ratos foram divididos em quatro grupos: *controle* com ração *ad libitum* (C); restrição alimentar de 50% (R<sub>50</sub>); exercício crônico com ração *ad libitum* (EX); exercício crônico com restrição alimentar de 50% (EX<sub>50</sub>).

Os animais dos grupos C e EX receberam ração comercial labina (Purina, Paulina, SP, Brasil) composta por 3,76% de gordura, 20,96% de proteína, 52,28% de carboidrato, 9,60% de cinzas e 13,40% de umidade. Os animais dos grupos R<sub>50</sub> e EX<sub>50</sub> receberam a mesma ração comercial, porém com uma redução de 50% da quantidade média consumida pelo grupo controle. O período de RIA foi de 90 dias. O consumo de ração foi controlado diariamente e o peso dos animais foi monitorado semanalmente.

O treinamento físico foi a natação com sobrecarga de peso de 5% do peso corporal. Para as sessões de natação, foram utilizados dois tanques de fibra de vidro com as seguintes dimensões: 100 cm de comprimento, 80 cm de largura e 80 cm de altura que continham água aquecida (32 ± 1° C), mantidos no nível de 60 cm. A sobrecarga de peso foi realizada por meio de chumbadas de pesca envolvidas em esparadrapo e fixada ao tórax do rato por meio de elástico. Foram mantidos no máximo seis animais por sessão de treinamento.

Os animais dos grupos EX e EX<sub>50</sub> foram submetidos a cinco sessões de natação semanais, durante 12 semanas consecutivas. Nas primeira, segunda e terceira semanas, os animais nadaram durante 30, 45 e 60 minutos, respectivamente, sem carga adicional. A partir da quarta semana, as sessões de natação foram de 60 minutos e com sobrecarga. Os ratos desses grupos foram previamente submetidos a um período de adaptação à água. Durante uma semana, eles foram mantidos por 15 minutos no interior do tanque contendo água aquecida, cujo nível inicial de água era de 7,0 cm, sendo progressivamente aumentado, no decorrer da semana, até atingir a altura de 60 cm.

### Dosagem sérica de T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> e TSH

Previamente ao sacrifício, os animais foram mantidos em jejum de 12 horas e então foram mortos por decapitação, previamente anestesiados com pentobarbital sódico (0,1 ml/kg) e o sangue foi imediatamente transferido em tubos de ensaio. As dosagens de triiodotironina (T<sub>3</sub>), tiroxina (T<sub>4</sub>) e hormônio tireotrófico (TSH) foram determinadas utilizando *kit* comercial específico para rato, painel de tireoide (LINCoplex) no laboratório de análises clínicas da Gênese, São Paulo - Brasil.

### Avaliação das características gerais dos animais

Após a coleta de sangue, o coração foi removido, foram dissecados o átrio, o ventrículo direito e o ventrículo esquerdo que foram pesados e congelados para as análises da expressão gênica. As variáveis morfológicas utilizadas para caracterizar cada grupo de animais foram: peso corpóreo inicial (PCI) e final (PCF), peso do ventrículo esquerdo (VE), relação entre o peso do ventrículo esquerdo e o peso corporal final (VE/PCF x 10<sup>3</sup>), peso do ventrículo direito (VD), relação entre o peso do ventrículo direito e o peso corpóreo final (VD/PCF x 10<sup>3</sup>).

## Avaliação da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase em tempo real após transcrição reversa

### Extração de RNA

Fragmentos do ventrículo esquerdo foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A amostra congelada foi homogeneizada em aparelho Polytron (Ika Ultra Turrax<sup>®</sup> T25 Basic, Wilmington, USA) após adição de 1 ml de TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen Brasil, São Paulo) para cada 100 mg de tecido. O TRIzol<sup>®</sup>, solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato, tem como finalidade manter a integridade do RNA durante a lise celular que ocorre no processo de homogeneização<sup>24</sup>.

