PATRICIA NEY KATO

A INFLUÊNCIA DO HORMÔNIO TIREOIDEANO NAS
PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DA BANDA M NO
CORAÇÃO E NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS

**Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção de Título
de Doutor em Ciências (Biologia Celular
e Tecidual).**

São Paulo

2008

PATRICIA NEY KATO

**A INFLUÊNCIA DO HORMÔNIO TIREOIDEANO NAS
PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DA BANDA M NO
CORAÇÃO E NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS**

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção de Título de Doutor em
Ciências.**

**Área de concentração: Biologia Celular e
Tecidual.**

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot

São Paulo

2008

Ficha Catalográfica (verso)

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

reprodução não autorizada pelo autor

Kato, Patricia Ney.

A influência do hormônio tireoideano nas proteínas estruturais da banda M no coração e no músculo esquelético de ratos / Patricia Ney Kato. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Anselmo Sigari Moriscot.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Plasticidade Muscular.

Versão do título para o inglês: The influence of thyroid hormone on M band structural proteins in the heart and skeletal muscle of rats.

Descritores: 1. Hormônio Tireoideano 2. Coração 3. Músculo esquelético 4. Sarcômero I. Moriscot, Anselmo Sigari II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB138/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Patricia Ney Kato.

Título da Tese: A influência do hormônio tiroideano nas proteínas estruturais da banda M no coração e no músculo esquelético de ratos .

Orientador(a): Anselmo Sigari Moriscot.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **098** nas fls. **19** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot, Coordenador da Linha de Pesquisa "**O hormônio tireoideano reprime a expressão de proteínas estruturais do disco M no coração e no músculo esquelético de ratos**" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Patrícia Ney Kato** e os pesquisadores **Maria Luíza Barreto-Chaves, Dânia E. Hamassaki-Britto**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEa) em **16.09.2005**.

São Paulo, 20 de setembro de 2005.

Prof. Dra. Marília C. Leite Seelaender
Coordenadora da CEEA - ICB/USP

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA

Aos meus pais, os mais sinceros
agradecimentos pela ajuda, apoio, dedicação
e por sempre acreditarem em mim. Ao meu
namorado, Fábio, muito obrigada pela
paciência e apoio.

Amo muito todos vocês!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao professor Dr. Anselmo Sigari Moriscot, pela paciência, dedicação e pelas lições que levarei por toda a vida.

Aos meus amigos e companheiros do Laboratório: Antônio, pela ajuda nos experimentos iniciais dessa dissertação. Marcelo Christoffolete, por toda a ajuda não só nos experimentos, mas pelas conversas e amizade. Vanessa e Marina pelo apoio e amizade de sempre. Marcela, pelas dicas, pela amizade e por todos os ensinamentos. Talita, minha primeira e única aluna de iniciação, a qual serviu para muito aprendizado também. Igor, Marcelo Leal, Monique, Elen, Saldanha e aos que já se foram Uchida, Camila, Hércio, Raphael, Paula e Carol pelo ótimo convívio e pelos valiosos auxílios.

Ao professor Dr. Jean Claude-Perriard e à Dra Irina Agarkova, por nos ceder os anticorpos utilizados nesse trabalho e pelas preciosas ajudas.

Às professoras Maria Luíza Barreto-Chaves e Dânia Hamassaki-Britto pelos preciosos auxílios e colaboração em trabalhos.

Às professoras Chao Yun Irene Yan e Marinilce Fagundes dos Santos, pelas valiosas sugestões e ajudas.

Aos técnicos Cleusa e Leandro pela imensa contribuição para meu aprendizado nas técnicas histológicas.

Às professoras Patrícia Gama, Maria Tereza Nunes e Patrícia Brum pela importante avaliação do meu trabalho no exame de qualificação.

Às minhas queridas amigas que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado ao longo do doutorado: Luciane Capelo, Roberta Cravo, Luciana Harumi, agradeço-as não só pelo apoio, mas pela amizade que levarei por toda minha vida.

Às amigas Maria Alicia e Gabriela, por toda ajuda nos experimentos, mas também pelas conversas e amizade.

À minha mais recente amiga, mas não menos importante, Renata Pellegrino, por toda a força no final dessa dissertação, apoio e amizade sincera.

A todos os docentes, alunos e funcionários do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento que sempre foram amistosos e solícitos.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo essencial apoio financeiro para execução deste trabalho.

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

Dalai Lama

RESUMO

Kato PN. A influência do hormônio tireoideano nas proteínas estruturais da banda M no coração e no músculo esquelético de ratos [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

O hormônio tireoideano (T3) exerce uma série de efeitos nos sistemas cardiovascular e muscular. No coração, o excesso de T3 leva a um aumento do cronotropismo e inotropismo, enquanto que, no músculo esquelético, o T3 promove alterações nas propriedades contráteis, podendo levar à fadiga. É bem estabelecido o efeito do T3 em diversos genes musculares, no entanto, pouco se sabe sobre seus efeitos na expressão das proteínas estruturais sarcoméricas, principalmente no que se refere à banda M, uma das primeiras estruturas afetadas frente ao significativo desarranjo da estrutura cardíaca promovida após longa exposição ao T3. No presente estudo, foi demonstrado que o T3 alterou a expressão de importantes proteínas estruturais da banda M (miomesina, EH-miomesina e proteína M). No coração, o tratamento com T3 reprimiu especificamente a expressão da proteína M, uma vez que as demais proteínas da banda M não foram afetadas, além disso, T3 também foi capaz de regular negativamente o promotor da proteína M. A regulação negativa da proteína M pelo T3 é rápida e precede a hipertrofia cardíaca causada pelo excesso de T3, dessa forma, tal regulação pode ser a causa do forte desarranjo miofibrilar no tratamento prolongado com T3. No músculo esquelético, T3 aumentou a expressão proteica de EH-miomesina no músculo sóleo (predominantemente fibras do tipo I – contração lenta), em contrapartida, diminuiu a expressão de proteína M no músculo extensor digital longo (EDL – predominantemente fibras do tipo II – contração rápida). Tal regulação, sugere um mecanismo adaptativo dos músculos, frente à demanda funcional imposta pelo T3.

Palavras-chave: Hormônio Tireoideano. Coração. Músculo esquelético. Sarcômero. Banda M. Miomesina. EH-miomesina. Proteína M.

ABSTRACT

Kato PN. The influence of thyroid hormone on M band structural proteins in the heart and skeletal muscle of rats [Doctor Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Thyroid hormone (T3) has broad effects in cardiovascular and muscle systems. In the heart, T3 can increase chronotropism and inotropism, whereas in the skeletal muscle, T3 can lead to alterations in the contractile properties, which can generate fatigue. Nowadays, it is well established the T3 effects on some muscle genes, although the extent list of muscle genes regulated by T3, little is known about T3 effects on structural sarcomeric proteins, mainly in the M band, which is the first structure to disarray in the rats heart treated for a long time with T3. In the present study, it was demonstrated that T3 regulated the M band structural proteins (myomesin, EH-myomesin and M protein). In the heart, T3 treatment down regulated M protein expression in a specific manner, since other M band proteins were not affected, and T3 also down regulated M protein promoter. This regulation by T3 is fast and it precedes the hypertrophy imposed by T3, which could be the cause of the strong myofibrillar disarray driven by T3 treatment. In the skeletal muscle, T3 up regulated the EH-myomesin protein expression in the soleus muscle (predominantly type I fiber – slow contraction) and, in parallel, T3 down regulated M protein expression in extensor digitorum longus muscle (EDL – predominantly type II fiber – fast contraction). This differential regulation by T3 suggests a muscle adaptive mechanism for the increased demand imposed by T3.

Key-words: Thyroid Hormone. Heart. Skeletal muscle. Sarcomere. M band. Myomesin. EH-myomesin. M protein.

LISTA DE ABREVIATÖES

EDL: extensor digital longo

HT: hormônio tireoideano

MHC: miosina de cadeia pesada

PCR: reação de polimerase em cadeia

RNAm: ácido ribonucléico mensageiro

RT: transcrição reversa

RXR: receptor de ácido retinóico

SERCA2: ATPase Ca^{+2} ativada do retículo sarcoplasmático

T3: 3,5,3'-triiodotironina

T4: tiroxina

TR: receptor de hormônio tireoideano

TRE: elemento responsivo ao hormônio tireoideano

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema simplificado de um sarcômero.....	19
Figura 2. Esquema representando a ação genômica do T3 na célula	26
Figura 3. Expressão gênica de miomesina e EH-miomesina no coração de ratos induzidos ao hipertireoidismo e hipotireoidismo experimental	49
Figura 4. Imunomarcagem para miomesina e EH-miomesina nos ventrículos esquerdos de ratos controle e tratados com T3 por 8 dias	49
Figura 5. (A) Expressão gênica de proteína M no coração de ratos induzidos ao hipertireoidismo e hipotireoidismo experimental. (B) Expressão gênica de proteína M em coração de ratos tratados com diferentes doses de T3 por 48hs.	50
Figura 6. Imunomarcagem para proteína M nos ventrículos esquerdos de ratos controle e tratado com T3 por 8 dias.....	51
Figura 7. Expressão gênica de proteína M em cultura primária de cardiomiócitos.....	51
Figura 8. Regulação da atividade promotora da proteína M pelo T3 através do TR α e TR β	52
Figura 9. Atividade transcricional do controle positivo D1, pGL3 sem promotor, promotor da proteína M mínimo e com 2300pb.....	54
Figura 10. Atividade transcricional do controle positivo D1, promotor da proteína M mínimo, promotor da proteína M sem a porção 5' do exon 1 (-158 a +1), promotor da proteína M somente com a porção +1 a +228	56
Figura 11. Expressão gênica de miomesina (A) e EH-miomesina (B) no músculo sóleo de ratos controles e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias.....	57
Figura 12. Imunomarcagem de MHCI, MHCII e Miomesina no músculo sóleo de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias.....	59
Figura 13. Imunomarcagem de MHCI, MHCII e EH-miomesina no músculo sóleo de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias.....	60
Figura 14. Expressão protéica de miomesina no músculo sóleo de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias	61

Figura 15. Expressão protéica de EH-miomesina no músculo sóleo de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias	62
Figura 16. Expressão gênica de miomesina (A) e Proteína M (B) no músculo EDL de ratos controles e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias	63
Figura 17. Imunomarcação de MHCI, MHCII e Miomesina no músculo EDL de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias	64
Figura 18. Imunomarcação de MHCI, MHCII e proteína M no músculo EDL de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias	65
Figura 19. Expressão protéica de Miomesina no músculo EDL de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias	66
Figura 20. Expressão protéica de proteína M no músculo EDL de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR em Tempo Real.....	40
Tabela 2. Peso do coração, peso corpóreo e razão peso coração/peso corpóreo	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Considerações Gerais.....	18
1.2 Tecido Muscular	18
1.3 Aspectos Gerais dos Hormônios Tireoideanos.....	23
1.4 O Hormônio Tireoideano e o Tecido Cardíaco	27
1.5 O Hormônio Tireoideano e o Músculo Esquelético.....	30
2 OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo Geral	35
2.2 Objetivos específicos.....	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 Experimentos <i>in vivo</i>.....	37
3.1.1 Animais	37
3.1.2 Protocolos Experimentais	38
3.1.2.1 Indução ao Hipertireoidismo	38
3.1.2.2 Indução ao Hipotireoidismo	38
3.1.3 Análise da Massa Cardíaca	38
3.1.4 Análise de expressão gênica	39
3.1.4.1 Extração de RNA	39
3.1.4.2 Transcrição Reversa	39
3.1.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real	39
3.1.5 Análise de Imunomarcacão	41
3.1.6 Análise de Expressão Protéica	42
3.1.6.1 Extração da proteína total dos músculos Sóleo e EDL tratados com T3.....	42
3.1.6.2 Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e Imunomarcacão	42
3.2 Experimentos <i>in vitro</i>.....	43
3.2.1 Obtenção de cultura primárias de cardiomiócitos	43
3.2.2 Tratamento dos Cardiomiócitos	44
3.2.3 Análise da expressão gênica	44
3.3 Experimentos de Transfecção Transiente	45

3.3.1 Cultivo das Células C2C12.....	45
3.3.2 Transfecção das Células C2C12	45
3.3.3 Tratamento das células C2C12	45
3.3.4 Atividade das Luciferases	46
3.4 Análises Estatísticas.....	46
4 RESULTADOS.....	47
4.1 Efeito do T3 na relação peso coração/peso corpóreo	48
4.2 Ação do T3 nas proteínas estruturais da banda M no coração.....	48
4.2.1 Miomesina e EH-miomesina	48
4.3 Ação do T3 nas proteínas estruturais da banda M nos músculos Sóleo e EDL	57
4.3.1 Miomesina e EH-miomesina no músculo Sóleo	57
4.3.2 Miomesina e proteína M no músculo EDL.....	62
5 DISCUSSÃO	68
5.1 Influência do T3 na expressão de proteínas estruturais da banda M no coração de ratos	69
5.2 Influência do T3 na expressão de proteínas estruturais da banda M no músculo esquelético de ratos.....	73
6 CONCLUSÃO	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

1 INTRODUÇÃO

:

1.1 Considerações Gerais

A importância da função do hormônio tireoideano (HT) na diferenciação, crescimento e metabolismo tem sido bem documentada. Sabe-se que, nos mamíferos, os HTs atuam em todos os órgãos e vias metabólicas e seus principais efeitos incluem o desenvolvimento de vários tecidos, consumo de oxigênio, regulação da temperatura corpórea, frequência cardíaca e também o metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras. Além disso, o HT tem papel fundamental na síntese e degradação de muitos outros fatores de crescimento e hormônios, o que resulta em efeitos secundários nos tecidos e órgãos (Oppenheimer et al., 1987; Yen, 2001).

Nos músculos estriados, o hormônio tireoideano exerce profundos efeitos diretos e indiretos. Como exemplo dos efeitos diretos, o HT provoca alterações na expressão de diversos genes que leva a modificações contráteis/mecânicas e mudanças na atividade metabólica dos músculos (Caiozzo e Haddad, 1996; Portman, 2008; Simonides e van Hardeveld, 2008). No entanto, apesar dos diversos estudos envolvendo o hormônio tireoideano, pouco se sabe sobre sua influência na estrutura de órgãos vitais como o coração.

1.2 O tecido muscular

O tecido muscular é composto por diferentes células, contendo proteínas contráteis. Portanto, as células musculares estão envolvidas numa função especializada – a contração. Há três tipos distintos de tecidos musculares em vertebrados, os quais são diferenciados por suas características morfológicas e funcionais, e cada tipo de tecido possui uma estrutura adaptada para seu papel fisiológico. O músculo cardíaco e esquelético são as formas de músculo estriado, as quais são formadas pela fusão de longas células. Nas células musculares estão presentes estruturas cilíndricas conhecidas como miofibrilas, onde se encontram os elementos contráteis da célula muscular, os sarcômeros (Figura 1). O sarcômero dos mamíferos possui aproximadamente 2 μm de comprimento e podem encurtar até ~70% de seu comprimento original durante

a contração. O sarcômero é constituído por diversas estruturas que incluem os filamentos transversos finos e grossos, a linha Z e a banda M longitudinais. A região do sarcômero contendo a linha Z e os filamentos finos é a banda I, enquanto a área restante é a banda A. A banda A abrange a área onde os filamentos finos e grossos se interdigitam, uma área dos filamentos grossos apenas e da banda M (Huxley e Niedergerke, 1954; Huxley e Hanson, 1954). Os filamentos finos são compostos primariamente pela actina e o principal constituinte dos filamentos grossos é a miosina. A contração muscular é um ciclo de vários passos envolvendo a cabeça globular da miosina, actina e hidrólise de ATP (Holmes e Geeves, 2000).

Figura 1. Esquema simplificado de um sarcômero (Au, 2004). Os filamentos grossos, finos, linha Z e banda M estão indicadas em azul, vermelho, caixa amarela e verde, respectivamente.

A actina é uma proteína citoesquelética ubíqua que funciona em diversos processos celulares. Há três isoformas de actina (α , β e γ) – a α -actina é encontrada no tecido muscular, enquanto outros tipos celulares expressam β - e γ -actina, como parte do citoesqueleto (dos Remedios et al., 2003). A CapZ localiza-se na linha Z sarcomérica, onde sua principal função inclui centralizar a montagem de actina. Ela se liga às extremidades de filamentos de actina pré-existent para regular a adição ou perda dos monômeros de actina

(Yamashita et al., 2003). A CapZ também pode interagir com a α -actinina 2. A α -actinina é o componente mais abundante do disco Z (Robson et al., 1970). A família α -actinina, possui quatro membros, as quais as α -actininas 1 e 4 são expressas em tecidos não musculares, onde estão envolvidas na organização do citoesqueleto (Otey e Carpen, 2004). As α -actininas 2 e 3 são as isoformas específicas dos músculos estriados, onde alinham e realizam ligação cruzada com a actina, além de organizar sua orientação polarizada (Stromer e Goll, 1972). A tropomiosina, localizada nos filamentos finos, age como um ponto de ancoragem para a troponina (Phillips et al., 1986). O complexo troponina liga-se aos íons de cálcio para a contração muscular, via controle da disponibilidade de sítios de ligação de miosina nos filamentos de actina. No estado de repouso, a contração muscular é inibida pela tropomiosina/troponina. O aumento de Ca^{+2} citosólico satura a proteína de ligação ao cálcio, a troponina C, revelando um fragmento hidrofóbico que permite a interação com a troponina I. Isso leva a mudanças conformacionais no complexo troponina que subsequentemente desloca a tropomiosina, permitindo a interação da actina com a miosina. A troponina T ancora o complexo troponina nos filamentos finos através da ligação com a tropomiosina (Holmes e Geeves, 2000).

A miosina é o principal componente dos filamentos grossos. Componentes adicionais nos vertebrados incluem MyBP-C e MyBP-H (também conhecidas como proteína C e proteína H, respectivamente). As cabeças de miosina nos filamentos grossos possuem uma polaridade que as orienta numa direção, que é reversa à banda M (Au, 2004). A molécula de miosina completa é um complexo de seis cadeias polipeptídicas consistindo de duas cadeias pesadas e dois pares de diferentes cadeias leves. O amino-terminal (N-terminal) das formas de cadeia pesada forma uma cabeça globular conhecida como domínio motor, enquanto o carboxi-terminal (C-terminal) forma uma cauda fibrosa α -helical (Au, 2004). O comprimento dos filamentos grossos é regulado pela titina. A titina (também conhecida com conectina) é uma proteína filamentosa elástica gigante de aproximadamente 3 mega Daltons e é a terceira proteína mais abundante nos músculos estriados de vertebrados (Maruyama et al., 1981). A titina estende por metade do sarcômero, com o N-terminal ligado à

linha Z e o C-terminal localizado na banda M, orientando a molécula de titina. A principal função dessa molécula é a manutenção do alinhamento sarcomérico durante a contração muscular (Maruyama et al., 1981; Trinick et al., 1984), geração de tensão passiva (Granzier e Labeit, 2004) e é considerada uma régua molecular capaz de regular a formação e comprimento dos filamentos grossos (Whiting et al., 1989), sendo, portanto, essencial para o esqueleto sarcomérico.

Proteínas da banda M são responsáveis pela ancoragem dos filamentos de miosina (Bahler et al., 1985) e da titina (Nave et al., 1989). Tem sido sugerido que a banda M apresenta um importante papel organizacional durante a miofibrillogênese, quando os filamentos grossos nascentes têm de montar e estar alinhados numa treliça regular hexagonal (Ehler et al., 1999; Wang et al., 1998; Yang et al., 2000).

Cinco proteínas foram identificadas na banda M de vertebrados, incluindo a porção C-terminal da titina (Labeit e Kolmerer, 1995), miomesina (Grove et al., 1984), EH-miomesina (Agarkova et al., 2000), proteína M (Masaki e Takaiti, 1974) e a isoforma muscular da creatina quinase (MM-CK) (Eppenberger et al., 1967). Miomesina, EH-miomesina e proteína M ligam-se à zona central dos filamentos de miosina (Bahler et al., 1985) e à porção C-terminal da titina (Nave et al., 1989), indicando suas participações no citoesqueleto sarcomérico.

A miomesina e a proteína M, proteínas intimamente relacionadas, pertencem à família das proteínas imunoglobulinas, a qual os membros consistem de um domínio N-terminal único seguido de domínios de sequência conservada semelhantes à imunoglobulina (Ig) e fibronectina tipo III (Bantle et al., 1996; Vinkemeier et al., 1993). Apesar dessa forte similaridade, essas duas proteínas exibem diferentes padrões de expressão. Enquanto a miomesina é encontrada em todos os tipos de músculos estriados, a proteína M está ausente no coração embrionário e no músculo de contração lenta adulto (Carlsson et al., 1990; Grove et al., 1989). Além disso, a miomesina está localizada na banda M já nos primeiros sarcômeros do coração embrionário

(Ehler et al., 1999) e pode ser detectada no músculo estriado de todos os vertebrados (Agarkova et al., 2000). Isso sugere que a miomesina é um componente sarcomérico essencial, controlando a montagem e manutenção da estrutura da banda A (Pask et al., 1994). A proteína M mostra um pico de expressão tardio no desenvolvimento embrionário em todas as fibras musculares, então é depois reprimida, e finalmente re-expressa somente nas fibras de contração rápida esquelética e fibras musculares cardíacas no adulto (Carlsson et al., 1990; Grove et al., 1985). Assim, a expressão bifásica e fibra específica da proteína M podem requerer mecanismos de controle em adição a um simples mecanismo de ativação músculo-específico que é necessário para a miomesina.

A inserção de um fragmento adicional entre os domínios 6 e 7 da miomesina convencional leva à isoforma EH-miomesina, que pode ser encontrada no coração embrionário de todos os vertebrados superiores (Agarkova et al., 2000). Portanto, a EH-miomesina pode servir como um marcador de coração embrionário de vertebrados, porque a expressão de nenhuma outra proteína miofibrilar é restrita ao coração numa maneira tão firmemente controlada (Schiaffino e Reggiani, 1996).

Além da expressão no coração, as proteínas estruturais da banda M também são expressas no músculo esquelético, em diferentes tipos de fibra. O músculo esquelético de vertebrados é plástico, devido à diversificada proporção de tipos de fibra de músculo para músculo refletindo a sua fisiologia e uso. Há múltiplas isoformas de proteínas contráteis que contribuem para tal plasticidade, sendo a família das cadeias pesadas de miosina (MHC, *myosin heavy chain*) as mais conhecidas. As principais isoformas de MHC são MHC I, IIa, IIx e IIb, ordenadas pelo aumento de taxa catalítica, sendo a MHC IIb cinco vezes mais veloz que a MHC I. Consequentemente, fibras de contração lenta expressam MHC I e são classificadas como tipo 1, enquanto os tipos IIA, IIX e IIB são fibras de contração mais rápida, as quais expressam MHC IIa, IIx e IIb, respectivamente (Gunning e Hardeman, 1991; Simonides e van Hardeveld, 2008).