A amostra homogeneizada foi transferida para um tubo e incubada à temperatura ambiente durante 5 minutos, para permitir a completa dissociação do complexo núcleo-proteico. Em seguida, foi adicionado clorofórmio (Merck KGaA, Damstadt, Germany) na proporção de 0,2 ml/1 ml TRIzol<sup>®</sup>; a amostra foi agitada, manualmente, com vigor por 15 segundos e incubada por 3 minutos à temperatura ambiente. Após essa segunda incubação, o material foi centrifugado (Eppendorf 5804R, Hamburg, Germany), a 14.000 rpm durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Nesse processo a amostra ficou separada em três fases: a) uma inferior, de fenol-clorofórmio e de coloração rosada, contendo DNA; b) uma interfase branca com proteínas; e c) uma fase superior, aquosa, incolor, contendo RNA.

A porção de RNA foi transferida para um tubo com 0,5 ml de álcool isopropílico (Merck KGaA, Damstadt, Germany). A amostra foi agitada manualmente 10 vezes por inversão, incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugada a 14.000 rpm durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O *pellet* foi lavado com álcool etílico 75% (Merck KGaA, Damstadt, Germany) na proporção de 1 ml/1 ml de TRIzol<sup>®</sup> e centrifugado a 7.500 rpm por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após o álcool etílico ser descartado, o *pellet* foi seco por 10 minutos à temperatura ambiente. O sedimento de RNA foi diluído em 30  $\mu\text{l}$  de água ultrapura e incubado por 10 minutos a  $60^{\circ}\text{C}$  em banho-maria (Fanem mod 100, São Paulo, Brasil); esse procedimento teve como finalidade inativar a possível presença de RNase.

O RNA foi analisado com auxílio de um espectrofotômetro (GeneQuant<sup>®</sup> RNA/DNA Calculator, Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, England) pela absorvância em 260 nm. A pureza do RNA foi constatada pela razão das absorvâncias em 260/280 nm. As amostras cujas razões foram inferiores a 1,6 foram descartadas por apresentarem contaminação por proteínas.

### Verificação da integridade do RNA por eletroforese

Amostras de 1,0  $\mu\text{l}$  de RNA total diluídas em 8,0  $\mu\text{l}$  de água ultrapura e 1,0  $\mu\text{l}$  de corante (Orange G, Acros Organics, New Jersey, USA), foram aplicadas em gel de agarose 1% (0,3 g agarose, 30 ml de TAE Buffer 1x, 3,0  $\mu\text{l}$  de brometo de etídio) e submetidas a uma voltagem de 60 mV (Power Pac Basic<sup>®</sup> Bio-Rad) por 20 minutos. A integridade do RNA foi constatada pela visualização das bandas de RNA ribossômico, 28S e 18S, e ausência de rastros de RNA no gel. As amostras que se mostrarem íntegras foram utilizadas como substrato para a transcrição reversa.

### Transcrição reversa do RNA (RT)

As amostras de RNA do músculo cardíaco foram submetidas à transcrição reversa pela ação da enzima *transcriptase reversa*, utilizando-se *kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR<sup>®</sup>* (Invitrogen, Brasil, São Paulo). As amostras utilizadas no experimento foram incubadas em um termociclador (*Mastercycler Gradient Eppendorf<sup>®</sup> Hamburg, Germany*). Inicialmente uma mistura contendo 1.000 ng/ml de RNA total, 1,0 ml de *dNTP mix* 10 mM, 1,0 ml de random hexamers (50 ng/ml) e 8,0 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC (dietil pirocarbonato) foi incubada durante 5 minutos a  $65^{\circ}\text{C}$ . A seguir, após adição 9,0 ml de uma solução contendo, 2,0 ml de tampão RT 10x, 4,0 ml de  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 2,0 ml de DTT 0.1 M e 1,0 ml de inibidor de RNase, *RNaseOUT<sup>®</sup>*, a mistura foi incubada por 2 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$ . Após o acréscimo de 1,0 ml da enzima *SuperScript II<sup>®</sup>*, procedeu-se nova incubação por 10, 50 e 15 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$ ,  $42^{\circ}\text{C}$  e  $70^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Após adição 1,0 ml de RNase H a solução foi incubada por 20 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Para checar a qualidade da transcrição reversa, foram empregados dois métodos:

1) *Controle positivo* - O *kit* contém um RNA transcrito a partir do gene da cloranfenicol acetiltransferase e *primers* controles A e B. Esses *primers*, na reação em cadeia da polimerase, geram um produto de 500 pares de base (pb);

2) *Controle negativo* - Para comprovar a ausência de DNA genômico residual uma amostra de RNA foi submetida à reação de RT, porém a enzima *SuperScript II<sup>®</sup>* foi substituída por 1,0 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC. Esse produto foi utilizado nas reações de PCR e a ausência de DNA genômico residual foi confirmada pela ausência de produtos de amplificação.

### Reação em cadeia da polimerase em tempo real

Alíquotas da reação de RT contendo 2,0  $\mu\text{g}$  de cDNA foram adicionadas a uma mistura contendo *TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)* e ensaio customizado contendo *primers "sense" e "anti-sense" e sonda Taqman<sup>®</sup>* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) específicos para cada gene, e o volume completado para 25 ml com água tratada com DEPC. As reações foram realizadas em triplicatas para cada gene alvo no Sistema *Real Time PCR 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)* de acordo com as instruções do fabricante. Para cada amostra foi plotado um gráfico de amplificação mostrando aumento do *reporter dye* fluorescente ( $\Delta\text{Rn}$ ) em cada ciclo da PCR. A partir desse gráfico, foi determinado o ciclo onde a reação cruza o limiar de detecção (*cycle threshold - C<sub>t</sub>*), baseado na variabilidade dos dados da *baseline* obtidos a partir dos ciclos iniciais da PCR. Os *primers* para os genes analisados (Quadro 1) foram obtidos por meio do *software Primer Express<sup>®</sup>* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*), a partir de sequências publicadas no GenBank ([www.pubmed.com](http://www.pubmed.com)). A quantificação relativa de cada gene, normalizada pela referência endógena (ciclofilina), foi realizada de acordo com o *User Bulletin #2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)*.

### Análise estatística

Os resultados experimentais foram expressos como média  $\pm$  DP. As comparações entre os grupos foram realizadas por

análise de variância (ANOVA) de dois fatores, exercício e dieta, seguida com o teste de Tukey. As relações entre o mRNA da SERCA2a, PLB, CQS, NCX, canal-L e RYR2 e receptores dos hormônios tireoidianos,  $TR_{\alpha 1}$  e  $TR_{\beta 1}$  foram medidas pelo coeficiente de correlação de Pearson. O nível de significância foi de 5%.

## Resultados

As características gerais dos animais estão apresentadas na tabela 1. Os pesos corporais iniciais e as relações VD/PCF não foram diferentes entre os grupos. Os animais com restrição,  $R_{50}$  e  $EX_{50}$ , apresentaram pesos corporais finais, do VE, VD, átrio e consumo de ração, significativamente inferiores aos respectivos controles (C vs  $R_{50}$  e EX vs  $EX_{50}$ ). Os animais treinados, EX e  $EX_{50}$ , apresentaram redução nos pesos

corporais finais em relação aos ratos C e  $R_{50}$  respectivamente. Os ratos EX aumentaram o peso do átrio em relação aos animais C. A relação VE/PCF aumentou significativamente nos animais  $EX_{50}$  quando comparados aos animais EX.