As proteínas da banda M apresentam diferentes padrões de expressão nas fibras musculares. Além da expressão específica no coração, a EH-miomesina é fortemente expressa nas fibras tipo I do músculo esquelético e em uma parte das fibras IIa, mas está ausente nas demais fibras dos membros inferiores de camundongos adultos. A expressão de EH-miomesina começa nas fibras de contração lenta dos músculos da pata do camundongo somente alguns dias após o nascimento, isto é, quando seu acúmulo cessa no músculo cardíaco. Todas as fibras musculares nos membros posteriores de camundongos neonatais possuem a mesma composição de banda M, expressando quase a mesma quantidade de proteína M e sendo negativas para EH-miomesina. Esse também é o caso de numerosas fibras que expressam MHC I nesse momento (Maggs et al., 2000). No entanto, todas as fibras tipo I nos camundongos adultos são positivas para EH-miomesina. O aumento pós-natal da expressão de EH-miomesina é acompanhado por uma repressão de proteína M nas mesmas fibras (Agarkova et al., 2004). Como resultado, EH-miomesina e proteína M demonstram um padrão de expressão complementar no músculo esquelético de camundongos adultos.

Diversos fatores mecânicos e/ou hemodinâmicos podem afetar o tecido muscular, além de vários hormônios modularem o trofismo cardíaco e o metabolismo do músculo esquelético. Desta forma, alterações nos níveis de alguns fatores hormonais como, por exemplo, glicocorticóides, noradrenalina, angiotensina, insulina e hormônios tireoideanos, atuam diretamente no tecido cardíaco e no músculo esquelético (Kahaly e Dillmann, 2005; Katz e Bogardus, 1990; Katz et al., 1995; Kurowski e Czerwinski, 1990; Rooyackers e Nair, 1997). O presente trabalho abordará a influência do hormônio tireoideano na estrutura dos músculos estriados.

1.3 Aspectos gerais dos Hormônios Tireoideanos

Doenças ligadas à tireóide estão entre as desordens endócrinas mais comuns no mundo. Estimativas recentes sugerem que a doença afeta 9% a 15% da população adulta feminina e uma menor porcentagem da população

adulta masculina (Canaris et al., 2000). Desse modo, a correta função e manutenção dos níveis dos hormônios tireoideanos (HTs) – chamados 3,5,3'-triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) – possuem significância biológica, médica e social. Como hormônios, eles desempenham diversos papéis na diferenciação, crescimento e metabolismo de diversos órgãos e tecidos (Yen, 2001). Os HTs também apresentam um papel crítico durante a embriogênese e no início da vida, e possuem profundos efeitos metabólicos na vida adulta, incluindo mudanças no metabolismo de consumo de oxigênio, proteínas, carboidratos, lipídios e vitaminas (Yen, 2001).

A forma do hormônio tireoideano secretada em maior quantidade pela glândula tireóide é a tiroxina (T4) e uma menor quantidade é secretada como triiodotironina (T3). A via principal para produção de T3 circulante é via desiodação 5' no anel externo do T4 por selenoproteínas conhecidas como selenodesiodases das iodotironinas (Kohrle, 2000). Os HTs, em sua grande maioria, circulam ligados às proteínas plasmáticas. A entrada e a saída do hormônio nas células ocorrem principalmente através de transportadores específicos que regulam a captação e o efluxo dos hormônios tireoideanos e, em uma menor parcela, por difusão passiva (Hennemann et al., 2001, Ribeiro et al., 1998). O T3 é a principal isoforma responsável pelos efeitos genômicos do HT, uma vez que se liga aos receptores nucleares (TRs) com uma afinidade 10 vezes maior que o T4 (Kohrle, 2000).

A ação genômica clássica do T3 é mediada pela ligação a seus receptores (TRs). Os TRs são fatores de transcrição pertencentes a uma superfamília dos receptores nucleares, que incluem receptores para vitamina D (um esteróide), ácido retinóico, proliferador peroxissomal e receptores cujos ligantes não são conhecidos (Beato et al., 1995; Lazar, 1993).

Há duas isoformas de TRs, TR α e TR β , que, nos humanos, localizam-se nos cromossomos 17 e 3, respectivamente. O gene THR α codifica duas proteínas diferentes – TR α -1 e TR α -2 – que são geradas pelo processamento alternativo do RNAm TR α (*splicing* alternativo). Outras isoformas $\Delta\alpha$ 1 e $\Delta\alpha$ 2 foram identificadas como transcritos derivados de um novo promotor no intron 7

do gene de TR α (Chassande et al., 1997). Essas variantes menores não possuem o domínio de ligação ao DNA e agem como antagonistas dominantes negativas (Plateroti et al., 2001). O gene THR β codifica três isoformas principais – TR β -1, TR β -2 e TR β -3 – que são codificadas a transcritos gerados por seleção alternativa de promotores (Hodin et al., 1989; Lazar, 1993). Somente α 1, β 1, β 2 e β 3 se ligam ao hormônio. A isoforma TR α 2, bem como $\Delta\alpha$ 1 e $\Delta\alpha$ 2, por não se ligarem ao T3, podem inibir a transcrição mediada por TR β 1 ou TR α 1, provavelmente por competir com a ligação aos elementos responsivos ao T3 (TRE, *thyroid response element*) e com a formação de heterodímeros com RXR (Ribeiro et al., 1998). A expressão dos RNAs dos TRs varia com o desenvolvimento e com a diferenciação celular (Lazar, 1993). Os RNAs do TR α 1, TR α 2 e TR β 1 são expressos em quase todos os tecidos, ainda que em níveis diferentes. Desse modo, o TR α 1 é abundante nos músculos esqueléticos, tecido adiposo marrom e no coração, o TR α 2 é particularmente abundante no cérebro e o TR β 1 é expresso em grande quantidade no fígado, rim e cérebro (Lazar, 1993). Já o TR β 2 é expresso principalmente na glândula pituitária e em outras áreas do cérebro (Hodin et al., 1989, Lazar, 1993). Em ratos, o TR β 3 é expresso no fígado, rim e pulmão (Williams, 2000). Essa expressão variada dos TRs constitui um mecanismo específico para a regulação local da transcrição gênica induzida pelo T3 (Hodin et al., 1990; Yen et al., 2006).

Os TRs atuam como fatores de transcrição regulados pelo ligante porque podem interagir com o T3 (ligante) bem como aos TREs que tipicamente estão localizados nos promotores dos genes alvo (Yen et al., 2006). Os TRs se ligam aos TREs como monômeros, homodímeros ou heterodímeros. Os heterodímeros são comumente formados por um TR e uma das isoformas do receptor de ácido retinóico (RXR α , RXR β ou RXR γ) (Lazar e Chin, 1990). Enquanto ligado ao T3, os TRs induzem a transcrição e, na ausência de T3, eles reprimem a transcrição, assim os genes alvos podem ser regulados positivamente ou negativamente pelo T3 (Wu e Koenig, 2000). Nos TREs regulados positivamente, TRs não ligados medeiam a repressão da transcrição basal da expressão de genes alvos, desse modo, a ligação com T3

estimula a indução ativa da transcrição gênica. Nos TREs regulados negativamente, apo-TRs medeiam constitutivamente a expressão gênica e a ligação com o T3 induz a repressão ativa da transcrição gênica via mecanismos que não estão precisamente determinados (Bassett et al., 2003).

Segue abaixo, modelo simplificado da ação do T3 na expressão de genes alvos:

Figura 2. Esquema representando a ação genômica do T3 na célula. Elipses verdes representam transportadores de T3 e T4 na membrana plasmática, círculo verde representa o T3, círculo vermelho representa o T4, quadrado roxo representa o TR, losango azul representa RXR e setas representam TREs.

Embora o T3 é conhecido por exercer várias de suas ações através da via clássica genômica regulando a transcrição gênica, uma série de efeitos do T3 ocorrem rapidamente e não são afetados por inibidores de transcrição e de síntese protéica (Davis et al., 1989; Davis et al., 2000; Wrutniak-Cabello et al., 2001). Ações não genômicas dos HTs tem sido descritas na membrana plasmática, no citoplasma e em organelas celulares. Tais ações incluem a modulação do transporte de Na^+ , K^+ , Ca^{+2} e glicose, ativação da proteína quinase C (PKC), proteína quinase A (PKA) e quinases reguladas por sinal extracelular, e regulação do metabolismo de fosfolípidos (Kavok et al., 2001). O T4 regula a termogênese e atividade lipolítica de catecolaminas em 30 min (Lynch et al., 1985, Wrutniak e Cabello, 1989). Ações não genômicas do T3 também tem sido descritas no miocárdio e na vasculatura, onde o T3 aumenta

o débito cardíaco e reduz a resistência vascular sistêmica num adulto normal dentro de 3 min (Schmidt et al., 2002) e estudos *in vitro* sugerem que o T3 rapidamente e não genomicamente regule a enzima Ca^{+2} ATPase e canais de Na^{+} e K^{+} (Davis P.J. e Davis F.B., 2002).

Os efeitos do T3 em variados tecidos são diversos e ressaltam o seu papel vital na função celular. Desta maneira, em adição à função do T3 no metabolismo de macronutrientes e toda energia e consumo de oxigênio, o T3 também regula importantes funções em tecidos específicos. Recentemente, a regulação transcricional de genes alvos em alguns desses tecidos tem sido estudada, principalmente no coração e no músculo esquelético (Diez et al., 2008; Fernandez et al., 2008; Klein e Danzi, 2007; Simonides e van Hardeveld, 2008).

1.4 O Hormônio Tireoideano e o tecido cardíaco

O sistema cardiovascular é um sistema extremamente sensível a alterações na concentração sistêmica e local dos HTs (Danzi e Klein, 2004; Kahaly e Dillmann, 2005; Klein e Danzi 2007). Pacientes hipertireoideos freqüentemente referem a alterações cardíacas cronotrópicas. Os principais sintomas são palpitações, bem como batimentos cardíacos irregulares e vigorosos. Tanto o hipertireoidismo quanto o hipotireodismo produzem mudanças na contratilidade cardíaca, no consumo de oxigênio miocárdial, no débito cardíaco, na pressão sanguínea e na resistência vascular sistêmica (Biondi et al., 2002; Kahaly e Dillmann, 2005).

No hipertireoidismo, a contratilidade cardíaca, débito cardíaco, freqüência cardíaca de repouso, velocidade de contração e relaxamento estão aumentados (Danzi e Klein, 2003; Polikar et al., 1993). O débito cardíaco pode estar aumentado de 50 a 300% em comparação com os indivíduos normais, como resultado de efeitos combinados do aumento de freqüência cardíaca de repouso, da contratilidade, da fração de ejeção e do volume sanguíneo com uma diminuição da resistência vascular sistêmica (Biondi et al., 2002; Klein e

Ojamaa, 2001). Uma queda da resistência vascular periférica diminui a pós-carga e aumenta a eficiência miocárdica (Bengel et al., 2003). O aumento do volume sanguíneo e do retorno venoso leva ao aumento da pré-carga cardíaca, promovendo um aumento do débito cardíaco (Biondi et al., 2002). Animais e humanos apresentam massa cardíaca aumentada em decorrência do hipertireoidismo (Biondi et al., 2002; Klein e Hong, 1986). A hipertrofia, usualmente aumento da massa ventricular esquerda, resulta de uma sobrecarga do volume (causada pela expansão do volume de plasma e aumento da pré-carga) e do aumento de trabalho cardíaco. Tal hipertrofia é uma adaptação compensatória que em troca aumenta a síntese protéica nos cardiomiócitos (Sugden e Clerk; 1998). A indução do hipertireoidismo experimental resulta nessa forma de hipertrofia (Coleman et al., 1989).

O quadro de hipotireoidismo apresenta manifestações clínicas opostas às do hipertireoidismo. As manifestações cardíacas decorrentes do hipotireoidismo são resultado da diminuição da ação do HT tanto no coração quanto na vasculatura periférica. Os sinais clínicos mais comuns são bradicardia, diminuição da pressão do pulso e hipertensão diastólica (Danzi e Klein, 2003; Klein e Ojamaa, 2001). O aumento da pressão diastólica é acompanhado por uma queda da pressão sistólica. Desse modo, o hipotireoidismo resulta num aumento da resistência vascular sistêmica, diminuição da contratilidade cardíaca e diminuição do débito cardíaco (Klein e Danzi, 2007).

Diversas manifestações cardíacas causadas por disfunções da tireóide estão associadas a alterações na expressão de genes alvo do T3 (Danzi et al., 2005; Kahaly e Dillmann, 2005). Como o T3 induz mudanças na expressão de genes específicos envolvidos nos eventos contráteis, o ciclo de contração cardíaca será discutido. O ciclo cardíaco é dividido entre contração sistólica e relaxamento diastólico. Processos relacionados à contração são denominados “mecanismos inotrópicos” e mecanismos relacionados ao relaxamento são denominados “efeitos lusitrópicos”. O T3 diminui o tempo de relaxamento diastólico, isto é, o coração hipertireoideo relaxa numa velocidade alta (atividade lusitrópica), enquanto a diástole é prolongada no hipotireoidismo

(Mintz et al., 1991). A velocidade na qual a concentração de Ca^{+2} livre é reduzida no citosol é um evento crucial para o relaxamento diastólico, deixando uma menor quantidade de Ca^{+2} disponível para a troponina C dos filamentos finos das miofibrilas. Várias bombas de Ca^{+2} e trocadores de íons contribuem para a redução de Ca^{+2} no citosol, mas o contribuinte mais importante é a bomba de Ca^{+2} localizada no retículo sarcoplasmático (Rohrer e Dillmann, 1988). O gene codificante da bomba de Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático é marcadamente responsivo ao T3. O T3 aumenta a expressão gênica da ATPase Ca^{+2} ativada do retículo sarcoplasmático (SERCA2) (Zarain-Herzberg et al., 1994). A liberação de Ca^{+2} e sua captação dentro do retículo sarcoplasmático são determinantes críticos para função contrátil sistólica e relaxamento diastólico (Fazio et al., 2004). A atividade de SERCA2 é influenciada pela fosfolambam e sua fosforilação, que é influenciada pelo estado tireoideo (Carr e Kranias, 2002; Kiss et al., 1998). A ATPase $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ também está localizada no sarcolema e influencia indiretamente a concentração de Ca^{+2} . A ATPase $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ é somente uma das várias bombas iônicas consumidoras de ATP que contribuem para o aumento do consumo de oxigênio do coração hipertireoideo (Kahaly e Dillmann, 2005).

Um exemplo típico das ações de T3 em proteínas contráteis cardíacas específicas é a indução da mudança do tipo da isoforma de MHC observada no coração de ratos e coelhos tratados com T3 (Lompre et al., 1984; Morkin, 2000). O T3 regula diretamente a expressão de genes codificantes para MHC- α e MHC- β . A administração de T3 estimula a expressão do gene MHC- α , mas diminui a expressão do gene MHC- β (Morkin, 2000). No coração de ratos hipertireoideos, a miosina é exclusivamente composta por MHC- α , o que leva a uma rápida movimentação da cabeça globular da miosina ao longo dos filamentos finos e acelera a contração cardíaca (Lompre et al., 1984; Morkin, 2000).

O T3 também leva a um aumento marcante da expressão de actina cardíaca, a qual faz parte dos filamentos finos. Em situações de hipertireoidismo crônico, há também um aumento na produção da actina esquelética (Winegrad et al., 1990). A proteína regulatória cardíaca troponina I,

que faz parte dos filamentos finos, também é influenciada pelo estado tireoideo. O T3 influencia especialmente a isoforma de troponina I cardíaca em ratos pós-natais e adultos jovens pelo aumento da expressão do gene codificante para essa proteína (Dieckman e Solaro, 1990).

Embora diversos estudos tenham demonstrado os efeitos do T3 em proteínas cardíacas funcionais, pouco se sabe sobre a influência do T3 em proteínas estruturais cardíacas. Segundo Ferreira et al, o hipertireoidismo pode levar a um severo desarranjo sarcomérico ao longo do tempo no coração (Ferreira et al., 2003). Dessa forma, um estudo englobando a influência do T3 nas proteínas estruturais cardíacas seria de alta relevância.

1.5 O Hormônio Tireoideano e o Músculo Esquelético

O músculo esquelético é um dos principais tecidos alvo do HT (Everts et al., 1983; Haddad et al., 1997; Hausman e Watson, 1994; Simonides e van Hardeveld, 2008). O HT afeta o desenvolvimento normal do músculo esquelético de vertebrados, sendo primordial para o desenvolvimento da massa muscular e da diferenciação das características bioquímicas e contráteis do tecido (Finkelstein et al., 1991). Os HTs modulam reações de consumo de energia (contração e relaxamento) bem como reações dentro de vias de produção de energia com a deficiência tireoidea levando à debilidade muscular e fadiga excessiva (Silvestri et al., 2007).

Pacientes hipotireoideos e hipertireoideos apresentam diferentes mudanças metabólicas no músculo esquelético, porém com conseqüências similares. No primeiro caso, a fadiga é diretamente relacionada com a deficiência das ações do HT. No último, no entanto, a causa principal é a depleção do substrato energético muscular devido a uma alta demanda metabólica. Uma das conseqüências primárias da disfunção tireoideana é a baixa tolerância ao exercício, devido às suas ações diretas sobre o sistema cardíaco e muscular (van den Beld et al., 2005).

Tanto o hipotireoidismo quanto o hipertireoidismo induzem fraqueza muscular. A principal razão para essa fraqueza muscular é o decréscimo na eficiência muscular associada à perda de massa muscular (Zurcher et al., 1989). Em animais, a miopatia tirotóxica está associada à atrofia muscular como resultado da degradação protéica excedendo o aumento da síntese (Barrett e Gelfand, 1989; Muller e Seitz, 1984), enquanto a tireoidectomia em animais usualmente induz atrofia muscular tanto pelo decréscimo da síntese protéica, quanto pelo aumento da degradação (Garlick et al., 1988).

O T3 é um dos reguladores mais potentes da expressão de proteínas miofibrilares. Esse hormônio executa um papel crucial na diferenciação de características bioquímicas e contráteis do músculo esquelético de vertebrados, como transformação da isoforma de MHC embriônica ou fetal para isoformas adultas (Finkelstein et al., 1991; Gambke et al., 1983). Após o desenvolvimento para a fase adulta, há um processo de maturidade lento que continua a afetar o músculo esquelético durante a vida, resultando em dediferenciação de músculos de fibras lentas e rápidas numa idade avançada (Fitts et al., 1984). No adulto, T3 exerce profundos efeitos na expressão de genes codificantes de isoformas específicas de miosina e outras proteínas contráteis (Caiozzo et al., 1998; Caiozzo e Haddad, 1996; Haddad et al., 1998; Izumo e Mahdavi, 1988). O hipotireoidismo aumenta a expressão da isoforma MHC lenta, enquanto o hipertireoidismo tem efeito contrário, isto é, diminui a expressão de MHC lenta (Caiozzo et al., 1992; Ianuzzo et al., 1991; Izumo et al., 1986).

No músculo soléo de rato, o tratamento com T3 induz uma alta indução do conteúdo do tipo MHC II e repressão do conteúdo do tipo MHC I (Larsson et al., 1994; Larsson et al., 1995; Larsson e Yu, 1997; Li e Larsson, 1997). A resposta parece estar positivamente relacionada ao tempo do tratamento com T3, isto é, o conteúdo relativo das isoformas do tipo MHC IIa e miosina de cadeia leve rápida eram maiores nas fibras de soléo de ratos tratados com T3 por 8 semanas que os tratados por 4 semanas (Li e Larsson, 1997). No EDL, o tratamento com T3 induziu a repressão do tipo MHC IIa em fêmeas, sem

restrição da idade do animal, enquanto nenhuma mudança no tipo MHC IIa ocorre em machos (Larsson e Yu, 1997).

A transição MHC em resposta ao T3 não é somente músculo específica (Izumo et al., 1986; Larsson e Yu, 1997; Yu et al., 1998), mas também parece que alguns tipos de fibra I respondem rapidamente ao T3, enquanto outras respondem tardiamente ou não respondem (Caiozzo et al., 1998; Yu et al., 1998). Isso é consistente com o conceito de subpopulações de fibras tipo I, que são indistinguíveis com respeito a sua composição de MHC, mas diferem umas das outras em resposta à denervação e ao T3 (Caiozzo et al., 1998). Uma única fibra muscular pode apresentar uma regulação própria e singular da isoforma de MHC, independente do fato de ser do tipo I ou II. Uma fibra obtida do soléu (predominantemente do tipo I) de ratos hipertireoideos mostra uma regulação específica da expressão das isoformas de MHC, dependente de T3 (Yu et al., 1998). Diferentes músculos de ratos de ambos os gêneros mostram variações surpreendentes em resposta ao tratamento com T3. O mecanismo exato pelo qual essas alterações músculo específicas e tipo de fibra específica ocorrem não é conhecido. Entretanto, diferentes hipóteses têm sido levantadas. Uma delas preconiza que o efeito músculo e tipo de fibra específico se devam ao fato de que cada músculo e tipo de fibra apresentam uma quantidade e tipo de TR (d'Albis et al., 1990; Hughes et al., 1993). Vale ressaltar que fibras de contração lenta possuem maior nível de TRs (Hughes et al., 1993). Outra hipótese se baseia no fato de que músculos de contração lenta e rápida apresentam diferentes taxas de captação de T3 (van Hardeveld e Kassenaar, 1978). Fibras de contração lenta captam T3 de forma mais eficiente que fibras musculares de contração rápida (Muscat et al., 1995).

No estudo de Hudecová (2004) foi demonstrado que alterações nos níveis séricos dos HTs podem alterar a expressão gênica do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ (NCX), dos receptores de rianodina (RyRs) tipo 1 e 2 e dos receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3Rs) em músculo lento e rápido de ratos (Hudecova et al., 2004). É atraente especular que o HT pode alterar a homeostase de cálcio no músculo esquelético e isso influenciaria as propriedades de excitação e contração (Vadaszova et al., 2004). Esse duplo aumento de expressão de

Ca^{+2} -ATPase e receptores de rianodina no músculo de ratos, explica o aumento de contração e taxa de relaxamento no hipertireoidismo e diminuição no hipotireoidismo (Everts, 1996; Everts et al., 1983).