A tabela 2 apresenta os resultados da avaliação do mRNA pela técnica de PCR em tempo real. Verificou-se que os animais  $R_{50}$  aumentaram a expressão do NCX, canal de cálcio-L e PLB e reduziram a expressão do  $TR_{\alpha 1}$  em relação aos ratos controles. Os animais do grupo EX aumentaram a expressão do NCX, canal-L e do receptor  $TR_{\beta 1}$  em relação aos animais controles. A associação do treinamento físico e RIA, grupo  $EX_{50}$ , aumentou a expressão da SERCA2a, NCX e PLB em relação aos animais EX e  $R_{50}$ . Além disso, os animais  $EX_{50}$  apresentaram aumento na expressão do  $TR_{\beta 1}$  quando comparados aos ratos  $R_{50}$ .

As dosagens séricas de  $T_3$ ,  $T_4$  e TSH estão apresentadas na tabela 3. Não houve alteração na concentração sérica do  $T_3$  pela ação da RIA ou treinamento físico. Os ratos treinados, EX, não apresentaram alteração das concentrações séricas de  $T_4$  e TSH. Entretanto, verificou-se significativa redução do

Quadro 1 - Primers utilizados

Gene	Código
SERCA2a	Rn00568762_m1
PLB	Rn01434045m_1
RyR2	Rn01470303_m1
CSQ2	Rn00567508_m1
NCX	Rn00570527_m1
Canal de cálcio tipo-L	Rn00709287_m1
$TR_{\alpha 1}$	Rn00579692m1
$TR_{\beta 1}$	Rn00562044_m1
Ciclofilina	Rn00690933_m1

SERCA2a - Cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático (RS), isoforma cardíaca responsável pela captação de  $Ca^{2+}$  para o RS; PLB - fosfolamban, proteína que atua como inibidor da captação de  $Ca^{2+}$  da SERCA2a; RyR2 - receptor rianodina, via de saída do  $Ca^{2+}$  do RS para o citosol; CSQ - calsequestrina, proteína abundante no interior do RS que atua como reservatório de  $Ca^{2+}$ ; NCX - trocador  $Na^+/Ca^{2+}$  presente no sarcolema, responsável pela expulsão do  $Ca^{2+}$  para o meio extracelular; Canal de cálcio tipo-L - canal lento de  $Ca^{2+}$  do sarcolema, é aberto pela chegada potencial de ação;  $TR_{\alpha 1}$  - receptor de hormônio tireoidiano;  $TR_{\beta 1}$  - receptor de hormônio tireoidiano; Ciclofilina - gene constitutivo, utilizado na normalização da quantidade do produto transcrito do gene-alvo.

Tabela 2 - Avaliação do mRNA por PCR tempo real

	C n = 7	$R_{50}$ n = 7	EX n = 7	$EX_{50}$ 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
$TR_{\alpha 1}$	1,00 ± 0,29	0,67 ± 0,16 *	0,78 ± 0,23	0,86 ± 0,26
$TR_{\beta 1}$	1,00 ± 0,29	0,96 ± 0,25	1,47 ± 0,40*	1,66 ± 0,17*†

Valores expressos em média ± desvio padrão; C - ratos-controle;  $R_{50}$  - ratos com restrição de ingestão alimentar (RIA) de 50%; EX - ratos treinados;  $EX_{50}$  - ratos treinados com RIA de 50%; RyR2 - canal rianodina; Serca2a - bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático; PLB - fosfolamban; CSQ2 - calsequestrina; NCX - trocador  $Na^+/Ca^{2+}$ ; TR - receptor de hormônio tireoidiano; \* versus C; † versus  $R_{50}$ ; ‡ versus EX, ANOVA, Tukey,  $p < 0,05$ .

Tabela 1 - Características gerais dos animais

	C n = 7	$R_{50}$ n = 7	EX n = 7	$EX_{50}$ n = 7
Consumo de ração (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 *†‡
VE (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 *
Átrio (g)	0,059 ± 0,006	0,042 ± 0,005 *	0,077 ± 0,013 *	0,049 ± 0,006 *†
VE/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 expressos em média ± desvio padrão; C - ratos-controle;  $R_{50}$  - ratos com restrição de ingestão alimentar (RIA) de 50%; EX - ratos treinados;  $EX_{50}$  - ratos treinados com RIA de 50%; PCI - peso corporal inicial (g); PCF - peso corporal final (g); VE - peso do ventrículo esquerdo (g); VD - peso do ventrículo direito (g); \* versus C; † versus  $R_{50}$ ; ‡ versus EX - ANOVA, Tukey,  $p < 0,05$ .