Apesar de diversos estudos abordarem aspectos moleculares e energéticos do músculo esquelético, poucos estudos demonstraram os efeitos do T3 sobre as proteínas sarcoméricas, com exceção das proteínas contráteis MHC, as quais o efeito do T3 está bem estabelecido.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar a ação do T3 sobre a expressão de proteínas estruturais da banda M no coração e músculo esquelético de ratos submetidos ao hipotireoidismo e hipertireoidismo experimental.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o efeito do T3 sobre a expressão gênica e protéica de miomesina, EH-miomesina e proteína M no coração e nos músculos Soléo e EDL de ratos.
- Analisar o efeito do T3 sobre a localização e imunomarcacão das proteínas miomesina, EH-miomesina e proteína M no coração e nos músculos Soléo e EDL de ratos.
- Verificar a ação do T3 no promotor dos genes responsivos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Experimentos *in vivo*

3.1.1 Animais

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) do ICB-USP, de acordo com os Princípios de Ética em Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram utilizados ratos machos adultos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, pesando entre 250 e 300 g (10 semanas de idade), provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas – USP e mantidos ao longo do período experimental no Biotério do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento (ICB-USP). Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas, em sala climatizada com temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e ração (NUVILAB).

Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- Grupo Controle: animais sem tratamento;
- Grupo Hipotireoideo (Hipo): animais tireoidectomizados e tratados com 0,05 % de metimazol e 4,5 mM de CaCl_2 , adicionados à água de beber por 20 dias;
- Grupo 2d: animais induzidos ao hipertireoidismo com 30 μg de T3/g de peso corpóreo/dia durante 2 dias;
- Grupo 4d: animais induzidos ao hipertireoidismo com 30 μg de T3/g de peso corpóreo/dia durante 4 dias;
- Grupo 8d: animais induzidos ao hipertireoidismo com 30 μg de T3/g de peso corpóreo/dia durante 8 dias;

Além disso, animais foram tratados por 2 dias com as seguintes doses de T3: 0,3 μg ; 1,5 μg ; 15 μg e 30 μg de T3/g de peso corpóreo/dia, respectivamente, 1 dose, 5 doses, 50 doses e 100 doses fisiológicas de T3 (Trost et al., 2000).

3.1.2 Protocolos Experimentais

3.1.2.1 Indução ao Hipertireoidismo

Os animais foram induzidos ao hipertireoidismo ao longo de 2, 4 e 8 dias, por injeções intraperitoneais diárias de T3 (triiodotironina – Sigma, St. Louis, MO, EUA) na dose de 30 µg/g de peso corpóreo/dia ou nas doses de 0,3 µg ; 1,5 µg; 15 µg e 30 µg de T3/g de peso corpóreo/dia durante 2 dias. O T3 foi previamente diluído em solução de NaOH 0,04 M e estocado no freezer (–20°C).

3.1.2.2 Indução ao Hipotireoidismo

Os ratos foram anestesiados com ketamina e xilazina. Realizou-se a assepsia, tricotomia e em seguida uma incisão, expondo a região anterior da traquéia até a visualização total da glândula tireóide. A glândula foi retirada com o auxílio de uma pinça e após a tireoidectomia total, o animal foi suturado e tratado com metimazol (Methimazole – Sigma) (0,05 %) e 4,5 mM de CaCl₂ (Calcium Chloride – Sigma), ambos adicionados à água de beber.

3.1.3 Análise da Massa Cardíaca

O trofismo cardíaco modulado pelos hormônios tireoideanos foi quantificado através da relação entre peso total do coração e o peso corpóreo, dado em mg/g de tecido. Após a decapitação, o coração foi rapidamente retirado e pesado, e então foi realizado o cálculo para avaliação da massa cardíaca nos diferentes grupos experimentais.

3.1.4 Análise de expressão gênica

3.1.4.1 Extração de RNA

Para análise de expressão gênica, utilizou-se a técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Real Time PCR*), apresentada posteriormente. Inicialmente, foi realizada a extração do RNA total dos corações, músculos soléo e EDL (extensor digital longo) utilizando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), conforme protocolo recomendado pelo fabricante. Após a extração, o RNA total das amostras foi mensurado em espectrofotômetro, utilizando para a quantificação comprimento de onda de 260 nm. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose denaturante, para verificação da qualidade e integridade do RNA.

3.1.4.2 Transcrição Reversa (RT, *Reverse Transcription*)

A partir de 1 µg de RNA total extraído de uma amostra foi realizada a reação de transcrição reversa para a síntese de uma fita de DNA complementar ao RNAm, o cDNA. Para cada 20 µL de volume final de reação foram adicionados: 1 µL dNTP (dinucleotídeos trifosfato, 10 mM); 2 µL de DTT (0,1 M); tampão 5x (fornecido pelo fabricante); 0,02 µg/µL de iniciadores oligo-DT (oligodesoxitimidina *primer*); 200 U de enzima transcriptase reversa MMLV (Promega, Madison, WI, EUA) e água tratada com dietilpirocarboneto (DEPC). A reação foi incubada por 10 min a 70 °C, 60 minutos a 42 °C e 10 minutos a 95 °C. Essa reação foi realizada em termociclador (Mastercycler gradient – Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). As amostras foram analisadas em gel de agarose 1 %, para verificação da qualidade e integridade do cDNA.

3.1.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (Real Time PCR)

Todas as amostras e controles foram analisados em duplicata e as reações foram fluorescentemente quantificadas com o aparelho ABI Prism 5700 sequence detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As

condições de ciclagem para a reação de PCR em tempo real foram 95 °C por 10 min seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 60 s. Foram utilizadas 40-80 ng/μL de cDNA em uma reação contendo 25 μL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 450 nM de iniciadores (*primers* senso e antisenso) totalizando 55 μL de reação que foi dividida em 2 tubos (duplicatas). As reações foram quantificadas através da análise da fluorescência. A análise das curvas de amplificação foi realizada utilizando-se o Applied Biosystems sequence detection software (Applied Biosystems). O limiar de ciclagem (CT, *cycle threshold*) representa o ciclo de PCR no qual um aumento da fluorescência reportada abaixo do sinal da linha basal pode ser primeiramente detectável. O valor de CT das amostras e controles pode ser ajustado inicialmente pela quantidade de gene do controle interno, no caso, o TFIID, fator de transcrição II D (Stockholm et al., 2001), ($\Delta CT = CT \text{ gene alvo} - CT \text{ do TFIID}$) e, em seguida, comparado com a média do controle pela subtração do ΔCT para atingir o $\Delta\Delta CT$. O valor final de cada amostra é reportado como unidades arbitrárias da diferença relativa da expressão da média do controle (calculado como $2^{-\Delta\Delta CT}$), com a média do controle sendo arbitrariamente 1 (Liu e Saint, 2002; Livak e Schmittgen, 2001).

Os *primers* senso e antisenso foram desenhados em exons diferentes com a finalidade de evitar a amplificação de DNA genômico, caso tal contaminação ocorresse na reação de RT.

As seqüências dos diferentes *primers* utilizados neste estudo estão apresentadas na tabela abaixo:

Tabela 1. Lista de *primers* utilizados nas reações de PCR em Tempo Real.

Gene	Senso	Antisenso	#GenBank
Proteína M	178-ACCTCCTGGACCAATATGCATT	238-TTCGAAGAGGACCTCTCTGTAAGAG	NM008664
Miomesina	1237-TGCTCAAATTCAGCAGGAGTTG	1289-GGATATCAAGTTTGTCCCCTACGA	XM237523
EH-miomesina	471-GGAGGTAGCTTCTAAGGAGCAAAG	537-AGATGGCACCGCTACTGGAT	AY177416
TFIID	616-ACGGACAACGCGTTGATTTT	724-ACTTAGCTGGGAAGCCCAAC	D01034

3.1.5 Análise de imunomarcção

Ratos da linhagem Wistar do sexo masculino (250~300 g p.c.) foram tratados com T3 na dose 0.30 µg/100g pc (100 doses fisiológicas) por 2, 4 e 8 dias. Os ratos foram sacrificados por decapitação e tiveram os ventrículos esquerdos, músculo soléo e EDL retirados rapidamente e congelados em isopentano em nitrogênio líquido. Os tecidos foram cortados em criostato (7,0 µm). As secções foram coletadas em lâminas gelatinizadas, secas por 1 h a temperatura ambiente e fixadas em PFA 4% por 10 min. Bloqueamos com glicina 0,1 M por 5 min, permeabilizamos o tecido em 0,2 % Triton X-100/PB (tampão fosfato, *phosphate buffer*) por 10 min e incubamos com o anticorpo miomesina B4 (Grove, Kurer 1984) com soro normal contra cabra e PB 0,1 M + Triton 0,3 % durante a noite e, no dia seguinte, um anticorpo goat anti-mouse Alexa 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) foi usado para visualização da proteína. Realizamos a mesma metodologia para o anticorpo EH-miomesina (Agarkova et al., 2000) (utilizando um anticorpo secundário goat anti-rabbit Alexa 488 – Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) e proteína M clone AA259 (Vinkemeier et al., 1993) com secundário fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-mouse IgA (Sigma).

Foram realizados os mesmos experimentos de imunofluorescência nos músculos soléo e EDL utilizando o protocolo sugerido por Agarkova (Agarkova et al., 2004). Para diferenciar os diferentes tipos de fibra foram feitas imunofluorescências em cortes seriados para MHC I (clone NOQ7.5.4D, Sigma) e para MHCII (clone My32, Sigma), utilizando como anticorpo secundário o goat anti-mouse Alexa 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA).

3.1.6 Análise de Expressão Protéica

3.1.6.1 Extração da proteína total dos músculos Soléo e EDL tratados com T3

As amostras de tecido foram dissecadas e homogeneizadas em tampão SDS (3.7 M uréia; 134.6 mM Tris-HCl, pH 6.8; 5.4 % SDS; 2.3 % NP-40; 4.45 % β -mercaptoetanol; 4 % glycerol) e 0,1 mL de um coquetel de inibidores de proteinases (Sigma) (Agarkova et al., 2005). As amostras dos músculos foram homogeneizadas nesta solução na proporção de 10 mL por 1 g de tecido e centrifugadas por 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e realizou-se a dosagem de proteína total através do método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976) (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

3.1.6.2 Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e imunomarcagem

Para a realização da quantificação protéica, 25 μ g da proteína total foram submetidos à eletroforese em gel denaturante de poliacrilamida 6 % por 1 hora a 150 Volts. Após a eletroforese, as proteínas totais presentes no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Trans Blot Transfer Medium Pure Membrane – Bio-Rad) em um sistema úmido sob 20 Volts de tensão durante a noite. Após a transferência, a membrana foi incubada com leite em pó desnatado 5 % por 1 hora para bloqueio de ligações inespecíficas e, em seguida, os anticorpos primários específicos para miomesina (1:500, polyclonal rat anti-myomesin My190 Nrt antibody) (Obermann et al., 1996), EH-miomesina (1:1000, rabbit anti-mouse EH) (Agarkova et al., 2000) e proteína M (monoclonal mouse anti-M protein antibody, clone AA259, IgA) (Vinkemeier et al., 1993) foram incubados com leite (1 %). O anticorpo específico para a proteína α -actinina foi utilizado como controle interno da quantidade de proteína carregada (1:2000, Jackson Immuno Research, Newmarket, Suffolk, Reino Unido) (Diniz et al., 2007). Após 1 hora de incubação a temperatura ambiente, a membrana foi lavada com 1x tampão fosfato salino (PBS), por 30 minutos e foram adicionados os anticorpos secundários específicos (1:10000)

horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG, anti-mouse IgGs e anti-rat IgG (Jackson Immuno Research, Newmarket, Suffolk, Reino Unido) por 1 hora a temperatura ambiente. Após a ligação do anticorpo secundário, as membranas foram novamente lavadas com PBS e acrescentou-se a solução de ECL (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido). Ao término deste processo, as membranas foram então expostas ao filme de raio X (CL-Xposure Film – Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA), promovendo a marcação das bandas.

3.2 Experimentos *in vitro*

3.2.1 Obtenção de cultura primárias de cardiomiócitos

Para o estabelecimento das culturas primárias foi utilizado o protocolo descrito previamente (Barreto-Chaves et al., 2000). Ratos neonatos de 1 a 3 dias foram desinfetados com álcool 70 % e decapitados sob condições assépticas. Após abertura da caixa torácica e exposição do coração, este foi rapidamente retirado, os átrios foram desprezados e os ventrículos foram cortados em pequenos pedaços e transferidos para um tubo de centrífuga contendo tampão de digestão à base de pancreatina/colagenase (Worthington biochemical corporation). O tecido foi incubado a 37 °C, sob agitação, durante 10 minutos. Após esse período o sobrenadante foi desprezado e novo tampão de digestão foi adicionado aos fragmentos de tecido para nova incubação por 20 minutos. O sobrenadante contendo células em suspensão foi aspirado e centrifugado para a obtenção do precipitado celular. Esse foi ressuspensionado em soro de bezerro recém-nascido (NCS, *newborn calf serum* – Invitrogen) e guardado em garrafa de cultura mantida em estufa de CO₂, até utilização posterior. Este processo de digestão enzimática do tecido foi repetido até que ocorresse o processamento total do tecido cardíaco. Nesse momento, todas as suspensões celulares foram reunidas e centrifugadas novamente. Este precipitado total foi ressuspensionado em uma solução tampão à base de fosfato e aplicado a um gradiente de Percoll (GE Healthcare, Bucks, Reino Unido). Esse passo permitiu a separação dos miócitos cardíacos dos demais tipos celulares

presentes originalmente no tecido, levando em consideração que as células apresentam volumes e densidades diferentes. Após a centrifugação e formação do gradiente de Percoll (3000 rpm, por 30 minutos a 25 °C), duas bandas celulares se formaram: uma inferior e, portanto, de maior densidade (contendo miócitos), e outra superior, correspondendo aos não-miócitos, principalmente fibroblastos. Essas bandas foram retiradas separadamente do gradiente e lavadas com meio Eagle modificado por Dullbeco (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium – Invitrogen) para a total remoção do Percoll. Após este período as células (miócitos e não miócitos) foram contadas, sua viabilidade estimada pelo método de exclusão do corante azul de Trypan (Trypan Blue - Invitrogen) e, posteriormente plaqueadas em placas de 60 mm, utilizando DMEM contendo NCS e soro de cavalo (HS, Horse Serum - Invitrogen). As placas foram mantidas em estufa de CO₂, sob condições estéreis, até a realização dos experimentos.

3.2.2 Tratamento dos Cardiomiócitos

Antes do tratamento, as células foram privadas parcialmente de soro, sendo mantidas 24 hs com DMEM contendo 0,5 % de NCS e 1 % de 5-bromo-2'-deoxyuridine (Sigma). Os cardiomiócitos em cultura receberam tratamento com T3 (Sigma) por 12, 24 e 48 h na dose de 0,1 µM. O T3 foi previamente diluído em solução de estoque de 1 mg/mL em NaOH 0,04 M e estocado em freezer a -20 °C.

3.2.3 Análise da expressão gênica

Para análise da expressão gênica, a partir das culturas de cardiomiócitos, foi realizada a extração do RNA total, a transcrição reversa e a reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real Time PCR), protocolos estes já descritos anteriormente no item 3.1.4.

3.3 Experimentos de Transfecção Transiente

3.3.1 Cultivo das Células C2C12

Células da linhagem muscular C2C12 (Yaffe e Saxel, 1977) foram cultivadas numa placa de 24 poços em DMEM suplementado com 20 % de soro fetal bovino (FBS, fetal bovine serum) e antibióticos até a confluência de 70 %. Antes da transfecção, as células foram desprovidas de soro e antibióticos.

3.3.2 Transfecção das Células C2C12

As células C2C12 foram transfectadas utilizando-se o reagente Lipofectamina (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante, com ~2.3 Kb da região reguladora do gene da proteína M seguido pelo gene reporter da *firefly* luciferase (pGL3, Promega) (200 ng/poço), com 150 pb da região promotora e com o construto contendo promotor mínimo sem os 220 primeiros pares de bases do primeiro exon. Como controle da eficiência da transfecção, *renilla* luciferase (pRL-CMV, Promega) (10 ng/poço) foi utilizada. Os vetores de expressão contendo o cDNA dos receptores do hormônio tireoideano TR α e β também foram co-transfectados (10 ng/poço). Como controle da eficiência do tratamento com T3, transfectamos 3 cópias de TREs positivos da selenodesiodase do tipo 1, D1 (Zhang et al., 1998).

3.3.3 Tratamento das células C2C12

Após a transfecção, as células foram mantidas em DMEM + 5 % de soro de cavalo (HS, *horse serum*), para induzir a diferenciação. Após 24h o meio foi substituído por DMEM + 5 % HS estripado (hipotiroideo) e tratadas com T3 (50 nM) por 24 h. O HS foi estripado utilizando-se carvão ativado (CCS, *charcoal stripped serum*) (Merck, Darmstadt, Alemanha). O tratamento do soro com carvão ativado é utilizado basicamente para retirar lípidos, esteróides e hormônio tireoideano do soro, mantendo fatores essenciais para proliferação e sobrevivência das células.

3.3.4 Atividade das Luciferases

A atividade das respectivas enzimas luciferase foi determinada com o kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) em luminômetro Lmax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

3.4 Análises Estatísticas

A análise de variância (ANOVA) e o subsequente teste de Tukey foram utilizados para a comparação das médias dos valores de mais de dois grupos experimentais. Para todas as comparações foi considerado significativo $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4. 1 Efeito do T3 na relação peso coração/peso corpóreo

Os efeitos já bem conhecidos do T3 na massa cardíaca são sustentados pelo aumento da razão do peso do coração (PCor) pelo peso corpóreo (PC) (PCor/PC). Conforme o esperado, o tratamento com T3 foi capaz de promover hipertrofia cardíaca (Tabela 2).

Tabela 2. Peso do coração, peso corpóreo e razão peso coração/peso corpóreo

Grupos	Peso coração (mg)	Peso corpóreo (g)	PCoração/PCorpo (mg/g)
Controle	905,33 ± 150,05	237,6 ± 14,12	3,8 ± 0,5
8 dias	1370 ± 134,35**	207,6 ± 5,80*	6,59 ± 0,46**

Animais controle e animais tratados com T3 (100 doses fisiológicas por 8 dias). Os valores são expressos como média ± DP. * $p < 0.005$ e ** $p < 0.001$ quando comparado com o grupo controle.

4.2 Ação do T3 nas proteínas estruturais da banda M no coração

4.2.1 Miomesina e EH-miomesina

Inicialmente, foi analisado o efeito do tratamento com T3 na expressão da miomesina e da EH-miomesina. A expressão gênica de EH-miomesina não foi alterada no coração de ratos induzidos ao hipertiroidismo e hipotiroidismo experimental, enquanto que a expressão gênica de miomesina foi alterada somente com 8 dias de tratamento com T3 (Figura 3).

O método de imunofluorescência foi empregado para a detecção das proteínas miomesina e EH-miomesina nos ventrículos esquerdos de ratos tratados com T3 (30 µg/g pc - 100 doses fisiológicas) por 8 dias. É possível notar que não há alteração da imunomarcagem de miomesina e EH-miomesina no tratamento com T3 (Figura 4).

Figura 3. Expressão gênica de miomesina e EH-miomesina no coração de ratos induzidos ao hipertireoidismo e hipotireoidismo experimental. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão; n=5-6 por grupo. * $p < 0.001$ vs controle.

Figura 4. Imunomarcção para miomesina e EH-miomesina nos ventrículos esquerdos de ratos controle e tratado com T3 por 8 dias. Microscopia Confocal. Aumento de 60 x. A barra representa 10 μ m.

4.2.2 Proteína M

Os níveis do RNAm da proteína M foram avaliados no coração de ratos adultos eutireoideos, submetidos a indução de hipo e hipertireoidismo. Ratos hipotireoideos apresentaram um aumento de 3,4 vezes nos níveis de RNAm de proteína M no coração, quando comparados com ratos eutireoideos (Figura 5A). O oposto foi observado em ratos submetidos ao hipertireoidismo

experimental, os quais apresentaram repressão dos níveis de RNAm de proteína M a níveis indetectáveis (Figura 5A). Além disso, o tratamento de ratos eutireoideos com doses fisiológicas crescentes de T3 por 48h demonstrou uma repressão dose dependente da expressão gênica de proteína M (Figura 5B). Uma dose fisiológica foi suficiente para induzir uma redução de 33 % ($p < 0,01$) da expressão gênica de proteína M. Da mesma forma, doses crescentes de T3 também diminuíram a expressão gênica de proteína M, todos $p < 0.001$ (Figura 5B).

Figura 5. (A) Expressão gênica de proteína M no coração de ratos induzidos ao hipertireoidismo e hipotireoidismo experimental. (B) Expressão gênica de proteína M em coração de ratos tratados com diferentes doses de T3 por 48hs. Os valores estão expressos em média $\pm$ desvio padrão; $n=5-6$ por grupo * $p < 0.01$ vs controle, ** $p < 0.001$ vs controle.

Para avaliar o efeito do T3 na marcação de Proteína M no tecido cardíaco, nós utilizamos anticorpos específicos contra a proteína M (mAb AA259) em secções transversas de ventrículo esquerdo. Um padrão estriado, típico da localização da banda M, foi obtido. O tratamento com T3 (100 doses fisiológicas) resulta num decaimento da imunomarcação de proteína M com 8 dias de tratamento (Figura 6).

Figura 6. Imunomarcção para proteína M nos ventrículos esquerdos de ratos controle e tratado com T3 por 8 dias. Microscopia Confocal. Aumento de 60 x. A barra representa 10 μ m.

Com a finalidade de verificar se o efeito do T3 sobre a proteína M se dava através de uma ação sistêmica ou uma ação direta do T3 sobre os cardiomiócitos, foram realizados testes *in vitro* utilizando cultura primária de cardiomiócitos. O tratamento com T3 por 12, 24 e 48h diminuiu os níveis do RNAm da proteína M significativamente (Figura 7). O tratamento com T3 por 12h reduziu em 70% os níveis do RNAm da proteína M, quando comparados com o controle ($p < 0,01$). Esse efeito foi mantido ao longo do tempo até 48 horas (Figura 7).

Figura 7. Expressão gênica de proteína M em cultura primária de cardiomiócitos. As células foram mantidas em meio completo (controle) ou foram tratadas com T3 (10^{-7} M) por diferentes tempos (12h, 24h e 48h). Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão; n=4 -5 por grupo. * $p < 0.001$ vs controle.

Tendo em vista a ação direta do T3 sobre células musculares cardíacas, se fez necessário investigar se a ação observada se dava através da interação

direta T3-TR-TRE no promotor da proteína M ou por outro mecanismo. Para tanto, foi utilizada uma construção repórter contendo a região promotora proximal -2294 a +228 da proteína M dirigindo a transcrição da luciferase *firefly* (proteína M – Luc) em células C2C12.

O tratamento com T3 diminuiu a atividade promotora da proteína M (Figura 8). A transfecção de TR α 1 e TR β 1 reprimiram igualmente a atividade promotora de proteína M, de maneira dose-dependente (Figura 8).

Figura 8. Regulação da atividade promotora da proteína M pelo T3 através do TR α e TR β . O construto do promotor da proteína M dirigindo o gene da luciferase *firefly* foi co-transfectado em células C2C12 na presença e na ausência de vetores de expressão para TR α 1 e TR β 1 ou o vetor de expressão vazio, pCMX. Células foram tratadas com diferentes doses de T3 (0,1; 1 and 100 nM) ou veículo (V). * $p < 0,001$ vs controle.

Em um segundo experimento, células da linhagem C2C12 foram transfectadas com o promotor mínimo (-158 pb a +228) ou com uma porção de ~2.3 Kb do promotor da proteína M dirigindo a luciferase *firefly*. Essas células foram co-transfectadas com um vetor de expressão contendo o gene do TR α . Como controle positivo para o tratamento com T3 foi utilizado um vetor contendo 3 cópias de TREs positivos descritos no promotor do gene da D1. O tratamento com 50 nM de T3 foi efetivo, uma vez que a atividade promotora da D1 aumentou ~30 vezes (Figura 9). Pode-se notar que a atividade promotora do promotor mínimo ~5 vezes maior que a do promotor com 2.3 Kb. Isso indica

que há elementos repressores do promotor da proteína M na região de -2300pb a -158 pb, uma vez que, sendo tal região deletada, o promotor aumenta a sua atividade. O T3 reprimiu significativamente a atividade promotora do promotor mínimo e do promotor contendo 2.3 Kb (~50 %; $p < 0,01$ e $p < 0,001$ vs controle, respectivamente) (Figura 9). O mesmo experimento foi reproduzido em células HEK e L6. Nesses modelos, a transfecção do promotor mínimo e do promotor contendo 2.3 Kb gerou o mesmo resultado observado nas células C2C12, onde o promotor mínimo apresentou uma atividade promotora maior que o de 2.3 Kb.

A

B

Figura 9. Atividade transcrional do controle positivo D1, pGL3 sem promotor, promotor da proteína M mínimo e com 2.3 Kb. Retângulo escuro representa a região de -2300pb a -158pb, retângulo branco representa a região de -158pb a +1pb, retângulo achurado representa a região de +1 a +228 e losangos representam possível TRE negativo. (A) Os dados estão expressos como unidades arbitrárias onde o grupo de células sem T3 transfectadas com TREs da desidase 1 foi arbitrariamente fixado como 1. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão; $n=3$ por grupo; (B) Os dados estão expressos como unidades arbitrárias onde os grupos sem T3 foram arbitrariamente fixados como 1. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão; $n=3$ por grupo. * $p < 0,01$ vs grupo sem T3, ** $p < 0,001$ vs sem T3

Esses resultados demonstram que o provável TRE responsivo ao T3 encontra-se na porção de -158 pb a +228 pb do promotor da proteína M. Desse modo, construímos dois construtos: um com a porção de -158 a +1 e outro com a porção +1 a +228. O construto contendo TREs positivos da D1, utilizado

como controle positivo, aumentou cerca de 10 vezes com o tratamento com T3 (Figura 8A). Além disso, ambos os construtos contendo as diferentes porções do promotor da proteína M responderam de forma semelhante ao tratamento com T3 (Figura 10). Sendo assim, acreditamos que há dois possíveis TREs negativos regulando o promotor da proteína M, um na região entre -158 a +1 e outro na de +1 a +228.

Figura 10. Atividade transcricional do controle positivo D1, promotor da proteína M mínimo, promotor da proteína M sem a porção 5' do exon 1 (-158 a +1), promotor da proteína M somente com a porção +1 a +228. Retângulo branco representa a região de -158pb a +1pb, retângulo achurado representa a região de +1 a +228 e losangos representam possível TRE negativo. (A) Os dados estão expressos como unidades arbitrárias onde o grupo de células sem T3 transfectadas com TREs da desiodase 1 foi arbitrariamente fixado como 1. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão; n=3 por grupo; (B) Os dados estão expressos como unidades arbitrárias onde os grupos hipotireoideos foram arbitrariamente fixados como 1. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão; n=3 por grupo. * $p < 0,05$ vs grupo sem T3, ** $p < 0,01$ vs sem T3, *** $p < 0,001$ vs sem T3

4.3 Ação do T3 nas proteínas estruturais da banda M nos músculos Sóleo e EDL

4.3.1 Miomesina e EH-miomesina no músculo Sóleo

A expressão gênica da miomesina e da EH-miomesina foi avaliada no músculo sóleo após 2, 4 e 8 dias de tratamento com T3 (100x). A avaliação dos níveis de RNAm demonstrou que o tratamento com T3 reduziu a expressão gênica de miomesina para ~50% e ~30% ($p<0.0001$) após 4 e 8 dias de tratamento, respectivamente (Figura 11A), enquanto a expressão gênica de EH-miomesina não foi alterada nos diferentes tempos de tratamento (Figura 11B).

Figura 11. Expressão gênica de miomesina (A) e EH-miomesina (B) no músculo sóleo de ratos controles e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão; $n=4-6$ por grupo * $p<0,0001$ vs controle

Com o objetivo de avaliar a distribuição da miomesina e EH-miomesina nos diferentes tipos de fibras no músculo sóleo, anticorpos específicos para MHC I (clone NOQ7.5.4D, Sigma), MHCII (clone My32, Sigma), miomesina (clone B4) e EH-miomesina (anti-moEH) foram utilizados. A miomesina (Figura 12), e a EH-miomesina (Figura 13) não apresentaram distribuição diferenciada nos tipos de fibra I e II, mesmo após o tratamento com T3 (2, 4 e 8 dias).

Figura 12. Imunomarcção de MHC I, MHC II e Miomesina no músculo sóleo de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias. Microscopia Confocal. Aumento de 20 x. Barra, 50 μ m.

Figura 13. Imunomarcacão de MHCI, MHCII e EH-miomesina no músculo sóleo de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias. Microscopia Confocal. Aumento de 20x. Barra, 50µm.

A expressão protéica de miomesina e EH-miomesina foi avaliada no músculo sóleo através da técnica de Western blotting utilizando anticorpo específico para miomesina e EH-miomesina. Como controle da quantidade de proteína, utilizamos anticorpo para α -actinina. A expressão protéica de miomesina não foi alterada no músculo Sóleo ao longo do tratamento com T3 (100x) por 2, 4 e 8 dias (Figura 14). Por outro lado, a expressão protéica de EH-miomesina aumenta no músculo sóleo após 2 e 4 dias de tratamento com T3 e reduz com 8 dias de tratamento, mas mantendo-se mais alta que o controle (Figura 15).

Figura 14. Expressão protéica de miomesina no músculo sóleo de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão; n=4 por grupo.

Figura 15. Expressão protéica de EH-miomesina no músculo sóleo de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão; $n=4$ por grupo. * $p<0,001$ vs controle, ** $p<0,0001$ vs controle

4.3.2 Miomesina e proteína M no músculo EDL

O tratamento com T3 por 4 e 8 dias diminuiu a expressão gênica de miomesina no músculo EDL (para ~70% e ~50%, respectivamente, $p<0,0001$, Figura 16A). Além disso, o T3 diminuiu gradativamente a expressão gênica de proteína M ao longo do tempo; 2, 4 e 8 dias (Figura 16B).

Figura 16. Expressão gênica de miomesina (A) e proteína M (B) no músculo EDL de ratos controles e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão; n=4-6 por grupo * $p < 0,001$ vs controle ** $p < 0,0001$ vs controle

Em relação à distribuição de miomesina no músculo EDL, não foi observada alteração após tratamento com T3 nos diferentes tempos estudados (Figura 17). A proteína M apresentou uma imunomarcacão diferenciada nos tipos de fibra I e II. Observou-se que as fibras tipo II apresentaram maior marcação para proteína M e, ainda, o tratamento com T3 promoveu uma marcante diminuição na intensidade de marcação, sendo indetectável após 8 dias de exposição ao hormônio (Figura 18).

Figura 17. Imunomarcção de MHC I, MHC II e Miomesina no músculo EDL de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias. Microscopia Confocal. Aumento de 20 x. Barra, 50 μ m.

Figura 18. Imunomarcção de MHC I, MHC II e proteína M no músculo EDL de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias. Microscopia Confocal. Aumento de 20 x. Barra, 50 μ m.

A expressão protéica de miomesina não foi alterada no músculo EDL ao longo do tratamento com T3 (100x fisiológica) por 2, 4 e 8 dias (Figura 19). Os dados de expressão protéica da proteína M acompanharam os de expressão gênica, onde a expressão protéica de proteína M diminuiu em ratos tratados com T3 (100x fisiológica) por 4 e 8 dias (Figura 20).

Figura 19. Expressão protéica de miomesina no músculo EDL de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão; n=4 por grupo.

Figura 20. Expressão protéica de proteína M no músculo EDL de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão; $n=3-4$ por grupo. * $p<0,001$ vs controle

5 DISCUSSÃO

5.1 Influência do T3 na expressão de proteínas estruturais da banda M no coração de ratos

No presente estudo, demonstramos que o T3 possui um efeito forte e rápido na expressão gênica da proteína M no coração. Os efeitos de T3 no coração são marcantes na proteína M, porém pode-se observar que a expressão gênica de miomesina também foi alterada após um longo tratamento com T3, mas sem alterações da sua imunomarcação. Além disso, os mecanismos moleculares da ação do T3 envolvem a transcrição da proteína M, pois esse foi capaz de reprimir a atividade promotora desse gene em ensaios de transfecção transiente.

Atualmente, está bem estabelecido que o T3 leva a um aumento do cronotropismo e inotropismo cardíacos, resultando em aumento de função. O aumento agudo de função cardíaca conduzidos pelo T3 evolui, entretanto, para hipertrofia, um cenário completamente oposto que eventualmente leva à severa perda de função, incluindo falência do miocárdio e arritmia atrial (Ching et al., 1996). Até hoje, o perfil da expressão de importantes genes no coração tem sido descrito de maneira aguda e crônica em animais tratados com T3, porém pouco se sabe sobre a expressão de genes durante a transição do estado de ganho para perda de função cardíaca. Está claro, por exemplo, que o T3, num período curto e longo de tratamento, aumenta a expressão do gene da miosina de cadeia pesada alfa (MHC- α), enquanto reprime o gene da MHC beta (MHC- β) (Dillmann, 1990; Klein e Ojamaa, 2001). Esse efeito leva a um aumento da velocidade de contração, sendo portanto, a base do ganho de cronotropismo induzido pelo T3. O gene da ATPase do retículo sarcoplasmático Ca^{+2} ativada (SERCA-2, *sarcoplasmic reticulum Ca^{+2} ATPase*) também é induzido pelo T3 num período agudo e acredita-se que esse é o principal evento molecular que auxilia no aumento da velocidade de relaxamento do coração (Muller et al., 1997; Takeuchi et al., 2003). Uma vez que a alta expressão de MHC- α e SERCA-2 são mantidas pelo T3, mesmo quando a hipertrofia descompensada é estabelecida, pode-se interpretar que esses genes não estão envolvidos diretamente na transição entre a hipertrofia adaptativa e insuficiência e, até

hoje, não há um gene candidato em potencial para tal dramática mudança de função.

Apesar de uma grande gama de estudos abordarem a ação do T3 na expressão de genes relacionados com a contração, pouco se sabe sobre sua influência na expressão de genes estruturais sarcoméricos. Proteínas estruturais sarcoméricas são cruciais para a manutenção da arquitetura sarcomérica e também são importantes para regular vias de sinalização no controle do tamanho celular. É bem conhecido, por exemplo, que o disco Z contém calcineurina, uma importante fosfatase envolvida na patogênese da hipertrofia cardíaca (Frey e Olson, 2003; Molkentin et al., 1998). Além disso, a proteína quinase C Epsilon (PKC ϵ), quinase que controla a contratilidade e hipertrofia, pode se ligar ao disco Z (Dorn e Force, 2005). De acordo, a banda M contém creatina kinase M, uma enzima envolvida no restabelecimento do reservatório de energia (Stolz et al., 1998). Enolase, fosfofrutoquinase e adenilato quinase também estão localizadas na banda M, sugerindo um papel adicional da banda M como uma estrutura ligada à regulação do metabolismo energético (Keller et al., 2000; Lange et al., 2002). Além de tudo, está claro que os elementos de ancoragem sarcoméricos podem também ser importantes lugares de sinalização, portanto um melhor entendimento dos genes estruturais sarcoméricos será de uso para aprofundarmos nosso conhecimento na plasticidade cardíaca.

Esse é o primeiro estudo que analisou sistematicamente a ação do T3 sobre a distribuição, regulação e expressão das proteínas estruturais sarcoméricas. Nossos resultados obtidos do tratamento de ratos com T3 demonstraram que o gene da proteína M é particularmente sensível ao hormônio. Somente uma única dose de T3 foi suficiente para reduzir significativamente os níveis de RNAm da proteína M. Doses crescentes de T3 progressivamente diminuíram os níveis de RNAm da proteína M, indicando um efeito dose dependente. A sensibilidade desse gene ao T3 foi confirmada por experimentos utilizando ratos hipotireoideos, onde foi observado um marcante aumento na expressão gênica de proteína M. O gene da miomesina não

apresentou a mesma sensibilidade que o da proteína M, uma vez que só foi regulado após 8 dias de tratamento com T3.

Além dos dados obtidos a partir da análise da expressão gênica, ainda avaliamos a imunomarcação para proteínas da banda M em situações controle e após estímulo com T3. A imunofluorescência para proteína M mostrou um padrão típico estriado, o que corrobora o padrão obtido em estudos anteriores utilizando o mesmo anticorpo (Grove et al., 1985; Grove et al., 1984; Obermann et al., 1996). A intensidade da imunomarcação da proteína M diminuiu com tratamento com T3, o que sugere uma menor expressão protéica da proteína M. O fato de que tanto os níveis de RNAm, quanto a intensidade de imunomarcação da proteína M foram rapidamente e intensamente reprimidos, sugere que mecanismos relacionados ao controle da transcrição e estabilidade do RNAm podem estar envolvidos. No entanto, não é descartado que uma proteólise rápida, como o sistema ubiquitina/proteassoma, possa estar envolvido no processo celular da proteína M dependente de T3.

A fim de descartar influências sistêmicas, testamos os efeitos do T3 sobre a expressão gênica de proteína M em cultura primária de cardiomiócitos. O T3 rapidamente diminuiu a expressão gênica de proteína M (em 12 horas), um efeito que se estabilizou ao longo de 48 horas. Esses resultados demonstraram que o T3 age diretamente nos cardiomiócitos para reprimir a expressão da proteína M e tal efeito não depende da interação do T3 com outros sistemas ou com outros hormônios, como hormônio do crescimento, sistema simpatoadrenal ou regulação autonômica.

Na maioria dos casos, o controle da expressão por T3 é realizado através de receptores nucleares, TR, que reconhecem e se ligam a seqüências do TRE. Dessa maneira, transfectamos células da linhagem C2C12 com um construto contendo 2.3 Kb do promotor da proteína M dirigindo a região codificadora da luciferase *firefly* para verificar a responsividade de tal promotor ao T3. Os resultados mostram que o T3 regula a atividade promotora da proteína M via ligação a TR α e β . Além disso, a responsividade do promotor da proteína M foi dose dependente, demonstrando a sensibilidade desse promotor

ao T3. Em outro ensaio, demonstramos que o possível TRE negativo do promotor da proteína M encontra-se na região de -158 a +228 pb, uma vez que esse construto respondeu da mesma maneira que o de 2.3 Kb ao tratamento com T3. Acreditamos ainda que possam existir dois TREs em potencial no fragmento menor do promotor (-158 a +228 pb), um presente na região de -158 a +1 pb e outro de +1 a +228 pb, pois ambos os fragmentos do promotor da proteína M diminuíram sua atividade no tratamento com T3.

Um estudo do nosso grupo demonstrou previamente, por microscopia eletrônica, que a banda M é primeiramente afetada pelo T3, um efeito que precede a falência do miocárdio, sugerindo que a degeneração da banda M pode provocar a desorganização do sarcômero (Ferreira et al., 2003). Poucos estudos analisaram a banda M sob diferentes condições patológicas. No nível estrutural, foi demonstrado que o consumo de álcool perturba a estrutura normal da banda M no miocárdio fetal (Syslak et al., 1994). Esse efeito parece ser específico na banda M, uma vez que outras estruturas sarcoméricas estão bem preservadas, isto é, bandas I e A e disco Z (Syslak et al., 1994). Estudos subseqüentes abordaram a abundância da miomesina em doenças cardíacas. Hein e colaboradores (1995) reportaram que a isquemia no miocárdio resulta na diminuição da imunoexpressão de miomesina (Hein et al., 1995). Por outro lado, Wang e colaboradores (1999) não encontraram alteração na imunoexpressão de miomesina no coração submetido à sobrecarga de pressão (Wang et al., 1999). Finalmente, a imunoexpressão foi utilizada para avaliar a abundância de miomesina em hamsters distróficos e nenhuma alteração foi encontrada (Eppenberger et al., 1984). Não há estudos demonstrando a regulação da proteína M no coração devido à sobrecarga cardíaca ou outras cardiomiopatias. Na verdade, pelo nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo a demonstrar de forma sistemática a regulação da miomesina, EH-miomesina e proteína M combinadas.

O impacto biológico da repressão da proteína M dependente de T3 na organização e estabilidade da banda M ainda não está claro, mas é válido ressaltar que esse fenômeno precede o conhecido desarranjo miofibrilar observado numa tirotoxicose induzindo hipertrofia cardíaca e também parece

ser específica uma vez que outras proteínas da banda M não são sensíveis ao T3. Foi demonstrado que a proteína M é uma proteína importante para a estabilidade da banda M (Agarkova e Perriard, 2005), portanto é possível visionar que o aumento do inotropismo/cronotropismo, bem conhecidos por ocorrerem no hipertireodismo, junto com a deficiência da banda M, pode resultar num severo desarranjo na estrutura sarcomérica. É interessante notar que o disco Z parece ser preferencialmente o alvo, comparado com a banda M, em outras alterações fisiopatológicas como hipertrofia cardíaca e insuficiência, causada por aumento de sobrecarga por pressão (Knoll et al., 2002; Pyle e Solaro, 2004; Solaro, 2005), o que leva à possibilidade de proteínas ancoraduras no sarcômero serem diferencialmente afetadas sob tais alterações fisiológicas.

Outros estudos utilizando modelos diferentes de plasticidade cardíaca, como hipertensão, diabetes e cardiomiopatias genéticas, são necessários para explorar o papel da proteína M. Ainda está para ser elucidado se alterações nas proteínas sarcoméricas estruturais são a causa ou a consequência do aumento da atividade cardíaca.

5.2 Influência do T3 na expressão de proteínas estruturais da banda M no músculo esquelético de ratos

Devido à ação do T3 no coração e sua influência no músculo esquelético, decidimos avaliar também a expressão das proteínas estruturais da banda M nesse tecido. Dessa forma, demonstramos que o T3 possui diferentes efeitos nos músculos sóleo (predomínio de fibras tipo I) e EDL (predomínio de fibras tipo II). No músculo sóleo, o T3 diminuiu a expressão gênica de miomesina e não alterou a de EH-miomesina. Em contrapartida, com relação à expressão protéica, o T3 aumentou a expressão de EH-miomesina e não alterou a de miomesina. No músculo EDL, T3 diminuiu a expressão gênica e protéica de proteína M, enquanto diminuiu a expressão gênica de miomesina, mas não altera sua expressão protéica.

O T3 é um importante fator para o desenvolvimento normal do músculo esquelético de vertebrados, sendo necessário para formação da massa muscular e diferenciação das características bioquímicas e contráteis desse tecido (Finkelstein et al., 1991). Os HTs modulam reações de consumo de energia (contração e relaxamento) bem como reações de produção de energia, sendo assim, uma alteração dos níveis de HTs pode levar à fraqueza muscular e fadiga (Silvestri et al., 2007).

O T3 é um dos mais potentes reguladores da expressão de isoformas de proteínas miofibrilares. O T3 possui um papel crucial na diferenciação de características bioquímicas e contráteis do músculo esquelético de vertebrados, como a transformação de MHC embrionária ou fetal para as isoformas de MHC adultas (Finkelstein et al., 1991, Gambke et al., 1983). No adulto, o T3 exerce efeitos profundos na expressão de genes codificantes de isoformas específica de MHC e outras proteínas contráteis (Caiozzo et al., 1998; Caiozzo e Haddad, 1996; Haddad et al., 1998; Izumo e Mahdavi, 1988). Tanto a diminuição quanto o excesso de HT regulam a expressão de MHC lenta, reduzindo-a ou aumentando-a, respectivamente (Caiozzo et al., 1992; Ianuzzo et al., 1991; Izumo et al., 1986). A regulação da família MHC é complexa e o mesmo gene MHC pode ser regulado pelo T3 diferentemente, de forma tecido-específica (Izumo et al., 1986). O T3 afeta profundamente as propriedades mecânicas e o perfil de expressão de miosinas no sóleo, mas não no plantar (Caiozzo et al., 1991). Da mesma forma, o T3 também leva a um grande aumento no conteúdo de mitocôndria, enzimas e mioglobina no músculo esquelético lento de ratos comparado com o rápido, sugerindo que o T3 também influencie o perfil metabólico dos músculos esqueléticos numa maneira músculo-específico (dos Santos et al., 2001).

Quase 400 genes do músculo esquelético são responsivos ao T3 em humanos (Clement et al., 2002), sendo a maioria deles envolvida no metabolismo energético e na síntese protéica. No entanto, apesar dos inúmeros estudos sobre a influência do T3 em diversos genes musculares, pouco se sabe sobre sua influência na expressão de proteínas estruturais sarcoméricas, como as proteínas da banda M. Esse é o primeiro estudo a

analisar sistematicamente a expressão de proteínas estruturais sarcoméricas em diferentes tipos musculares.

A influência do T3 foi analisada em dois tipos musculares distintos, o músculo sóleo (predominância de fibras tipo I) e músculo EDL (predominância de fibras tipo II). Já está bem estabelecido o efeito diferencial do T3 nos diferentes tipos de músculos. Um exemplo é o controle da expressão gênica das MHCs pelo T3. Em músculos de contração lenta, como o sóleo, o hipertireoidismo está associado com um aumento da expressão de RNAm da MHC II, enquanto o hipotireoidismo está associado com um aumento nos níveis de RNAm de MHC I. Nos músculos de contração rápida, como o EDL, o hipotireoidismo está associado com aumento de MHC IIa, enquanto o hipertireoidismo diminui a expressão de MHC IIa (Izumo et al., 1986). Fica claro, portanto, a importância em estudar o tratamento do T3 em diferentes tipos musculares.