**Tabela 3 - Concentração plasmática dos hormônios tireoidianos**

	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 expressos em média ± desvio padrão; C - ratos-controle; R<sub>50</sub> - ratos com restrição de ingestão alimentar (RIA) de 50%; EX - ratos treinados; EX<sub>50</sub> - ratos treinados com RIA de 50%; T<sub>3</sub> - triiodotironina; T<sub>4</sub> - tiroxina; TSH - hormônio tireotrófico; \* versus C; ‡ versus EX - ANOVA, Tukey, p < 0,05.

T<sub>4</sub> e TSH nos grupos R<sub>50</sub> e EX<sub>50</sub> em relação aos respectivos controles (C vs R<sub>50</sub> e EX vs EX<sub>50</sub>).

Os coeficientes de correlação e as significâncias entre mRNA das estruturas do trânsito cálcio e receptores de hormônios tireoidianos estão na tabela 4. Estão apresentadas somente as correlações positivas (r > 0,70) no grupo EX<sub>50</sub>, desde que o objetivo desse estudo foi avaliar a associação e treinamento físico e restrição alimentar sobre a transcrição gênica de estruturas moleculares envolvidas no trânsito de cálcio e a influência do eixo HT - receptor no miocárdio. Assim, os coeficientes de correlação para os grupos C, R<sub>50</sub> e EX foram apresentados para definir as participações dos fatores exercício, restrição alimentar e associação entre os dois fatores.

Observou-se que o gene do TR<sub>β1</sub> apresenta mais correlações com as estruturas moleculares do trânsito de cálcio que o gene TR<sub>α1</sub> (tab. 4). Embora os mRNA do canal-L e PLB tenham apresentado aumento significativo nos ratos EX<sub>50</sub>, esses genes não apresentaram correlação com os genes do TR<sub>α1</sub> ou TR<sub>β1</sub>. O mRNA da rianodina teve significativa correlação com o mRNA do TR<sub>β1</sub> em todos grupos e ficou maior na associação da RIA com treinamento físico. O mRNA da SERCA2a também apresentou boa correlação com o mRNA do TR<sub>β1</sub> nos grupos R<sub>50</sub>, EX e EX<sub>50</sub> apesar de não ser estatisticamente significante, o que pode ser decorrente do baixo número de amostras. Os genes calsequestrina e NCX apresentaram correlação com o mRNA TR<sub>β1</sub> e TR<sub>α1</sub>, respectivamente, somente no

**Tabela 4 - Coeficiente de correlação de Pearson entre mRNA de proteínas do transito de cálcio e receptores de hormônios tireoidianos**

	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 - ratos-controle; R<sub>50</sub> - ratos com restrição de ingestão alimentar (RIA) de 50%; EX - ratos treinados; EX<sub>50</sub> - ratos treinados com RIA de 50%; RyR2 - rianodina; Serca2a - bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático; PLB - fosfolamban; CSQ2 - calsequestrina; NCX - trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>; TR - receptor de hormônio tireoidiano; r - coeficiente de correlação; p - nível de significância.

grupo EX<sub>50</sub> indicando a dependência da associação dos dois fatores. Interessante ressaltar que o mRNA da CQS e RYR2 apresentaram forte correlação com TR<sub>β1</sub> nos animais EX<sub>50</sub>. Entretanto, não houve aumento de expressão gênica da CQS e RYR2 nesse grupo. Contrariamente, o gene NCX aumentou, mas apresentou correlação apenas com o gene TR<sub>α1</sub>. O gene da SERCA2a foi o único a apresentar correlação com o mRNA da TR<sub>β1</sub> e aumento na expressão gênica nos animais EX<sub>50</sub>.

## Discussão

O objetivo deste estudo foi avaliar a participação dos hormônios tireoidianos na associação entre a severa restrição alimentar e treinamento físico e a correlação entre os receptores de HT e a expressão gênica das estruturas moleculares envolvidas no movimento de cálcio intracelular do miocárdio. Os resultados deste estudo mostraram que o treinamento físico associado à severa RIA promoveu aumento significativo do mRNA da SERCA2a, do canal-L, da fosfolamban e do trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>. Essas alterações foram acompanhadas por elevação na expressão dos receptores de hormônios tireoidianos (TR<sub>β1</sub>) apesar dos níveis séricos de T<sub>3</sub> estarem normais e T<sub>4</sub> e TSH reduzidos.

Os protocolos de RIA e treinamento físico promoveram importantes alterações morfológicas (tab. 1). As reduções do peso corporal, peso do VD e peso do VE induzidas pela RIA estão associadas ao grau de restrição calórica. Restrição alimentar, excesso de ingestão ou estado de jejum alteram o gasto energético e a composição corporal<sup>25</sup>. A redução do gasto energético durante a restrição alimentar tem sido documentada e representa um mecanismo de conservação de energia, que previne a perda de peso corporal em excesso<sup>25</sup>. As câmaras cardíacas foram reduzidas na mesma proporção da redução de peso corporal, como observado pelas relações VE/PC e VD/PC. A diminuição do peso corporal pelo treinamento físico está associada ao aumento do gasto energético decorrente das sessões de treinamento físico; as relações VE/PC e VD/PC foram mantidas em relação ao grupo controle. A associação do TF e RIA intensificou a redução de peso corporal, porém preservou a massa do VE e do VD e manteve as relações VE/PC e VD/PC quando comparados com os ratos R<sub>50</sub>. Assim, os resultados referentes às câmaras cardíacas indicam que a RIA promoveu significativa redução da massa cardíaca e o treinamento físico, isolado ou associado a RIA, não promoveu hipertrofia cardíaca. Esses resultados foram semelhantes aos constatados em estudos anteriores<sup>10</sup>.

A RIA, isolada ou em ratos treinados, reduziu os níveis de T<sub>4</sub> e TSH, enquanto o treinamento físico não alterou os níveis séricos dos hormônios tireoidianos. Apesar de a RIA reduzir o nível sérico de T<sub>3</sub> em 29% em ambos os grupos (R<sub>50</sub> e EX<sub>50</sub>), essa redução não foi de magnitude suficiente para mostrar diferença estatística entre os grupos. A ausência de alteração nos níveis de T<sub>3</sub> pode ser decorrente da dosagem do T<sub>3</sub> total e não do T<sub>3</sub> livre, que é a forma ativa do hormônio. Dados de literatura indicam que, em estados de jejum e severa restrição calórica, ocorrem acentuado aumento de T<sub>3</sub> reverso<sup>13</sup>. Assim é possível que a relação entre T<sub>3</sub> livre e T<sub>3</sub> reverso tenha sido reduzida nos animais submetidos à RIA. Acredita-se que a privação de energia pode modular a concentração sérica de T<sub>3</sub> e reduzir a atividade ou concentração de iodotironina