Agarkova e colaboradores (2004) descreveram a expressão das proteínas estruturais da banda M nos diferentes tipos musculares. A banda M das fibras de contração rápida é caracterizada por uma alta expressão dos níveis de proteína M e da isoforma menor de miomesina, com ausência do fragmento EH, enquanto na banda M de fibras de contração lenta, a proteína M é praticamente ausente e uma parcela significativa da molécula de miomesina maior (EH-miomesina) é expressa (Agarkova et al., 2004). Desse modo, analisamos a expressão de miomesina e EH-miomesina no músculo sóleo e a expressão de miomesina e proteína M no músculo EDL.

No músculo sóleo, o T3 diminuiu a expressão gênica de miomesina com 4 e 8 dias de tratamento, enquanto a expressão gênica de EH-miomesina não foi alterada. Além disso, estudos de imunomarcagem de miomesina e EH-miomesina revelaram que tais proteínas não são diferencialmente expressas nas fibras tipo I e nas fibras tipo II do músculo sóleo, bem como não sofreram alteração significativa na imunomarcagem com o tratamento com T3 (100 x fisiológica) por 2, 4 e 8 dias. No entanto, através da técnica de Western blotting, notou-se que o T3 não alterou a expressão protéica de miomesina ao

longo do tratamento, enquanto que a EH-miomesina apresentou um aumento de expressão com 2 e 4 dias de tratamento com T3 e, após 8 dias, diminuiu, mas para níveis ainda mais altos que o controle. A modulação diferencial de miomesina e EH-miomesina no músculo sóleo, pode se dever à capacidade do T3 em modular a expressão de diversas proteínas no nível traducional ou pós-traducional, onde, apesar da regulação negativa da expressão gênica de miomesina, T3 pode recrutar mecanismos compensatórios, não afetando a expressão protéica da mesma, enquanto que, apesar de T3 não modular a expressão gênica de EH-miomesina, provavelmente mecanismos traducionais ou pós-traducionais regulam sua expressão protéica.

O tratamento com T3, no músculo EDL, foi capaz de diminuir tanto a expressão gênica de miomesina, quanto a de proteína M. Os dados de imunofluorescência demonstraram que a imunomarcação de miomesina também não foi alterada no músculo EDL após o tratamento com T3, entretanto a proteína M foi detectada nas fibras tipo II, enquanto nas fibras tipo I, não há marcação para proteína M, de acordo com estudos anteriores (Agarkova et al., 2004). Além disso, o T3 diminuiu a imunomarcação de proteína M ao longo do tratamento, sendo que com 8 dias de tratamento, os níveis de fluorescência de proteína M estavam indetectáveis. Através da técnica de Western Blotting, pode-se notar que os níveis da proteína miomesina não foram alterados no tratamento com T3, entretanto, o T3 foi capaz de reduzir os níveis protéicos da proteína M com 4 e 8 dias de tratamento. O mesmo mecanismo ocorrido no músculo sóleo, provavelmente se repete no músculo EDL para a proteína miomesina, onde sua expressão gênica é alterada pelo T3, enquanto os níveis protéicos são mantidos. T3 pode regular no nível traducional ou pós-traducional os níveis de miomesina no músculo EDL. Já a proteína M é regulada pelo T3 no nível transcricional, pois a expressão gênica de proteína M é diminuída no tratamento com T3, bem como sua imunomarcação e sua expressão protéica. Como demonstrado em nossos estudos no coração, o gene da proteína M é regulado diretamente pelo T3, o mesmo pode ocorrer no músculo EDL, onde o T3 regule o promotor da proteína M.

Sabe-se que o T3 afeta a expressão de proteínas musculares no nível pós-transcricional, traducional e pós-traducional (Caiozzo e Haddad, 1996), mas os mecanismos subjacentes a esses efeitos continuam obscuros. Diferentes músculos de ratos de ambos os gêneros mostram variações nas respostas ao tratamento com T3. O mecanismo exato envolvido nessas diferenças músculo específico e tipo de fibra específica não são conhecidas, entretanto, foi sugerido que essas diferenças estão no número e tipo de TR (d'Albis et al., 1990), ou no fato que músculos de contração lenta e rápida captam o T3 a diferentes taxas (van Hardeveld e Kassenaar, 1978). Ambas isoformas de TR, TR α e TR β , são expressas no músculo esquelético baseados em análises de RNAm e proteína (Haddad et al., 1998; White e Dauncey, 1999). Análises de modelos knockout demonstraram que ambos os receptores podem, em princípio, induzir os efeitos do T3 (Yu et al., 2000). O TR α , entretanto, parece ser a isoforma predominante a mediar os efeitos do T3 na expressão gênica, o que é mais evidente nos músculos de contração lenta (Johansson et al., 2003; Yu et al., 2000). Isso é sustentado pela falência do agonista seletivo para TR β , o GC-24, a induzir a troca de isoformas de MHC no músculo sóleo (Miyabara et al., 2005). A maior expressão de TR α no músculo lento comparado com o rápido tem sido sugerido como responsável pela diferença da responsividade ao HT (Bahi et al., 2005). No entanto, medidas da capacidade de ligação nuclear do T3 indicam valores idênticos para ambos os tipos musculares (Haddad et al., 1998). As isoformas de TR, bem como seus níveis de expressão, portanto, não parecem ser variáveis relevantes. Todavia, múltiplos co-ativadores e inibidores, bem como a expressão de isoformas de TR não ligantes ao T3, podem modular a transcrição mediada por TR e não pode ser excluído que essa é uma fonte de variação fibra específica na sensibilidade do hormônio (O'Shea e Williams, 2002; Pircher et al., 2005). Muscat (1995) relatou que a captação de T3 ou seu processamento é mais eficiente em células musculares de contração lenta que em fibras musculares de contração rápida (Muscat et al., 1995), uma vez que a conversão de T4 a T3 não ocorre no músculo esquelético de roedores (van Doorn et al., 1983).

Como mencionado anteriormente, as fibras de contração lenta do músculo esquelético de roedores expressam a isoforma EH-miomesina, que foi caracterizada previamente como componente específico do coração na fase embrionária (Agarkova et al., 2000). Essa isoforma é gerada a partir da inserção de um exon denominado EH no meio da molécula. Tal região exonica pode agir como uma molécula elástica similar ao domínio PEVK da proteína sarcomérica elástica titina, que protege o domínio semelhante à imunoglobulina de se desdobrar durante estiramento extremo (Linke et al., 1998).

A expressão de EH-miomesina começa nas fibras de contração lenta dos membros do camundongo vários dias após o nascimento, isto é, quando sua acumulação cessa no músculo cardíaco. Todas as fibras dos músculos dos membros inferiores do camundongo possuem a mesma composição de banda M, expressando quantidades iguais de proteína M e não apresentando expressão de EH-miomesina. No entanto, todas as fibras tipo I do camundongo adulto são EH-miomesina positivas. Portanto, podemos assumir que a composição molecular da banda M em fibras lentas, em particular a expressão de EH-miomesina, não é completamente controlada por mecanismos genéticos levando à co-expressão com certas isoformas de MHC lenta. O progressivo aumento da locomoção dos animais após o nascimento pode estimular o desenvolvimento de estruturas especializadas da banda M nas fibras lentas maduras. O aumento pós-natal da expressão de EH-miomesina é acompanhado pela repressão da proteína M nas mesmas fibras (Agarkova et al., 2004; Carlsson e Thornell, 1987). Como resultado, parece que a proteína M e a EH-miomesina imprimem propriedades exclusivas à banda M. A banda M das fibras rápidas é caracterizada pela expressão de altos níveis de proteína M e miomesina. Tal composição molecular provavelmente melhora o alinhamento e firmeza dos filamentos espessos nas fibras rápidas, caracterizadas pelo rápido desenvolvimento da força (Pask et al., 1994). Portanto, a composição da banda M provavelmente reflete as adaptações do citoesqueleto sarcomérico a um regime funcional especial em diferentes músculos. Um exemplo disso é a taxa muscular de contração e relaxamento, que aumenta com o aumento dos níveis de T3 e, esse aumento de trabalho, pode levar a uma adaptação

muscular na tentativa de suprir as necessidades do tecido. Desse modo, o aumento da expressão protéica de EH-miomesina no músculo sóleo, bem com a queda de expressão de proteína M no músculo EDL pode ser um mecanismo compensatório, para o aumento de demanda muscular estabelecido pelo T3. O músculo extraocular (EOM), que contém predominantemente fibras rápidas, expressa uma alta proporção de EH-miomesina e baixos níveis de proteína M (Andrade et al., 2003). A composição da banda M parece depender mais do nível de atividade ou da taxa de trabalho dos sarcômeros numa fibra específica do que ao tipo da fibra. Uma característica peculiar de todos os músculos murinos que apresentam um regime funcional especial (por exemplo, diafragma, sóleo e EOM) são os baixos níveis de proteína M acompanhados de altos níveis de EH-miomesina. Todos esses músculos estão comprometidos à contratilidade contínua normalmente acompanhada de estiramento (Collins et al., 1975; Gillis, 1996; Walmsley et al., 1978). É conhecido que tal stress (normalmente denominado contração excêntrica) pode levar ao dano das estruturas contráteis (Allen, 2001). Estudos revelam que o rompimento das pontes da banda M é um dos sinais mais proeminentes de dano após contração excêntrica (Macpherson et al., 1996; Ogilvie et al., 1988). No entanto, a hipótese sobre a importância da EH-miomesina e da proteína M para as propriedades mecânicas da banda M ainda tem de ser testada.

6 CONCLUSÃO

Pode-se concluir com o presente estudo:

1. T3 é um potente regulador da proteína sarcomérica estrutural, proteína M, no coração de ratos.
2. Além disso, T3 age diretamente no promotor do gene da proteína M, reprimindo sua expressão.
3. A expressão gênica de miomesina diminui durante longa exposição e a altas doses de T3 no coração.
4. No músculo esquelético, T3 foi capaz de aumentar a expressão protéica de EH-miomesina no músculo sóleo e diminuir a expressão de proteína M no EDL.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Agarkova I, Auerbach D, Ehler E, Perriard JC. A novel marker for vertebrate embryonic heart, the EH-myomesin isoform. *J Biol Chem*. 2000;275(14):10256-64.

Agarkova I, Perriard JC. The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere. *Trends Cell Biol*. 2005;15(9):477- 85.

Agarkova I, Schoenauer R, Ehler E, Carlsson L, Carlsson E, Thornell LE, et al. The molecular composition of the sarcomeric M-band correlates with muscle fiber type. *Eur J Cell Biol*. 2004;83(5):193-204.

Allen DG. Eccentric muscle damage: mechanisms of early reduction of force. *Acta Physiol Scand*. 2001;171(3):311-19.

Andrade FH, Merriam AP, Guo W, Cheng G, McMullen CA, Hayess K, et al. Paradoxical absence of M lines and downregulation of creatine kinase in mouse extraocular muscle. *J Appl Physiol*. 2003;95(2):692-99.

Au Y. The muscle ultrastructure: a structural perspective of the sarcomere. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(24):3016-33.

Bahi L, Garnier A, Fortin D, Serrurier B, Veksler V, Bigard AX, et al. Differential effects of thyroid hormones on energy metabolism of rat slow- and fast-twitch muscles. *J Cell Physiol*. 2005;203(3):589-98.

Bahler M, Wallimann T, Eppenberger HM. Myofibrillar M-band proteins represent constituents of native thick filaments, frayed filaments and bare zone assemblages. *J Muscle Res Cell Motil*. 1985;6(6):783-800.

Bantle S, Keller S, Haussmann I, Auerbach D, Perriard E, Muhlebach S, et al. Tissue-specific isoforms of chicken myomesin are generated by alternative splicing. *J Biol Chem*. 1996;271(32):19042-52.

*De acordo com :

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2004 May 06].

Barreto-Chaves ML, Heimann A, Krieger JE. Stimulatory effect of dexamethasone on angiotensin-converting enzyme in neonatal rat cardiac myocytes. *Braz J Med Biol Res = Rev Bras Pesq Med Biol.* 2000;33(6):661-64.

Barrett EJ, Gelfand RA. The in vivo study of cardiac and skeletal muscle protein turnover. *Diabetes Metab Rev.* 1989;5(2):133-48.

Bassett JH, Harvey CB, Williams GR. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Mol Cell Endocrinol.* 2003;213(1):1-11.

Beato M, Herrlich P, Schutz G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell.* 1995;83(6):851-57.

Bengel FM, Lehnert J, Ibrahim T, Klein C, Bulow HP, Nekolla SG, et al. Cardiac oxidative metabolism, function, and metabolic performance in mild hyperthyroidism: a noninvasive study using positron emission tomography and magnetic resonance imaging. *Thyroid.* 2003;13(5):471-77.

Biondi B, Palmieri EA, Lombardi G, Fazio S. Effects of thyroid hormone on cardiac function: the relative importance of heart rate, loading conditions, and myocardial contractility in the regulation of cardiac performance in human hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metabol.* 2002;87(3):968-74.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.

Caiozzo VJ, Baker MJ, Baldwin KM. Novel transitions in MHC isoforms: separate and combined effects of thyroid hormone and mechanical unloading. *J Appl Physiol.* 1998;85(6):2237-48.

Caiozzo VJ, Haddad F. Thyroid hormone: modulation of muscle structure, function, and adaptive responses to mechanical loading. *Exerc Sport Sci Rev.* 1996;24:321-61.

Caiozzo VJ, Herrick RE, Baldwin KM. Influence of hyperthyroidism on maximal shortening velocity and myosin isoform distribution in skeletal muscles. *Am J Physiol.* 1991;261(2 Pt 1):C285-95.

Caiozzo VJ, Herrick RE, Baldwin KM. Response of slow and fast muscle to hypothyroidism: maximal shortening velocity and myosin isoforms. *Am J Physiol.* 1992;263(1 Pt 1):C86-94.

Canaris GJ, Manowitz NR, Mayor G, Ridgway EC. The Colorado thyroid disease prevalence study. *Arch Intern Med.* 2000;160(4):526-34.

Carlsson E, Grove BK, Wallimann T, Eppenberger HM, Thornell LE. Myofibrillar M-band proteins in rat skeletal muscles during development. *Histochemistry.* 1990;95(1):27-35.

Carlsson E, Thornell LE. Diversification of the myofibrillar M-band in rat skeletal muscle during postnatal development. *Cell Tissue Res.* 1987;248(1):169-80.

Carr AN, Kranias EG. Thyroid hormone regulation of calcium cycling proteins. *Thyroid.* 2002;12(6):453-57.

Chassande O, Fraichard A, Gauthier K, Flamant F, Legrand C, Savatier P, et al. Identification of transcripts initiated from an internal promoter in the c-erbA alpha locus that encode inhibitors of retinoic acid receptor-alpha and triiodothyronine receptor activities. *Mol Endocrin.* (Baltimore, Md. 1997;11(9):1278-90.

Ching GW, Franklyn JA, Stallard TJ, Daykin J, Sheppard MC, Gammage MD. Cardiac hypertrophy as a result of long-term thyroxine therapy and thyrotoxicosis. *Heart.* 1996;75(4):363-68.

Clement K, Viguerie N, Diehn M, Alizadeh A, Barbe P, Thalamas C, et al. In vivo regulation of human skeletal muscle gene expression by thyroid hormone. *Genome Res.* 2002;12(2):281-91.

Coleman PS, Parmacek MS, Lesch M, Samarel AM. Protein synthesis and degradation during regression of thyroxine-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 1989;21(9):911-25.

Collins CC, O'Meara D, Scott AB. Muscle tension during unrestrained human eye movements. *J Physiol.* 1975;245(2):351-69.

d'Albis A, Chanoine C, Janmot C, Mira JC, Couteaux R. Muscle-specific response to thyroid hormone of myosin isoform transitions during rat postnatal development. *Eur J Biochem.* 1990;193(1):155-61.

Danzi S, Dubon P, Klein I. Effect of serum triiodothyronine on regulation of cardiac gene expression: role of histone acetylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(4):H1506-11.

Danzi S, Klein I. Thyroid hormone and blood pressure regulation. *Curr Hypertens Rep*. 2003;5(6):513-20.

Danzi S, Klein I. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *Minerva Endocrinol*. 2004;29(3):139-50.

Davis PJ, Davis FB. Nongenomic actions of thyroid hormone on the heart. *Thyroid*. 2002;12(6):459-66.

Davis PJ, Davis FB, Lawrence WD. Thyroid hormone regulation of membrane Ca^{2+} -ATPase activity. *Endocri Res*. 1989;15(4):651-82.

Davis PJ, Shih A, Lin HY, Martino LJ, Davis FB. Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR. *J Biol Chem*. 2000;275(48):38032-39.

Dieckman LJ, Solaro RJ. Effect of thyroid status on thin-filament Ca^{2+} regulation and expression of troponin I in perinatal and adult rat hearts. *Circ Res*. 1990;67(2):344-51.

Diez D, Grijota-Martinez C, Agretti P, De Marco G, Tonacchera M, Pinchera A, et al. Thyroid hormone action in the adult brain: Gene expression profiling of the effects of single and multiple doses of Triiodo-L-thyronine in the rat striatum. *Endocrinology*. 2008;149(8):3989-4000

Dillmann WH. Biochemical basis of thyroid hormone action in the heart. *Am J Med*. 1990;88(6):626-30.

Diniz GP, Carneiro-Ramos MS, Barreto-Chaves ML. Angiotensin type 1 (AT1) and type 2 (AT2) receptors mediate the increase in TGF-beta1 in thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy. *Pflugers Arch*. 2007;454(1):75-81.

Dorn GW, 2nd, Force T. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Investig*. 2005;115(3):527-37.

dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, et al. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev.* 2003;83(2):433-73.

dos Santos RA, Giannocco G, Nunes MT. Thyroid hormone stimulates myoglobin expression in soleus and extensorum digitalis longus muscles of rats: concomitant alterations in the activities of Krebs cycle oxidative enzymes. *Thyroid.* 2001;11(6):545-50.

Ehler E, Rothen BM, Hammerle SP, Komiyama M, Perriard JC. Myofibrillogenesis in the developing chicken heart: assembly of Z-disk, M-line and the thick filaments. *J Cell Sci.* 1999;112 (Pt 10):1529-39.

Eppenberger ME, Eppenberger HM, Kaplan NO. Evolution of creatine kinase. *Nature.* 1967;214(85):239-41.

Eppenberger ME, Schoenenberger R, Eppenberger HM. Myofibrillar M-line structure in normal and dystrophic hamster muscle. *Muscle Nerve.* 1984;7(4):304-11.

Everts ME. Effects of thyroid hormones on contractility and cation transport in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* 1996;156(3):325-33.

Everts ME, van Hardeveld C, Ter Keurs HE, Kassenaar AA. Force development and metabolism in perfused skeletal muscle of euthyroid and hyperthyroid rats. *Horm Metab Res Hormon- Stoffwechselforschung.* 1983;15(8):388-93.

Fazio S, Palmieri EA, Lombardi G, Biondi B. Effects of thyroid hormone on the cardiovascular system. *Recent Prog Horm Res.* 2004;59:31-50.

Fernandez V, Tapia G, Varela P, Gaete L, Vera G, Mora C, et al. Causal role of oxidative stress in liver preconditioning by thyroid hormone in rats. *Free Radic Biol Med.* 2008;44(9):1724-31.

Ferreira PJ, L'Abbate C, Abrahamsohn PA, Gouveia CA, Moriscot AS. Temporal and topographic ultrastructural alterations of rat heart myofibrils caused by thyroid hormone. *Microsc Res Tech.* 2003;62(5):451-59.

Finkelstein DI, Andrianakis P, Luff AR, Walker D. Effects of thyroidectomy on development of skeletal muscle in fetal sheep. *Am J Physiol.* 1991;261(5 Pt 2):R1300-06.

Fitts RH, Brimmer CJ, Troup JP, Unsworth BR. Contractile and fatigue properties of thyrotoxic rat skeletal muscle. *Muscle Nerve*. 1984;7(6):470-77.

Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol*. 2003;65:45-79.

Gambke B, Lyons GE, Haselgrove J, Kelly AM, Rubinstein NA. Thyroidal and neural control of myosin transitions during development of rat fast and slow muscles. *FEBS Lett*. 1983;156(2):335-39.

Garlick PJ, Burns HJ, Palmer RM. Regulation of muscle protein turnover: possible implications for modifying the responses to trauma and nutrient intake. *Bailliere's Clin Gastroenterol*. 1988;2(4):915-40.

Gillis JM. The mdx mouse: why diaphragm? *Muscle Nerve*. 1996;19(9):1230.

Granzier HL, Labeit S. The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ Res*. 2004;94(3):284-95.

Grove BK, Cerny L, Perriard JC, Eppenberger HM. Myomesin and M-protein: expression of two M-band proteins in pectoral muscle and heart during development. *J Cell Biol*. 1985;101(4):1413-21.

Grove BK, Cerny L, Perriard JC, Eppenberger HM, Thornell LE. Fiber type-specific distribution of M-band proteins in chicken muscle. *J Histochem Cytochem*. 1989;37(4):447-54.

Grove BK, Kurer V, Lehner C, Doetschman TC, Perriard JC, Eppenberger HM. A new 185,000-dalton skeletal muscle protein detected by monoclonal antibodies. *J Cell Biol*. 1984;98(2):518-24.

Gunning P, Hardeman E. Multiple mechanisms regulate muscle fiber diversity. *Faseb J*. 1991;5(15):3064-70.

Haddad F, Arnold C, Zeng M, Baldwin K. Interaction of thyroid state and denervation on skeletal myosin heavy chain expression. *Muscle Nerve*. 1997;20(12):1487-96.

Haddad F, Qin AX, McCue SA, Baldwin KM. Thyroid receptor plasticity in striated muscle types: effects of altered thyroid state. *Am J Physiol*. 1998;274(6 Pt 1):E1018-26.

Hausman GJ, Watson R. Regulation of fetal muscle development by thyroxine. *Acta Anat (Basel)*. 1994;149(1):21-30.

Hein S, Scheffold T, Schaper J. Ischemia induces early changes to cytoskeletal and contractile proteins in diseased human myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1995;110(1):89-98.

Hennemann G, Docter R, Friesema EC, de Jong M, Krenning EP, Visser TJ. Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. *Endocr Rev*. 2001;22(4):451-76.

Hodin RA, Lazar MA, Chin WW. Differential and tissue-specific regulation of the multiple rat c-erbA messenger RNA species by thyroid hormone. *J Clin Invest*. 1990;85(1):101-05.

Hodin RA, Lazar MA, Wintman BI, Darling DS, Koenig RJ, Larsen PR, et al. Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science*. 1989;244(4900):76-79.