deiodinase que converte  $T_4$  em  $T_3$ .<sup>26</sup> A significativa redução dos níveis séricos de  $T_4$  e TSH induzido pela RIA indica estado de hipotireoidismo, o que também foi observado em estudos experimentais<sup>8,13,27,28</sup> e clínicos<sup>29</sup>. O mecanismo responsável pela redução dos níveis plasmáticos dos hormônios tireoidianos induzida pela RIA pode estar relacionado à própria redução no consumo energético. A redução dos níveis de hormônios tireoidianos está relacionada ao mecanismo de conservação de energia, uma vez que esses hormônios são os principais responsáveis pelo gasto energético<sup>25</sup>. Considerando que o gasto energético é reduzido na restrição alimentar, seria esperada redução dos níveis de HT. O treinamento físico não promoveu alterações nos níveis plasmáticos dos hormônios tireoidianos. Este resultado difere do observado por Lemitsu e cols.<sup>22</sup> e Katzeff e cols.<sup>13</sup>, que verificaram aumento nos níveis séricos de  $T_4$ . Essa discrepância de resultados pode ter sido decorrente do tipo, intensidade e volume de treinamento físico. Em conclusão, enquanto a RIA promoveu o estado de hipotireoidismo, o treinamento físico parece não ter efeito direto sobre a ação dos hormônios tireoidianos.

No coração de ratos, mais de 70% de todos os receptores HT são  $TR_{\alpha 1'}$ , com  $TR_{\beta 1}$  constituindo apenas 30%<sup>30</sup>. O hormônio tireoidiano liga-se à elementos responsivos de tireóide (receptores de HT) em regiões promotoras de vários genes, regulando a transcrição de genes alvo no coração incluindo trocador  $Na^+/Ca^{2+}$ , rianodina, canal de cálcio tipo-L e principalmente SERCA2a e fosfolamban<sup>30</sup>. Essa regulação pelo HT é um importante mecanismo no processo de contração e relaxamento do miocárdio<sup>31</sup>.

Os resultados deste estudo indicam que o estado de hipotireoidismo induzido pela RIA reduziu a expressão do gene  $TR_{\alpha 1'}$ , receptor predominante do miocárdio. Esse resultado era esperado, uma vez que a redução de HT acarreta *feedback* negativo no receptor HT. O treinamento físico, isolado ou associado a RIA, aumentou a expressão do  $TR_{\beta 1}$  sem alterar os níveis de  $TR_{\alpha 1}$ . A escassa literatura sobre o papel dos receptores  $TR_{\alpha 1}$  e  $TR_{\beta 1}$  na transcrição gênica de proteínas do trânsito de cálcio do miocárdio. Kinugawa e cols.<sup>21</sup> mostraram que o  $TR_{\alpha 1}$  está relacionado com transcrição da  $\alpha$ -MHC e síntese proteica miocárdica, enquanto o  $TR_{\beta 1}$  está relacionado com SERCA2a, o próprio  $TR_{\beta 1}$  e inibição da  $\beta$ -MCH. Assim, nossos dados sugerem que a redução do gene  $TR_{\alpha 1}$  pela RIA poderia ser um mecanismo associado à perda de massa cardíaca; a ausência de hipertrofia nos animais treinados poderia ser decorrente da manutenção dos níveis de  $TR_{\alpha 1}$ .

Os efeitos das intervenções, RIA e TF, resultaram em alterações no mRNA das estruturas moleculares reguladoras do trânsito de cálcio (tab. 2). O aumento da SERCA2a e PLB nos ratos EX<sub>50</sub> observados neste estudo sugere que o processo de recaptura de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (RS) pode estar facilitado. A explicação para essa hipótese baseia-se nos dados referentes aos efeitos da RIA que, isoladamente, promoveu somente aumento da PLB indicando piora no processo de recaptura de cálcio pelo RS. Como esse processo é dependente de ATP e, na severa restrição alimentar, necessita-se de economia de energia, o aumento da fosfolamban poderá acarretar redução da atividade da SERCA2a. Quando a RIA foi associada ao treinamento físico houve aumento proporcional

da SERCA2a e da PLB, indicando que o treinamento físico protegeu o miocárdio dos prejuízos provocados pela RIA. A melhora no processo de recaptura de cálcio pelo RS induzido pelo treinamento físico está de acordo com estudos de Kemi e cols.<sup>32</sup> que observaram aumento da recaptura de cálcio no miocárdio decorrente da elevação da SERCA2a e fosfolamban fosforilada (PLB-thr17) em ratos treinados. O aumento do canal de cálcio-L observado nos animais EX<sub>50</sub> sugere um aumento do influxo de cálcio no sentido de melhorar a resposta contrátil. A elevação do gene NCX teria como finalidade compensar o aumento do influxo de cálcio pelos canais lentos de cálcio sarcolemal.