Holmes KC, Geeves MA. The structural basis of muscle contraction. *Philos Trans R Soc Lond*. 2000;355(1396):419-31.

Hudecova S, Vadaszova A, Soukup T, Krizanova O. Effect of thyroid hormones on the gene expression of calcium transport systems in rat muscles. *Life Sci*. 2004;75(8):923-31.

Hughes SM, Taylor JM, Tapscott SJ, Gurley CM, Carter WJ, Peterson CA. Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. *Development*. 1993;118(4):1137-47.

Huxley AF, Niedergerke R. Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature*. 1954;173(4412):971-73.

Huxley H, Hanson J. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature*. 1954;173(4412):973-76.

Ianuzzo CD, Hamilton N, Li B. Competitive control of myosin expression: hypertrophy vs. hyperthyroidism. *J Appl Physiol*. 1991;70(5):2328-30.

Izumo S, Mahdavi V. Thyroid hormone receptor alpha isoforms generated by alternative splicing differentially activate myosin HC gene transcription. *Nature*. 1988;334(6182):539-42.

Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. All members of the MHC multigene family respond to thyroid hormone in a highly tissue-specific manner. *Science*. 1986;231(4738):597-600.

Johansson C, Lunde PK, Gothe S, Lannergren J, Westerblad H. Isometric force and endurance in skeletal muscle of mice devoid of all known thyroid hormone receptors. *J Physiol*. 2003;547(Pt 3):789-96.

Kahaly GJ, Dillmann WH. Thyroid hormone action in the heart. *Endocr Rev*. 2005;26(5):704-28.

Katz A, Bogardus C. Insulin-mediated increase in glucose 1,6-bisphosphate is attenuated in skeletal muscle of insulin-resistant man. *Metab Clin Exp*. 1990;39(12):1300-04.

Katz MG, Cohen AJ, Schwalb H, Segal J, Merin G, Schachner A. Interaction of thyroid hormone and heparin in postischemic myocardial recovery. *Ann Thorac Surg*. 1995;60(5):1215-18.

Kavok NS, Krasilnikova OA, Babenko NA. Thyroxine signal transduction in liver cells involves phospholipase C and phospholipase D activation. Genomic independent action of thyroid hormone. *BMC Cell Biol*. 2001;2:5.

Keller A, Demeurie J, Merkulova T, Geraud G, Cywiner-Golenzer C, Lucas M, et al. Fibre-type distribution and subcellular localisation of alpha and beta enolase in mouse striated muscle. *Biol Cell*. 2000;92(7):527-35.

Kiss E, Brittsan AG, Edes I, Grupp IL, Grupp G, Kranias EG. Thyroid hormone-induced alterations in phospholamban-deficient mouse hearts. *Circ Res*. 1998;83(6):608-13.

Klein I, Danzi S. Thyroid disease and the heart. *Circulation*. 2007;116(15):1725-35.

Klein I, Hong C. Effects of thyroid hormone on cardiac size and myosin content of the heterotopically transplanted rat heart. *J Clin Invest*. 1986;77(5):1694-98.

Klein I, Ojamaa K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N Engl J Med.* 2001;344(7):501-09.

Knoll R, Hoshijima M, Hoffman HM, Person V, Lorenzen-Schmidt I, Bang ML, et al. The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell.* 2002;111(7):943-55.

Kohrle J. The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57(13-14):1853-63.

Kohrle J. The selenoenzyme family of deiodinase isozymes controls local thyroid hormone availability. *Rev Endocr Metab Disord.* 2000;1(1-2):49-58.

Kurowski TT, Czerwinski SM. Glucocorticoid modulation of cardiac mass and protein. *Med Sci Sports Exerc.* 1990;22(3):312-15.

Labeit S, Kolmerer B. Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science.* 1995;270(5234):293-96.

Lange S, Auerbach D, McLoughlin P, Perriard E, Schafer BW, Perriard JC, et al. Subcellular targeting of metabolic enzymes to titin in heart muscle may be mediated by DRAL/FHL-2. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 24):4925-36.

Larsson L, Li X, Teresi A, Salviati G. Effects of thyroid hormone on fast- and slow-twitch skeletal muscles in young and old rats. *J Physiol.* 1994;481 (Pt 1):149-61.

Larsson L, Muller U, Li X, Schiaffino S. Thyroid hormone regulation of myosin heavy chain isoform composition in young and old rats, with special reference to IIX myosin. *Acta Physiol Scand.* 1995;153(2):109-16.

Larsson L, Yu F. Gender-related differences in the regulatory influence of thyroid hormone on the expression of myosin isoforms in young and old rats. *Acta Physiol Scand.* 1997;159(1):81-89.

Lazar MA. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr Rev.* 1993;14(2):184-93.

Lazar MA, Chin WW. Nuclear thyroid hormone receptors. *J Clin Invest.* 1990;86(6):1777-82.

Li X, Larsson L. Contractility and myosin isoform compositions of skeletal muscles and muscle cells from rats treated with thyroid hormone for 0, 4 and 8 weeks. *J Muscle Res Cell Motil.* 1997;18(3):335-44.

Linke WA, Ivemeyer M, Mundel P, Stockmeier MR, Kolmerer B. Nature of PEVK-titin elasticity in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(14):8052-57.

Liu W, Saint DA. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal Biochem.* 2002;302(1):52-59.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.).* 2001;25(4):402-08.

Lompre AM, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *J Biol Chem.* 1984;259(10):6437-46.

Lynch MA, Andrews JF, Moore RE. Administration of low doses of TSH result in a rapid increase in the metabolic rate of young lambs. *Horm Metab Res Hormon- Stoffwechselforschung.* 1985;17(3):136-40.

Macpherson PC, Schork MA, Faulkner JA. Contraction-induced injury to single fiber segments from fast and slow muscles of rats by single stretches. *Am J Physiol.* 1996;271(5 Pt 1):C1438-46.

Maggs AM, Taylor-Harris P, Peckham M, Hughes SM. Evidence for differential post-translational modifications of slow myosin heavy chain during murine skeletal muscle development. *J Muscle Res Cell Motil.* 2000;21(2):101-13.

Maruyama K, Kimura S, Ohashi K, Kuwano Y. Connectin, an elastic protein of muscle. Identification of "titin" with connectin. *J Biochem.* 1981;89(3):701-09.

Masaki T, Takaiti O. M-protein. *J Biochem (Tokyo).* 1974;75(2):367-80.

Mintz G, Pizzarello R, Klein I. Enhanced left ventricular diastolic function in hyperthyroidism: noninvasive assessment and response to treatment. *The J Clin Endocrinol Metabol.* 1991;73(1):146-50.

Miyabara EH, Aoki MS, Soares AG, Saltao RM, Vilicev CM, Passarelli M, et al. Thyroid hormone receptor-beta-selective agonist GC-24 spares skeletal muscle type I to II fiber shift. *Cell Tissue Res.* 2005;321(2):233-41.

Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell.* 1998;93(2):215-28.

Morkin E. Control of cardiac myosin heavy chain gene expression. *Microsc Res Tech.* 2000;50(6):522-31.

Muller A, Zuidwijk MJ, Simonides WS, van Hardeveld C. Modulation of SERCA2 expression by thyroid hormone and norepinephrine in cardiocytes: role of contractility. *Am J Physiol.* 1997;272(4 Pt 2):H1876-85.

Muller MJ, Seitz HJ. Thyroid hormone action on intermediary metabolism. Part III. Protein metabolism in hyper- and hypothyroidism. *Klin Wochenschr.* 1984;62(3):97-102.

Muscat GE, Downes M, Dowhan DH. Regulation of vertebrate muscle differentiation by thyroid hormone: the role of the myoD gene family. *Bioessays.* 1995;17(3):211-18.

Nave R, Furst DO, Weber K. Visualization of the polarity of isolated titin molecules: a single globular head on a long thin rod as the M band anchoring domain? *J Cell Biol.* 1989;109(5):2177-87.

O'Shea PJ, Williams GR. Insight into the physiological actions of thyroid hormone receptors from genetically modified mice. *J Endocrinol.* 2002;175(3):553-70.

Obermann WM, Gautel M, Steiner F, van der Ven PF, Weber K, Furst DO. The structure of the sarcomeric M band: localization of defined domains of myomesin, M-protein, and the 250-kD carboxy-terminal region of titin by immunoelectron microscopy. *J Cell Biol.* 1996;134(6):1441-53.

Ogilvie RW, Armstrong RB, Baird KE, Bottoms CL. Lesions in the rat soleus muscle following eccentrically biased exercise. *Am J Anat.* 1988;182(4):335-46.

Oppenheimer JH, Schwartz HL, Mariash CN, Kinlaw WB, Wong NC, Freaque HC. Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level. *Endocr Rev.* 1987;8(3):288-308.

Otey CA, Carpen O. Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2004;58:104–11

Pask HT, Jones KL, Luther PK, Squire JM. M-band structure, M-bridge interactions and contraction speed in vertebrate cardiac muscles. *J Muscle Res Cell Motil*. 1994;15(6):633-45.

Phillips GN, Jr., Fillers JP, Cohen C. Tropomyosin crystal structure and muscle regulation. *J Mol Biol*. 1986;192(1):111-31.

Pircher P, Chomez P, Yu F, Vennstrom B, Larsson L. Aberrant expression of myosin isoforms in skeletal muscles from mice lacking the rev-erbAalpha orphan receptor gene. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288(2):R482-90.

Plateroti M, Gauthier K, Domon-Dell C, Freund JN, Samarut J, Chassande O. Functional interference between thyroid hormone receptor alpha (TRalpha) and natural truncated TRDeltaalpha isoforms in the control of intestine development. *Mol Cell Biol*. 2001;21(14):4761-72.

Polikar R, Burger AG, Scherrer U, Nicod P. The thyroid and the heart. *Circulation*. 1993;87(5):1435-41.

Portman MA. Thyroid hormone regulation of heart metabolism. *Thyroid*. 2008;18(2):217-25.

Pyle WG, Solaro RJ. At the crossroads of myocardial signaling: the role of Z-discs in intracellular signaling and cardiac function. *Circ Res*. 2004;94(3):296-305.

Ribeiro RC, Apriletti JW, Wagner RL, West BL, Feng W, Huber R, et al. Mechanisms of thyroid hormone action: insights from X-ray crystallographic and functional studies. *Recent Prog Horm Res*. 1998;53:351-92; discussion 392-54.

Robson RM, Goll DE, Arakawa N, Stromer MH. Purification and properties of alpha-actinin from rabbit skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta*. 1970;200:296–318

Rohrer D, Dillmann WH. Thyroid hormone markedly increases the mRNA coding for sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in the rat heart. *J Biol Chem*. 1988;263(15):6941-44.

Rooyackers OE, Nair KS. Hormonal regulation of human muscle protein metabolism. *Annu Rev Nutr*. 1997;17:457-85.

Schiaffino S, Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev*. 1996;76(2):371-423.

Schmidt BM, Martin N, Georgens AC, Tillmann HC, Feuring M, Christ M, et al. Nongenomic cardiovascular effects of triiodothyronine in euthyroid male volunteers. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(4):1681-86.

Silvestri E, Burrone L, de Lange P, Lombardi A, Farina P, Chambery A, et al. Thyroid-state influence on protein-expression profile of rat skeletal muscle. *J Proteome Res*. 2007;6(8):3187-96.

Simonides WS, van Hardeveld C. Thyroid hormone as a determinant of metabolic and contractile phenotype of skeletal muscle. *Thyroid*. 2008;18(2):205-16.

Solaro RJ. Remote control of A-band cardiac thin filaments by the I-Z-I protein network of cardiac sarcomeres. *Trends Cardiovasc Med*. 2005;15(4):148-52.

Stockholm D, Herasse M, Marchand S, Praud C, Roudaut C, Richard I, et al. Calpain 3 mRNA expression in mice after denervation and during muscle regeneration. *Am J Physiol*. 2001;280(6):C1561-69.

Stolz M, Kraft T, Wallimann T. The isoenzyme-diagnostic regions of muscle-type creatine kinase, the M-260 and M-300 box, are not responsible for its binding to the myofibrillar M-band. *Eur J Cell Biol*. 1998;77(1):1-9.

Stromer MH, Goll DE. Studies on purified α -actinin II. Electron microscopic studies on the competitive binding of α -actinin and tropomyosin to Z-line extracted myofibrils. *J Mol Biol*. 1972;67:489-94.

Sugden PH, Clerk A. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med*. 1998;76(11):725-46.

Syslak PH, Nathaniel EJ, Novak C, Burton L. Fetal alcohol effects on the postnatal development of the rat myocardium: an ultrastructural and morphometric analysis. *Exp Mol Pathol*. 1994;60(3):158-72.

Takeuchi K, Minakawa M, Otaki M, Odagiri S, Itoh K, Murakami A, et al. Hyperthyroidism causes mechanical insufficiency of myocardium with possibly increased SR Ca²⁺-ATPase activity. *Jpn J Physiol*. 2003;53(6):411-16.

Trinick J, Knight P, Whiting A. Purification and properties of native titin. *J Mol Biol*. 1984;180(2):331-56.

Trost SU, Swanson E, Gloss B, Wang-Iverson DB, Zhang H, Volodarsky T, et al. The thyroid hormone receptor-beta-selective agonist GC-1 differentially affects plasma lipids and cardiac activity. *Endocrinology*. 2000;141(9):3057-64.

Vadaszova A, Zacharova G, Machacova K, Jirmanova I, Soukup T. Influence of thyroid status on the differentiation of slow and fast muscle phenotypes. *Physiol Res*. 2004;53 Suppl 1:S57-61.

van den Beld AW, Visser TJ, Feelders RA, Grobbee DE, Lamberts SW. Thyroid hormone concentrations, disease, physical function, and mortality in elderly men. *J Clin Endocrinol Metabolism*. 2005;90(12):6403-09.

van Doorn J, van der Heide D, Roelfsema F. Sources and quantity of 3,5,3'-triiodothyronine in several tissues of the rat. *J Clin Invest*. 1983;72(5):1778-92.

van Hardeveld C, Kassenaar AA. Thyroid hormone uptake and T4 derived T3 formation in different skeletal muscle types of normal and hyperthyroid rats. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1978;88(2):306-20.

Vinkemeier U, Obermann W, Weber K, Furst DO. The globular head domain of titin extends into the center of the sarcomeric M band. cDNA cloning, epitope mapping and immunoelectron microscopy of two titin-associated proteins. *J Cell Sci*. 1993;106 (Pt 1):319-30.

Walmsley B, Hodgson JA, Burke RE. Forces produced by medial gastrocnemius and soleus muscles during locomotion in freely moving cats. *J Neurophysiol*. 1978;41(5):1203-16.

Wang SM, Lo MC, Shang C, Kao SC, Tseng YZ. Role of M-line proteins in sarcomeric titin assembly during cardiac myofibrillogenesis. *J Cell Biochem*. 1998;71(1):82-95.

Wang X, Li F, Campbell SE, Gerdes AM. Chronic pressure overload cardiac hypertrophy and failure in guinea pigs: II. Cytoskeletal remodeling. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31(2):319-31.

White P, Dauncey MJ. Differential expression of thyroid hormone receptor isoforms is strikingly related to cardiac and skeletal muscle phenotype during postnatal development. *J Mol Endocrinol.* 1999;23(2):241-54.

Whiting A, Wardale J, Trinick J. Does titin regulate the length of muscle thick filaments? *J Mol Biol.* 1989;205(1):263-68.

Williams GR. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Mol Cell Biol.* 2000;20(22):8329-42.

Winegrad S, Wisnewsky C, Schwartz K. Effect of thyroid hormone on the accumulation of mRNA for skeletal and cardiac alpha-actin in hearts from normal and hypophysectomized rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(7):2456-60.

Wrutniak-Cabello C, Casas F, Cabello G. Thyroid hormone action in mitochondria. *J Mol Endocrinol.* 2001;26(1):67-77.

Wrutniak C, Cabello G. Influence of tri-iodothyronine or lipid administration on the response of the pituitary-thyroid axis to exposure to cold in the newborn lamb. *J Endocrinol.* 1989;121(2):361-65.

Wu Y, Koenig RJ. Gene regulation by thyroid hormone. *Trends Endocrinol Metab.* 2000;11(6):207-11.

Yaffe D, Saxel O. A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation. *Differentiation.* 1977;7(3):159-66.

Yamashita A, Maeda K, Maeda Y. Crystal structure of CapZ: structural basis for actin filament barbed end capping. *EMBO J.* 2003;22(7):1529-38.

Yang YG, Obinata T, Shimada Y. Developmental relationship of myosin binding proteins (myomesin, connectin and C-protein) to myosin in chicken somites as studied by immunofluorescence microscopy. *Cell Struct Funct.* 2000;25(3):177-85.

Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev.* 2001;81(3):1097-42.

Yen PM, Ando S, Feng X, Liu Y, Maruvada P, Xia X. Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;246(1-2):121-27.

Yu F, Degens H, Li X, Larsson L. Gender- and age-related differences in the regulatory influence of thyroid hormone on the contractility and myosin composition of single rat soleus muscle fibres. *Pflugers Arch.* 1998;437(1):21-30.

Yu F, Gothe S, Wikstrom L, Forrest D, Vennstrom B, Larsson L. Effects of thyroid hormone receptor gene disruption on myosin isoform expression in mouse skeletal muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;278(6):R1545-54.

Zarain-Herzberg A, Marques J, Sukovich D, Periasamy M. Thyroid hormone receptor modulates the expression of the rabbit cardiac sarco (endo) plasmic reticulum Ca(2+)-ATPase gene. *J Biol Chem.* 1994;269(2):1460-67.

Zhang CY, Kim S, Harney JW, Larsen PR. Further characterization of thyroid hormone response elements in the human type 1 iodothyronine deiodinase gene. *Endocrinology.* 1998;139(3):1156-63.

Zurcher RM, Horber FF, Grunig BE, Frey FJ. Effect of thyroid dysfunction on thigh muscle efficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989;69(5):1082-86.

Aos meus pais, os mais sinceros
agradecimentos pela ajuda, apoio, dedicação
e por sempre acreditarem em mim. Ao meu
namorado, Fábio, muito obrigada pela
paciência e apoio.

Amo muito todos vocês!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao professor Dr. Anselmo Sigari Moriscot, pela paciência, dedicação e pelas lições que levarei por toda a vida.

Aos meus amigos e companheiros do Laboratório: Antônio, pela ajuda nos experimentos iniciais dessa dissertação. Marcelo Christoffolete, por toda a ajuda não só nos experimentos, mas pelas conversas e amizade. Vanessa e Marina pelo apoio e amizade de sempre. Marcela, pelas dicas, pela amizade e por todos os ensinamentos. Talita, minha primeira e única aluna de iniciação, a qual serviu para muito aprendizado também. Igor, Marcelo Leal, Monique, Elen, Saldanha e aos que já se foram Uchida, Camila, Hércio, Raphael, Paula e Carol pelo ótimo convívio e pelos valiosos auxílios.

Ao professor Dr. Jean Claude-Perriard e à Dra Irina Agarkova, por nos ceder os anticorpos utilizados nesse trabalho e pelas preciosas ajudas.

Às professoras Maria Luíza Barreto-Chaves e Dânia Hamassaki-Britto pelos preciosos auxílios e colaboração em trabalhos.

Às professoras Chao Yun Irene Yan e Marinilce Fagundes dos Santos, pelas valiosas sugestões e ajudas.

Aos técnicos Cleusa e Leandro pela imensa contribuição para meu aprendizado nas técnicas histológicas.

Às professoras Patrícia Gama, Maria Tereza Nunes e Patrícia Brum pela importante avaliação do meu trabalho no exame de qualificação.

Às minhas queridas amigas que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado ao longo do doutorado: Luciane Capelo, Roberta Cravo, Luciana Harumi, agradeço-as não só pelo apoio, mas pela amizade que levarei por toda minha vida.

Às amigas Maria Alicia e Gabriela, por toda ajuda nos experimentos, mas também pelas conversas e amizade.

À minha mais recente amiga, mas não menos importante, Renata Pellegrino, por toda a força no final dessa dissertação, apoio e amizade sincera.

A todos os docentes, alunos e funcionários do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento que sempre foram amistosos e solícitos.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo essencial apoio financeiro para execução deste trabalho.

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

Dalai Lama

RESUMO

Kato PN. A influência do hormônio tireoideano nas proteínas estruturais da banda M no coração e no músculo esquelético de ratos [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

O hormônio tireoideano (T3) exerce uma série de efeitos nos sistemas cardiovascular e muscular. No coração, o excesso de T3 leva a um aumento do cronotropismo e inotropismo, enquanto que, no músculo esquelético, o T3 promove alterações nas propriedades contráteis, podendo levar à fadiga. É bem estabelecido o efeito do T3 em diversos genes musculares, no entanto, pouco se sabe sobre seus efeitos na expressão das proteínas estruturais sarcoméricas, principalmente no que se refere à banda M, uma das primeiras estruturas afetadas frente ao significativo desarranjo da estrutura cardíaca promovida após longa exposição ao T3. No presente estudo, foi demonstrado que o T3 alterou a expressão de importantes proteínas estruturais da banda M (miomesina, EH-miomesina e proteína M). No coração, o tratamento com T3 reprimiu especificamente a expressão da proteína M, uma vez que as demais proteínas da banda M não foram afetadas, além disso, T3 também foi capaz de regular negativamente o promotor da proteína M. A regulação negativa da proteína M pelo T3 é rápida e precede a hipertrofia cardíaca causada pelo excesso de T3, dessa forma, tal regulação pode ser a causa do forte desarranjo miofibrilar no tratamento prolongado com T3. No músculo esquelético, T3 aumentou a expressão protéica de EH-miomesina no músculo sóleo (predominantemente fibras do tipo I – contração lenta), em contrapartida, diminuiu a expressão de proteína M no músculo extensor digital longo (EDL – predominantemente fibras do tipo II – contração rápida). Tal regulação, sugere um mecanismo adaptativo dos músculos, frente à demanda funcional imposta pelo T3.

Palavras-chave: Hormônio Tireoideano. Coração. Músculo esquelético. Sarcômero. Banda M. Miomesina. EH-miomesina. Proteína M.

ABSTRACT

Kato PN. The influence of thyroid hormone on M band structural proteins in the heart and skeletal muscle of rats [Doctor Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Thyroid hormone (T3) has broad effects in cardiovascular and muscle systems. In the heart, T3 can increase chronotropism and inotropism, whereas in the skeletal muscle, T3 can lead to alterations in the contractile properties, which can generate fatigue. Nowadays, it is well established the T3 effects on some muscle genes, although the extent list of muscle genes regulated by T3, little is known about T3 effects on structural sarcomeric proteins, mainly in the M band, which is the first structure to disarray in the rats heart treated for a long time with T3. In the present study, it was demonstrated that T3 regulated the M band structural proteins (myomesin, EH-myomesin and M protein). In the heart, T3 treatment down regulated M protein expression in a specific manner, since other M band proteins were not affected, and T3 also down regulated M protein promoter. This regulation by T3 is fast and it precedes the hypertrophy imposed by T3, which could be the cause of the strong myofibrillar disarray driven by T3 treatment. In the skeletal muscle, T3 up regulated the EH-myomesin protein expression in the soleus muscle (predominantly type I fiber – slow contraction) and, in parallel, T3 down regulated M protein expression in extensor digitorum longus muscle (EDL – predominantly type II fiber – fast contraction). This differential regulation by T3 suggests a muscle adaptive mechanism for the increased demand imposed by T3.

Key-words: Thyroid Hormone. Heart. Skeletal muscle. Sarcomere. M band. Myomesin. EH-myomesin. M protein.

LISTA DE ABREVIações

EDL: extensor digital longo

HT: hormônio tireoideano

MHC: miosina de cadeia pesada

PCR: reação de polimerase em cadeia

RNA_m: ácido ribonucleico mensageiro

RT: transcrição reversa

RXR: receptor de ácido retinóico

SERCA2: ATPase Ca^{+2} ativada do retículo sarcoplasmático

T3: 3,5,3'-triiodotironina

T4: tiroxina

TR: receptor de hormônio tireoideano

TRE: elemento responsivo ao hormônio tireoideano

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema simplificado de um sarcômero.....	19
Figura 2. Esquema representando a ação genômica do T3 na célula	26
Figura 3. Expressão gênica de miomesina e EH-miomesina no coração de ratos induzidos ao hipertireoidismo e hipotireoidismo experimental	49
Figura 4. Imunomarcagem para miomesina e EH-miomesina nos ventrículos esquerdos de ratos controle e tratados com T3 por 8 dias	49
Figura 5. (A) Expressão gênica de proteína M no coração de ratos induzidos ao hipertireoidismo e hipotireoidismo experimental. (B) Expressão gênica de proteína M em coração de ratos tratados com diferentes doses de T3 por 48hs.	50
Figura 6. Imunomarcagem para proteína M nos ventrículos esquerdos de ratos controle e tratado com T3 por 8 dias.....	51
Figura 7. Expressão gênica de proteína M em cultura primária de cardiomiócitos.....	51
Figura 8. Regulação da atividade promotora da proteína M pelo T3 através do TR α e TR β	52
Figura 9. Atividade transcricional do controle positivo D1, pGL3 sem promotor, promotor da proteína M mínimo e com 2300pb.....	54
Figura 10. Atividade transcricional do controle positivo D1, promotor da proteína M mínimo, promotor da proteína M sem a porção 5' do exon 1 (-158 a +1), promotor da proteína M somente com a porção +1 a +228	56
Figura 11. Expressão gênica de miomesina (A) e EH-miomesina (B) no músculo sóleo de ratos controles e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias.....	57
Figura 12. Imunomarcagem de MHCI, MHCII e Miomesina no músculo sóleo de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias.....	59
Figura 13. Imunomarcagem de MHCI, MHCII e EH-miomesina no músculo sóleo de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias.....	60
Figura 14. Expressão protéica de miomesina no músculo sóleo de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias	61

Figura 15. Expressão protéica de EH-miomesina no músculo sóleo de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias	62
Figura 16. Expressão gênica de miomesina (A) e Proteína M (B) no músculo EDL de ratos controles e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias	63
Figura 17. Imunomarcacão de MHCI, MHCII e Miomesina no músculo EDL de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias	64
Figura 18. Imunomarcacão de MHCI, MHCII e proteína M no músculo EDL de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias	65
Figura 19. Expressão protéica de Miomesina no músculo EDL de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias	66
Figura 20. Expressão protéica de proteína M no músculo EDL de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR em Tempo Real.....	40
Tabela 2. Peso do coração, peso corpóreo e razão peso coração/peso corpóreo	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Considerações Gerais.....	18
1.2 Tecido Muscular	18
1.3 Aspectos Gerais dos Hormônios Tireoideanos.....	23
1.4 O Hormônio Tireoideano e o Tecido Cardíaco	27
1.5 O Hormônio Tireoideano e o Músculo Esquelético.....	30
2 OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo Geral	35
2.2 Objetivos específicos.....	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 Experimentos <i>in vivo</i>.....	37
3.1.1 Animais	37
3.1.2 Protocolos Experimentais	38
3.1.2.1 Indução ao Hipertireoidismo	38
3.1.2.2 Indução ao Hipotireoidismo	38
3.1.3 Análise da Massa Cardíaca	38
3.1.4 Análise de expressão gênica	39
3.1.4.1 Extração de RNA	39
3.1.4.2 Transcrição Reversa	39
3.1.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real	39
3.1.5 Análise de Imunomarcacão	41
3.1.6 Análise de Expressão Protéica	42
3.1.6.1 Extração da proteína total dos músculos Sóleo e EDL tratados com T3.....	42
3.1.6.2 Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e Imunomarcacão	42
3.2 Experimentos <i>in vitro</i>.....	43
3.2.1 Obtenção de cultura primárias de cardiomiócitos	43
3.2.2 Tratamento dos Cardiomiócitos	44
3.2.3 Análise da expressão gênica	44
3.3 Experimentos de Transfecção Transiente	45

3.3.1 Cultivo das Células C2C12.....	45
3.3.2 Transfecção das Células C2C12	45
3.3.3 Tratamento das células C2C12	45
3.3.4 Atividade das Luciferases	46
3.4 Análises Estatísticas.....	46
4 RESULTADOS.....	47
4.1 Efeito do T3 na relação peso coração/peso corpóreo	48
4.2 Ação do T3 nas proteínas estruturais da banda M no coração.....	48
4.2.1 Miomesina e EH-miomesina	48
4.3 Ação do T3 nas proteínas estruturais da banda M nos músculos Sóleo e EDL	57
4.3.1 Miomesina e EH-miomesina no músculo Sóleo	57
4.3.2 Miomesina e proteína M no músculo EDL.....	62
5 DISCUSSÃO	68
5.1 Influência do T3 na expressão de proteínas estruturais da banda M no coração de ratos	69
5.2 Influência do T3 na expressão de proteínas estruturais da banda M no músculo esquelético de ratos.....	73
6 CONCLUSÃO	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

1 INTRODUÇÃO

:

1.1 Considerações Gerais

A importância da função do hormônio tireoideano (HT) na diferenciação, crescimento e metabolismo tem sido bem documentada. Sabe-se que, nos mamíferos, os HTs atuam em todos os órgãos e vias metabólicas e seus principais efeitos incluem o desenvolvimento de vários tecidos, consumo de oxigênio, regulação da temperatura corpórea, frequência cardíaca e também o metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras. Além disso, o HT tem papel fundamental na síntese e degradação de muitos outros fatores de crescimento e hormônios, o que resulta em efeitos secundários nos tecidos e órgãos (Oppenheimer et al., 1987; Yen, 2001).

Nos músculos estriados, o hormônio tireoideano exerce profundos efeitos diretos e indiretos. Como exemplo dos efeitos diretos, o HT provoca alterações na expressão de diversos genes que leva a modificações contráteis/mecânicas e mudanças na atividade metabólica dos músculos (Caiozzo e Haddad, 1996; Portman, 2008; Simonides e van Hardeveld, 2008). No entanto, apesar dos diversos estudos envolvendo o hormônio tireoideano, pouco se sabe sobre sua influência na estrutura de órgãos vitais como o coração.

1.2 O tecido muscular

O tecido muscular é composto por diferentes células, contendo proteínas contráteis. Portanto, as células musculares estão envolvidas numa função especializada – a contração. Há três tipos distintos de tecidos musculares em vertebrados, os quais são diferenciados por suas características morfológicas e funcionais, e cada tipo de tecido possui uma estrutura adaptada para seu papel fisiológico. O músculo cardíaco e esquelético são as formas de músculo estriado, as quais são formadas pela fusão de longas células. Nas células musculares estão presentes estruturas cilíndricas conhecidas como miofibrilas, onde se encontram os elementos contráteis da célula muscular, os sarcômeros (Figura 1). O sarcômero dos mamíferos possui aproximadamente 2 μm de comprimento e podem encurtar até ~70% de seu comprimento original durante

a contração. O sarcômero é constituído por diversas estruturas que incluem os filamentos transversos finos e grossos, a linha Z e a banda M longitudinais. A região do sarcômero contendo a linha Z e os filamentos finos é a banda I, enquanto a área restante é a banda A. A banda A abrange a área onde os filamentos finos e grossos se interdigitam, uma área dos filamentos grossos apenas e da banda M (Huxley e Niedergerke, 1954; Huxley e Hanson, 1954). Os filamentos finos são compostos primariamente pela actina e o principal constituinte dos filamentos grossos é a miosina. A contração muscular é um ciclo de vários passos envolvendo a cabeça globular da miosina, actina e hidrólise de ATP (Holmes e Geeves, 2000).

Figura 1. Esquema simplificado de um sarcômero (Au, 2004). Os filamentos grossos, finos, linha Z e banda M estão indicadas em azul, vermelho, caixa amarela e verde, respectivamente.

A actina é uma proteína citoesquelética ubíqua que funciona em diversos processos celulares. Há três isoformas de actina (α , β e γ) – a α -actina é encontrada no tecido muscular, enquanto outros tipos celulares expressam β - e γ -actina, como parte do citoesqueleto (dos Remedios et al., 2003). A CapZ localiza-se na linha Z sarcomérica, onde sua principal função inclui centralizar a montagem de actina. Ela se liga às extremidades de filamentos de actina pré-existent para regular a adição ou perda dos monômeros de actina

(Yamashita et al., 2003). A CapZ também pode interagir com a α -actinina 2. A α -actinina é o componente mais abundante do disco Z (Robson et al., 1970). A família α -actinina, possui quatro membros, as quais as α -actininas 1 e 4 são expressas em tecidos não musculares, onde estão envolvidas na organização do citoesqueleto (Otey e Carpen, 2004). As α -actininas 2 e 3 são as isoformas específicas dos músculos estriados, onde alinham e realizam ligação cruzada com a actina, além de organizar sua orientação polarizada (Stromer e Goll, 1972). A tropomiosina, localizada nos filamentos finos, age como um ponto de ancoragem para a troponina (Phillips et al., 1986). O complexo troponina liga-se aos íons de cálcio para a contração muscular, via controle da disponibilidade de sítios de ligação de miosina nos filamentos de actina. No estado de repouso, a contração muscular é inibida pela tropomiosina/troponina. O aumento de Ca^{+2} citosólico satura a proteína de ligação ao cálcio, a troponina C, revelando um fragmento hidrofóbico que permite a interação com a troponina I. Isso leva a mudanças conformacionais no complexo troponina que subsequentemente desloca a tropomiosina, permitindo a interação da actina com a miosina. A troponina T ancora o complexo troponina nos filamentos finos através da ligação com a tropomiosina (Holmes e Geeves, 2000).

A miosina é o principal componente dos filamentos grossos. Componentes adicionais nos vertebrados incluem MyBP-C e MyBP-H (também conhecidas como proteína C e proteína H, respectivamente). As cabeças de miosina nos filamentos grossos possuem uma polaridade que as orienta numa direção, que é reversa à banda M (Au, 2004). A molécula de miosina completa é um complexo de seis cadeias polipeptídicas consistindo de duas cadeias pesadas e dois pares de diferentes cadeias leves. O amino-terminal (N-terminal) das formas de cadeia pesada forma uma cabeça globular conhecida como domínio motor, enquanto o carboxi-terminal (C-terminal) forma uma cauda fibrosa α -helical (Au, 2004). O comprimento dos filamentos grossos é regulado pela titina. A titina (também conhecida com conectina) é uma proteína filamentosa elástica gigante de aproximadamente 3 mega Daltons e é a terceira proteína mais abundante nos músculos estriados de vertebrados (Maruyama et al., 1981). A titina estende por metade do sarcômero, com o N-terminal ligado à

linha Z e o C-terminal localizado na banda M, orientando a molécula de titina. A principal função dessa molécula é a manutenção do alinhamento sarcomérico durante a contração muscular (Maruyama et al., 1981; Trinick et al., 1984), geração de tensão passiva (Granzier e Labeit, 2004) e é considerada uma régua molecular capaz de regular a formação e comprimento dos filamentos grossos (Whiting et al., 1989), sendo, portanto, essencial para o esqueleto sarcomérico.

Proteínas da banda M são responsáveis pela ancoragem dos filamentos de miosina (Bahler et al., 1985) e da titina (Nave et al., 1989). Tem sido sugerido que a banda M apresenta um importante papel organizacional durante a miofibrillogênese, quando os filamentos grossos nascentes têm de montar e estar alinhados numa treliça regular hexagonal (Ehler et al., 1999; Wang et al., 1998; Yang et al., 2000).

Cinco proteínas foram identificadas na banda M de vertebrados, incluindo a porção C-terminal da titina (Labeit e Kolmerer, 1995), miomesina (Grove et al., 1984), EH-miomesina (Agarkova et al., 2000), proteína M (Masaki e Takaiti, 1974) e a isoforma muscular da creatina quinase (MM-CK) (Eppenberger et al., 1967). Miomesina, EH-miomesina e proteína M ligam-se à zona central dos filamentos de miosina (Bahler et al., 1985) e à porção C-terminal da titina (Nave et al., 1989), indicando suas participações no citoesqueleto sarcomérico.

A miomesina e a proteína M, proteínas intimamente relacionadas, pertencem à família das proteínas imunoglobulinas, a qual os membros consistem de um domínio N-terminal único seguido de domínios de sequência conservada semelhantes à imunoglobulina (Ig) e fibronectina tipo III (Bantle et al., 1996; Vinkemeier et al., 1993). Apesar dessa forte similaridade, essas duas proteínas exibem diferentes padrões de expressão. Enquanto a miomesina é encontrada em todos os tipos de músculos estriados, a proteína M está ausente no coração embrionário e no músculo de contração lenta adulto (Carlsson et al., 1990; Grove et al., 1989). Além disso, a miomesina está localizada na banda M já nos primeiros sarcômeros do coração embrionário

(Ehler et al., 1999) e pode ser detectada no músculo estriado de todos os vertebrados (Agarkova et al., 2000). Isso sugere que a miomesina é um componente sarcomérico essencial, controlando a montagem e manutenção da estrutura da banda A (Pask et al., 1994). A proteína M mostra um pico de expressão tardio no desenvolvimento embrionário em todas as fibras musculares, então é depois reprimida, e finalmente re-expressa somente nas fibras de contração rápida esquelética e fibras musculares cardíacas no adulto (Carlsson et al., 1990; Grove et al., 1985). Assim, a expressão bifásica e fibra específica da proteína M podem requerer mecanismos de controle em adição a um simples mecanismo de ativação músculo-específico que é necessário para a miomesina.

A inserção de um fragmento adicional entre os domínios 6 e 7 da miomesina convencional leva à isoforma EH-miomesina, que pode ser encontrada no coração embrionário de todos os vertebrados superiores (Agarkova et al., 2000). Portanto, a EH-miomesina pode servir como um marcador de coração embrionário de vertebrados, porque a expressão de nenhuma outra proteína miofibrilar é restrita ao coração numa maneira tão firmemente controlada (Schiaffino e Reggiani, 1996).

Além da expressão no coração, as proteínas estruturais da banda M também são expressas no músculo esquelético, em diferentes tipos de fibra. O músculo esquelético de vertebrados é plástico, devido à diversificada proporção de tipos de fibra de músculo para músculo refletindo a sua fisiologia e uso. Há múltiplas isoformas de proteínas contráteis que contribuem para tal plasticidade, sendo a família das cadeias pesadas de miosina (MHC, *myosin heavy chain*) as mais conhecidas. As principais isoformas de MHC são MHC I, IIa, IIx e IIb, ordenadas pelo aumento de taxa catalítica, sendo a MHC IIb cinco vezes mais veloz que a MHC I. Consequentemente, fibras de contração lenta expressam MHC I e são classificadas como tipo 1, enquanto os tipos IIA, IIX e IIB são fibras de contração mais rápida, as quais expressam MHC IIa, IIx e IIb, respectivamente (Gunning e Hardeman, 1991; Simonides e van Hardeveld, 2008).

As proteínas da banda M apresentam diferentes padrões de expressão nas fibras musculares. Além da expressão específica no coração, a EH-miomesina é fortemente expressa nas fibras tipo I do músculo esquelético e em uma parte das fibras IIa, mas está ausente nas demais fibras dos membros inferiores de camundongos adultos. A expressão de EH-miomesina começa nas fibras de contração lenta dos músculos da pata do camundongo somente alguns dias após o nascimento, isto é, quando seu acúmulo cessa no músculo cardíaco. Todas as fibras musculares nos membros posteriores de camundongos neonatais possuem a mesma composição de banda M, expressando quase a mesma quantidade de proteína M e sendo negativas para EH-miomesina. Esse também é o caso de numerosas fibras que expressam MHC I nesse momento (Maggs et al., 2000). No entanto, todas as fibras tipo I nos camundongos adultos são positivas para EH-miomesina. O aumento pós-natal da expressão de EH-miomesina é acompanhado por uma repressão de proteína M nas mesmas fibras (Agarkova et al., 2004). Como resultado, EH-miomesina e proteína M demonstram um padrão de expressão complementar no músculo esquelético de camundongos adultos.

Diversos fatores mecânicos e/ou hemodinâmicos podem afetar o tecido muscular, além de vários hormônios modularem o trofismo cardíaco e o metabolismo do músculo esquelético. Desta forma, alterações nos níveis de alguns fatores hormonais como, por exemplo, glicocorticóides, noradrenalina, angiotensina, insulina e hormônios tireoideanos, atuam diretamente no tecido cardíaco e no músculo esquelético (Kahaly e Dillmann, 2005; Katz e Bogardus, 1990; Katz et al., 1995; Kurowski e Czerwinski, 1990; Rooyackers e Nair, 1997). O presente trabalho abordará a influência do hormônio tireoideano na estrutura dos músculos estriados.

1.3 Aspectos gerais dos Hormônios Tireoideanos

Doenças ligadas à tireóide estão entre as desordens endócrinas mais comuns no mundo. Estimativas recentes sugerem que a doença afeta 9% a 15% da população adulta feminina e uma menor porcentagem da população

adulta masculina (Canaris et al., 2000). Desse modo, a correta função e manutenção dos níveis dos hormônios tireoideanos (HTs) – chamados 3,5,3'-triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) – possuem significância biológica, médica e social. Como hormônios, eles desempenham diversos papéis na diferenciação, crescimento e metabolismo de diversos órgãos e tecidos (Yen, 2001). Os HTs também apresentam um papel crítico durante a embriogênese e no início da vida, e possuem profundos efeitos metabólicos na vida adulta, incluindo mudanças no metabolismo de consumo de oxigênio, proteínas, carboidratos, lipídios e vitaminas (Yen, 2001).

A forma do hormônio tireoideano secretada em maior quantidade pela glândula tireóide é a tiroxina (T4) e uma menor quantidade é secretada como triiodotironina (T3). A via principal para produção de T3 circulante é via desiodação 5' no anel externo do T4 por selenoproteínas conhecidas como selenodesiodases das iodotironinas (Kohrle, 2000). Os HTs, em sua grande maioria, circulam ligados às proteínas plasmáticas. A entrada e a saída do hormônio nas células ocorrem principalmente através de transportadores específicos que regulam a captação e o efluxo dos hormônios tireoideanos e, em uma menor parcela, por difusão passiva (Hennemann et al., 2001, Ribeiro et al., 1998). O T3 é a principal isoforma responsável pelos efeitos genômicos do HT, uma vez que se liga aos receptores nucleares (TRs) com uma afinidade 10 vezes maior que o T4 (Kohrle, 2000).

A ação genômica clássica do T3 é mediada pela ligação a seus receptores (TRs). Os TRs são fatores de transcrição pertencentes a uma superfamília dos receptores nucleares, que incluem receptores para vitamina D (um esteróide), ácido retinóico, proliferador peroxissomal e receptores cujos ligantes não são conhecidos (Beato et al., 1995; Lazar, 1993).

Há duas isoformas de TRs, TR α e TR β , que, nos humanos, localizam-se nos cromossomos 17 e 3, respectivamente. O gene THR α codifica duas proteínas diferentes – TR α -1 e TR α -2 – que são geradas pelo processamento alternativo do RNAm TR α (*splicing* alternativo). Outras isoformas $\Delta\alpha$ 1 e $\Delta\alpha$ 2 foram identificadas como transcritos derivados de um novo promotor no intron 7

do gene de TR α (Chassande et al., 1997). Essas variantes menores não possuem o domínio de ligação ao DNA e agem como antagonistas dominantes negativas (Plateroti et al., 2001). O gene THR β codifica três isoformas principais – TR β -1, TR β -2 e TR β -3 – que são codificadas a transcritos gerados por seleção alternativa de promotores (Hodin et al., 1989; Lazar, 1993). Somente α 1, β 1, β 2 e β 3 se ligam ao hormônio. A isoforma TR α 2, bem como $\Delta\alpha$ 1 e $\Delta\alpha$ 2, por não se ligarem ao T3, podem inibir a transcrição mediada por TR β 1 ou TR α 1, provavelmente por competir com a ligação aos elementos responsivos ao T3 (TRE, *thyroid response element*) e com a formação de heterodímeros com RXR (Ribeiro et al., 1998). A expressão dos RNAs dos TRs varia com o desenvolvimento e com a diferenciação celular (Lazar, 1993). Os RNAs do TR α 1, TR α 2 e TR β 1 são expressos em quase todos os tecidos, ainda que em níveis diferentes. Desse modo, o TR α 1 é abundante nos músculos esqueléticos, tecido adiposo marrom e no coração, o TR α 2 é particularmente abundante no cérebro e o TR β 1 é expresso em grande quantidade no fígado, rim e cérebro (Lazar, 1993). Já o TR β 2 é expresso principalmente na glândula pituitária e em outras áreas do cérebro (Hodin et al., 1989, Lazar, 1993). Em ratos, o TR β 3 é expresso no fígado, rim e pulmão (Williams, 2000). Essa expressão variada dos TRs constitui um mecanismo específico para a regulação local da transcrição gênica induzida pelo T3 (Hodin et al., 1990; Yen et al., 2006).