Neste estudo não foi possível relacionar os receptores HT com as estruturas moleculares do trânsito de cálcio no miocárdio de ratos treinados e submetidos a severa RIA, considerando que o teste de correlação não mostrou significância no mRNA da SERCA2a, PLB, NCX, canal-L com os receptores  $TR_{\alpha 1}$  ou  $TR_{\beta 1}$ . Dados de literatura mostram associação das estruturas moleculares envolvidas no movimento de cálcio com receptores de HT induzidos pelo treinamento ou estado de hipotireoidismo; Lemitsu e cols.<sup>22</sup> verificaram aumento significativo na expressão dos receptores  $TR_{\alpha 1}$  e  $TR_{\beta 1}$  acompanhado de aumento na expressão da SERCA2a pelo treinamento físico. Em condições de hipotireoidismo, a insuficiência da tireoide está associada a diminuição da SERCA2a e aumento da fosfolamban<sup>23</sup>, aumento na expressão do NCX<sup>33</sup> e níveis de canal-L inalterados<sup>34</sup> ou aumentados<sup>35</sup>.

Os mecanismos moleculares para o aumento da transcrição gênica da SERCA2, PLB e NCX no exercício isolado ou associado à RIA ainda não estão esclarecidos; como citado anteriormente, nossos achados sugerem que os HT e/ou receptores de HT não participam da transcrição gênica das estruturas moleculares do trânsito de cálcio nesse grupo de animais. O processo de remodelação cardíaca é consequente de estímulos extracelulares que ativam sinalizações citosólicas complexas, com inúmeros pontos de integração, e processos transcricionais nucleares. Dentre os estímulos extracelulares os agonistas de receptores acoplados a proteína G (angiotensina, endotelinas, catecolaminas), citocinas e fatores de crescimento (IGF, TGF, FGF) são os principais candidatos que poderiam, portanto, estimular a transcrição gênica de estruturas do movimento de cálcio<sup>36,37</sup>. Entretanto, não existe dados de literatura que permitam especular os mecanismos responsáveis pelo aumento da transcrição gênica da SERCA2, PLB e NCX na interação exercício e restrição alimentar.

### Limitações do estudo

Nossos achados de expressão gênica de mRNA obtidos por meio de PCR quantitativo da SERCA2a, fosfolamban, trocador  $Na^+/Ca^{2+}$ , canal de cálcio tipo-L, calsequestrina e receptores de HT podem não se traduzir em formação de proteínas. Dados recentes obtidos em nosso laboratório verificaram significativa redução da expressão proteica do canal tipo-L em ratos com severa RIA, contrariando nossos achados de aumento de mRNA da mesma proteína<sup>14</sup>. Portanto, a continuidade desses achados será a determinação da expressão proteica por *Western Blot*. Também não foi possível estabelecer uma relação entre causa-efeito dos hormônios tireoidianos e/ou receptores de HT com o

mRNA do trânsito de cálcio; seriam necessários estudos com tratamento de HT ou utilizando animais monoclonais específicos para HT.

Em conclusão, os dados do trabalho mostraram aumento da expressão de mRNA das estruturas moleculares envolvidas

no movimento intracelular de cálcio em animais submetidos a severa restrição e treinamento físico. Apesar de a associação TF e RIA induzir estado de hipotireoidismo, o eixo HT-receptor não parece participar da transcrição do mRNA das proteínas do trânsito de cálcio do miocárdio.

## Referências

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, Weindrich 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 JG, 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. Katzeff 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, Kozick 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, Takahashi 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. Katzeff 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. Katzeff 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-Schmiedeberg 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.