Os TRs atuam como fatores de transcrição regulados pelo ligante porque podem interagir com o T3 (ligante) bem como aos TREs que tipicamente estão localizados nos promotores dos genes alvo (Yen et al., 2006). Os TRs se ligam aos TREs como monômeros, homodímeros ou heterodímeros. Os heterodímeros são comumente formados por um TR e uma das isoformas do receptor de ácido retinóico (RXR α , RXR β ou RXR γ) (Lazar e Chin, 1990). Enquanto ligado ao T3, os TRs induzem a transcrição e, na ausência de T3, eles reprimem a transcrição, assim os genes alvos podem ser regulados positivamente ou negativamente pelo T3 (Wu e Koenig, 2000). Nos TREs regulados positivamente, TRs não ligados medeiam a repressão da transcrição basal da expressão de genes alvos, desse modo, a ligação com T3

estimula a indução ativa da transcrição gênica. Nos TREs regulados negativamente, apo-TRs medeiam constitutivamente a expressão gênica e a ligação com o T3 induz a repressão ativa da transcrição gênica via mecanismos que não estão precisamente determinados (Bassett et al., 2003).

Segue abaixo, modelo simplificado da ação do T3 na expressão de genes alvos:

Figura 2. Esquema representando a ação genômica do T3 na célula. Elipses verdes representam transportadores de T3 e T4 na membrana plasmática, círculo verde representa o T3, círculo vermelho representa o T4, quadrado roxo representa o TR, losango azul representa RXR e setas representam TREs.

Embora o T3 é conhecido por exercer várias de suas ações através da via clássica genômica regulando a transcrição gênica, uma série de efeitos do T3 ocorrem rapidamente e não são afetados por inibidores de transcrição e de síntese protéica (Davis et al., 1989; Davis et al., 2000; Wrutniak-Cabello et al., 2001). Ações não genômicas dos HTs tem sido descritas na membrana plasmática, no citoplasma e em organelas celulares. Tais ações incluem a modulação do transporte de Na^+ , K^+ , Ca^{+2} e glicose, ativação da proteína quinase C (PKC), proteína quinase A (PKA) e quinases reguladas por sinal extracelular, e regulação do metabolismo de fosfolípidos (Kavok et al., 2001). O T4 regula a termogênese e atividade lipolítica de catecolaminas em 30 min (Lynch et al., 1985, Wrutniak e Cabello, 1989). Ações não genômicas do T3 também tem sido descritas no miocárdio e na vasculatura, onde o T3 aumenta

o débito cardíaco e reduz a resistência vascular sistêmica num adulto normal dentro de 3 min (Schmidt et al., 2002) e estudos *in vitro* sugerem que o T3 rapidamente e não genomicamente regule a enzima Ca^{+2} ATPase e canais de Na^{+} e K^{+} (Davis P.J. e Davis F.B., 2002).

Os efeitos do T3 em variados tecidos são diversos e ressaltam o seu papel vital na função celular. Desta maneira, em adição à função do T3 no metabolismo de macronutrientes e toda energia e consumo de oxigênio, o T3 também regula importantes funções em tecidos específicos. Recentemente, a regulação transcricional de genes alvos em alguns desses tecidos tem sido estudada, principalmente no coração e no músculo esquelético (Diez et al., 2008; Fernandez et al., 2008; Klein e Danzi, 2007; Simonides e van Hardeveld, 2008).

1.4 O Hormônio Tireoideano e o tecido cardíaco

O sistema cardiovascular é um sistema extremamente sensível a alterações na concentração sistêmica e local dos HTs (Danzi e Klein, 2004; Kahaly e Dillmann, 2005; Klein e Danzi 2007). Pacientes hipertireoideos freqüentemente referem a alterações cardíacas cronotrópicas. Os principais sintomas são palpitações, bem como batimentos cardíacos irregulares e vigorosos. Tanto o hipertireoidismo quanto o hipotireodismo produzem mudanças na contratilidade cardíaca, no consumo de oxigênio miocárdial, no débito cardíaco, na pressão sanguínea e na resistência vascular sistêmica (Biondi et al., 2002; Kahaly e Dillmann, 2005).

No hipertireoidismo, a contratilidade cardíaca, débito cardíaco, freqüência cardíaca de repouso, velocidade de contração e relaxamento estão aumentados (Danzi e Klein, 2003; Polikar et al., 1993). O débito cardíaco pode estar aumentado de 50 a 300% em comparação com os indivíduos normais, como resultado de efeitos combinados do aumento de freqüência cardíaca de repouso, da contratilidade, da fração de ejeção e do volume sanguíneo com uma diminuição da resistência vascular sistêmica (Biondi et al., 2002; Klein e

Ojamaa, 2001). Uma queda da resistência vascular periférica diminui a pós-carga e aumenta a eficiência miocárdica (Bengel et al., 2003). O aumento do volume sanguíneo e do retorno venoso leva ao aumento da pré-carga cardíaca, promovendo um aumento do débito cardíaco (Biondi et al., 2002). Animais e humanos apresentam massa cardíaca aumentada em decorrência do hipertireoidismo (Biondi et al., 2002; Klein e Hong, 1986). A hipertrofia, usualmente aumento da massa ventricular esquerda, resulta de uma sobrecarga do volume (causada pela expansão do volume de plasma e aumento da pré-carga) e do aumento de trabalho cardíaco. Tal hipertrofia é uma adaptação compensatória que em troca aumenta a síntese protéica nos cardiomiócitos (Sugden e Clerk; 1998). A indução do hipertireoidismo experimental resulta nessa forma de hipertrofia (Coleman et al., 1989).

O quadro de hipotireoidismo apresenta manifestações clínicas opostas às do hipertireoidismo. As manifestações cardíacas decorrentes do hipotireoidismo são resultado da diminuição da ação do HT tanto no coração quanto na vasculatura periférica. Os sinais clínicos mais comuns são bradicardia, diminuição da pressão do pulso e hipertensão diastólica (Danzi e Klein, 2003; Klein e Ojamaa, 2001). O aumento da pressão diastólica é acompanhado por uma queda da pressão sistólica. Desse modo, o hipotireoidismo resulta num aumento da resistência vascular sistêmica, diminuição da contratilidade cardíaca e diminuição do débito cardíaco (Klein e Danzi, 2007).

Diversas manifestações cardíacas causadas por disfunções da tireóide estão associadas a alterações na expressão de genes alvo do T3 (Danzi et al., 2005; Kahaly e Dillmann, 2005). Como o T3 induz mudanças na expressão de genes específicos envolvidos nos eventos contráteis, o ciclo de contração cardíaca será discutido. O ciclo cardíaco é dividido entre contração sistólica e relaxamento diastólico. Processos relacionados à contração são denominados “mecanismos inotrópicos” e mecanismos relacionados ao relaxamento são denominados “efeitos lusitrópicos”. O T3 diminui o tempo de relaxamento diastólico, isto é, o coração hipertireoideo relaxa numa velocidade alta (atividade lusitrópica), enquanto a diástole é prolongada no hipotireoidismo

(Mintz et al., 1991). A velocidade na qual a concentração de Ca^{+2} livre é reduzida no citosol é um evento crucial para o relaxamento diastólico, deixando uma menor quantidade de Ca^{+2} disponível para a troponina C dos filamentos finos das miofibrilas. Várias bombas de Ca^{+2} e trocadores de íons contribuem para a redução de Ca^{+2} no citosol, mas o contribuinte mais importante é a bomba de Ca^{+2} localizada no retículo sarcoplasmático (Rohrer e Dillmann, 1988). O gene codificante da bomba de Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático é marcadamente responsivo ao T3. O T3 aumenta a expressão gênica da ATPase Ca^{+2} ativada do retículo sarcoplasmático (SERCA2) (Zarain-Herzberg et al., 1994). A liberação de Ca^{+2} e sua captação dentro do retículo sarcoplasmático são determinantes críticos para função contrátil sistólica e relaxamento diastólico (Fazio et al., 2004). A atividade de SERCA2 é influenciada pela fosfolambam e sua fosforilação, que é influenciada pelo estado tireoideo (Carr e Kranias, 2002; Kiss et al., 1998). A ATPase $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ também está localizada no sarcolema e influencia indiretamente a concentração de Ca^{+2} . A ATPase $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ é somente uma das várias bombas iônicas consumidoras de ATP que contribuem para o aumento do consumo de oxigênio do coração hipertireoideo (Kahaly e Dillmann, 2005).

Um exemplo típico das ações de T3 em proteínas contráteis cardíacas específicas é a indução da mudança do tipo da isoforma de MHC observada no coração de ratos e coelhos tratados com T3 (Lompre et al., 1984; Morkin, 2000). O T3 regula diretamente a expressão de genes codificantes para MHC- α e MHC- β . A administração de T3 estimula a expressão do gene MHC- α , mas diminui a expressão do gene MHC- β (Morkin, 2000). No coração de ratos hipertireoideos, a miosina é exclusivamente composta por MHC- α , o que leva a uma rápida movimentação da cabeça globular da miosina ao longo dos filamentos finos e acelera a contração cardíaca (Lompre et al., 1984; Morkin, 2000).

O T3 também leva a um aumento marcante da expressão de actina cardíaca, a qual faz parte dos filamentos finos. Em situações de hipertireoidismo crônico, há também um aumento na produção da actina esquelética (Winegrad et al., 1990). A proteína regulatória cardíaca troponina I,

que faz parte dos filamentos finos, também é influenciada pelo estado tireoideo. O T3 influencia especialmente a isoforma de troponina I cardíaca em ratos pós-natais e adultos jovens pelo aumento da expressão do gene codificante para essa proteína (Dieckman e Solaro, 1990).

Embora diversos estudos tenham demonstrado os efeitos do T3 em proteínas cardíacas funcionais, pouco se sabe sobre a influência do T3 em proteínas estruturais cardíacas. Segundo Ferreira et al, o hipertireoidismo pode levar a um severo desarranjo sarcomérico ao longo do tempo no coração (Ferreira et al., 2003). Dessa forma, um estudo englobando a influência do T3 nas proteínas estruturais cardíacas seria de alta relevância.

1.5 O Hormônio Tireoideano e o Músculo Esquelético

O músculo esquelético é um dos principais tecidos alvo do HT (Everts et al., 1983; Haddad et al., 1997; Hausman e Watson, 1994; Simonides e van Hardeveld, 2008). O HT afeta o desenvolvimento normal do músculo esquelético de vertebrados, sendo primordial para o desenvolvimento da massa muscular e da diferenciação das características bioquímicas e contráteis do tecido (Finkelstein et al., 1991). Os HTs modulam reações de consumo de energia (contração e relaxamento) bem como reações dentro de vias de produção de energia com a deficiência tireoidea levando à debilidade muscular e fadiga excessiva (Silvestri et al., 2007).

Pacientes hipotireoideos e hipertireoideos apresentam diferentes mudanças metabólicas no músculo esquelético, porém com conseqüências similares. No primeiro caso, a fadiga é diretamente relacionada com a deficiência das ações do HT. No último, no entanto, a causa principal é a depleção do substrato energético muscular devido a uma alta demanda metabólica. Uma das conseqüências primárias da disfunção tireoideana é a baixa tolerância ao exercício, devido às suas ações diretas sobre o sistema cardíaco e muscular (van den Beld et al., 2005).

Tanto o hipotireoidismo quanto o hipertireoidismo induzem fraqueza muscular. A principal razão para essa fraqueza muscular é o decréscimo na eficiência muscular associada à perda de massa muscular (Zurcher et al., 1989). Em animais, a miopatia tirotóxica está associada à atrofia muscular como resultado da degradação protéica excedendo o aumento da síntese (Barrett e Gelfand, 1989; Muller e Seitz, 1984), enquanto a tireoidectomia em animais usualmente induz atrofia muscular tanto pelo decréscimo da síntese protéica, quanto pelo aumento da degradação (Garlick et al., 1988).

O T3 é um dos reguladores mais potentes da expressão de proteínas miofibrilares. Esse hormônio executa um papel crucial na diferenciação de características bioquímicas e contráteis do músculo esquelético de vertebrados, como transformação da isoforma de MHC embrionária ou fetal para isoformas adultas (Finkelstein et al., 1991; Gambke et al., 1983). Após o desenvolvimento para a fase adulta, há um processo de maturidade lento que continua a afetar o músculo esquelético durante a vida, resultando em dediferenciação de músculos de fibras lentas e rápidas numa idade avançada (Fitts et al., 1984). No adulto, T3 exerce profundos efeitos na expressão de genes codificantes de isoformas específicas de miosina e outras proteínas contráteis (Caiozzo et al., 1998; Caiozzo e Haddad, 1996; Haddad et al., 1998; Izumo e Mahdavi, 1988). O hipotireoidismo aumenta a expressão da isoforma MHC lenta, enquanto o hipertireoidismo tem efeito contrário, isto é, diminui a expressão de MHC lenta (Caiozzo et al., 1992; Ianuzzo et al., 1991; Izumo et al., 1986).

No músculo soléio de rato, o tratamento com T3 induz uma alta indução do conteúdo do tipo MHC II e repressão do conteúdo do tipo MHC I (Larsson et al., 1994; Larsson et al., 1995; Larsson e Yu, 1997; Li e Larsson, 1997). A resposta parece estar positivamente relacionada ao tempo do tratamento com T3, isto é, o conteúdo relativo das isoformas do tipo MHC IIa e miosina de cadeia leve rápida eram maiores nas fibras de soléio de ratos tratados com T3 por 8 semanas que os tratados por 4 semanas (Li e Larsson, 1997). No EDL, o tratamento com T3 induziu a repressão do tipo MHC IIa em fêmeas, sem

restrição da idade do animal, enquanto nenhuma mudança no tipo MHC IIa ocorre em machos (Larsson e Yu, 1997).

A transição MHC em resposta ao T3 não é somente músculo específica (Izumo et al., 1986; Larsson e Yu, 1997; Yu et al., 1998), mas também parece que alguns tipos de fibra I respondem rapidamente ao T3, enquanto outras respondem tardiamente ou não respondem (Caiozzo et al., 1998; Yu et al., 1998). Isso é consistente com o conceito de subpopulações de fibras tipo I, que são indistinguíveis com respeito a sua composição de MHC, mas diferem umas das outras em resposta à denervação e ao T3 (Caiozzo et al., 1998). Uma única fibra muscular pode apresentar uma regulação própria e singular da isoforma de MHC, independente do fato de ser do tipo I ou II. Uma fibra obtida do soléu (predominantemente do tipo I) de ratos hipertireoideos mostra uma regulação específica da expressão das isoformas de MHC, dependente de T3 (Yu et al., 1998). Diferentes músculos de ratos de ambos os gêneros mostram variações surpreendentes em resposta ao tratamento com T3. O mecanismo exato pelo qual essas alterações músculo específicas e tipo de fibra específica ocorrem não é conhecido. Entretanto, diferentes hipóteses têm sido levantadas. Uma delas preconiza que o efeito músculo e tipo de fibra específico se devam ao fato de que cada músculo e tipo de fibra apresentam uma quantidade e tipo de TR (d'Albis et al., 1990; Hughes et al., 1993). Vale ressaltar que fibras de contração lenta possuem maior nível de TRs (Hughes et al., 1993). Outra hipótese se baseia no fato de que músculos de contração lenta e rápida apresentam diferentes taxas de captação de T3 (van Hardeveld e Kassenaar, 1978). Fibras de contração lenta captam T3 de forma mais eficiente que fibras musculares de contração rápida (Muscat et al., 1995).

No estudo de Hudecová (2004) foi demonstrado que alterações nos níveis séricos dos HTs podem alterar a expressão gênica do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ (NCX), dos receptores de rianodina (RyRs) tipo 1 e 2 e dos receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3Rs) em músculo lento e rápido de ratos (Hudecova et al., 2004). É atraente especular que o HT pode alterar a homeostase de cálcio no músculo esquelético e isso influenciaria as propriedades de excitação e contração (Vadaszova et al., 2004). Esse duplo aumento de expressão de

Ca^{+2} -ATPase e receptores de rianodina no músculo de ratos, explica o aumento de contração e taxa de relaxamento no hipertireoidismo e diminuição no hipotireoidismo (Everts, 1996; Everts et al., 1983).

Apesar de diversos estudos abordarem aspectos moleculares e energéticos do músculo esquelético, poucos estudos demonstraram os efeitos do T3 sobre as proteínas sarcoméricas, com exceção das proteínas contráteis MHC, as quais o efeito do T3 está bem estabelecido.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar a ação do T3 sobre a expressão de proteínas estruturais da banda M no coração e músculo esquelético de ratos submetidos ao hipotireoidismo e hipertireoidismo experimental.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o efeito do T3 sobre a expressão gênica e protéica de miomesina, EH-miomesina e proteína M no coração e nos músculos Soléo e EDL de ratos.
- Analisar o efeito do T3 sobre a localização e imunomarcacão das proteínas miomesina, EH-miomesina e proteína M no coração e nos músculos Soléo e EDL de ratos.
- Verificar a ação do T3 no promotor dos genes responsivos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Experimentos *in vivo*

3.1.1 Animais

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) do ICB-USP, de acordo com os Princípios de Ética em Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram utilizados ratos machos adultos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, pesando entre 250 e 300 g (10 semanas de idade), provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas – USP e mantidos ao longo do período experimental no Biotério do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento (ICB-USP). Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas, em sala climatizada com temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e ração (NUVILAB).

Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- Grupo Controle: animais sem tratamento;
- Grupo Hipotireoideo (Hipo): animais tireoidectomizados e tratados com 0,05 % de metimazol e 4,5 mM de CaCl_2 , adicionados à água de beber por 20 dias;
- Grupo 2d: animais induzidos ao hipertireoidismo com 30 μg de T3/g de peso corpóreo/dia durante 2 dias;
- Grupo 4d: animais induzidos ao hipertireoidismo com 30 μg de T3/g de peso corpóreo/dia durante 4 dias;
- Grupo 8d: animais induzidos ao hipertireoidismo com 30 μg de T3/g de peso corpóreo/dia durante 8 dias;

Além disso, animais foram tratados por 2 dias com as seguintes doses de T3: 0,3 μg ; 1,5 μg ; 15 μg e 30 μg de T3/g de peso corpóreo/dia, respectivamente, 1 dose, 5 doses, 50 doses e 100 doses fisiológicas de T3 (Trost et al., 2000).

3.1.2 Protocolos Experimentais

3.1.2.1 Indução ao Hipertireoidismo

Os animais foram induzidos ao hipertireoidismo ao longo de 2, 4 e 8 dias, por injeções intraperitoneais diárias de T3 (triiodotironina – Sigma, St. Louis, MO, EUA) na dose de 30 µg/g de peso corpóreo/dia ou nas doses de 0,3 µg ; 1,5 µg; 15 µg e 30 µg de T3/g de peso corpóreo/dia durante 2 dias. O T3 foi previamente diluído em solução de NaOH 0,04 M e estocado no freezer (–20°C).

3.1.2.2 Indução ao Hipotireoidismo

Os ratos foram anestesiados com ketamina e xilazina. Realizou-se a assepsia, tricotomia e em seguida uma incisão, expondo a região anterior da traquéia até a visualização total da glândula tireóide. A glândula foi retirada com o auxílio de uma pinça e após a tireoidectomia total, o animal foi suturado e tratado com metimazol (Methimazole – Sigma) (0,05 %) e 4,5 mM de CaCl₂ (Calcium Chloride – Sigma), ambos adicionados à água de beber.

3.1.3 Análise da Massa Cardíaca

O trofismo cardíaco modulado pelos hormônios tireoideanos foi quantificado através da relação entre peso total do coração e o peso corpóreo, dado em mg/g de tecido. Após a decapitação, o coração foi rapidamente retirado e pesado, e então foi realizado o cálculo para avaliação da massa cardíaca nos diferentes grupos experimentais.

3.1.4 Análise de expressão gênica

3.1.4.1 Extração de RNA

Para análise de expressão gênica, utilizou-se a técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Real Time PCR*), apresentada posteriormente. Inicialmente, foi realizada a extração do RNA total dos corações, músculos soléo e EDL (extensor digital longo) utilizando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), conforme protocolo recomendado pelo fabricante. Após a extração, o RNA total das amostras foi mensurado em espectrofotômetro, utilizando para a quantificação comprimento de onda de 260 nm. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose denaturante, para verificação da qualidade e integridade do RNA.

3.1.4.2 Transcrição Reversa (RT, *Reverse Transcription*)

A partir de 1 µg de RNA total extraído de uma amostra foi realizada a reação de transcrição reversa para a síntese de uma fita de DNA complementar ao RNAm, o cDNA. Para cada 20 µL de volume final de reação foram adicionados: 1 µL dNTP (dinucleotídeos trifosfato, 10 mM); 2 µL de DTT (0,1 M); tampão 5x (fornecido pelo fabricante); 0,02 µg/µL de iniciadores oligo-DT (oligodesoxitimidina *primer*); 200 U de enzima transcriptase reversa MMLV (Promega, Madison, WI, EUA) e água tratada com dietilpirocarboneto (DEPC). A reação foi incubada por 10 min a 70 °C, 60 minutos a 42 °C e 10 minutos a 95 °C. Essa reação foi realizada em termociclador (Mastercycler gradient – Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). As amostras foram analisadas em gel de agarose 1 %, para verificação da qualidade e integridade do cDNA.

3.1.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (Real Time PCR)

Todas as amostras e controles foram analisados em duplicata e as reações foram fluorescentemente quantificadas com o aparelho ABI Prism 5700 sequence detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As

condições de ciclagem para a reação de PCR em tempo real foram 95 °C por 10 min seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 60 s. Foram utilizadas 40-80 ng/μL de cDNA em uma reação contendo 25 μL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 450 nM de iniciadores (*primers* senso e antisenso) totalizando 55 μL de reação que foi dividida em 2 tubos (duplicatas). As reações foram quantificadas através da análise da fluorescência. A análise das curvas de amplificação foi realizada utilizando-se o Applied Biosystems sequence detection software (Applied Biosystems). O limiar de ciclagem (CT, *cycle threshold*) representa o ciclo de PCR no qual um aumento da fluorescência reportada abaixo do sinal da linha basal pode ser primeiramente detectável. O valor de CT das amostras e controles pode ser ajustado inicialmente pela quantidade de gene do controle interno, no caso, o TFIID, fator de transcrição II D (Stockholm et al., 2001), ($\Delta CT = CT \text{ gene alvo} - CT \text{ do TFIID}$) e, em seguida, comparado com a média do controle pela subtração do ΔCT para atingir o $\Delta\Delta CT$. O valor final de cada amostra é reportado como unidades arbitrárias da diferença relativa da expressão da média do controle (calculado como $2^{-\Delta\Delta CT}$), com a média do controle sendo arbitrariamente 1 (Liu e Saint, 2002; Livak e Schmittgen, 2001).

Os *primers* senso e antisenso foram desenhados em exons diferentes com a finalidade de evitar a amplificação de DNA genômico, caso tal contaminação ocorresse na reação de RT.

As seqüências dos diferentes *primers* utilizados neste estudo estão apresentadas na tabela abaixo:

Tabela 1. Lista de *primers* utilizados nas reações de PCR em Tempo Real.

Gene	Senso	Antisenso	#GenBank
Proteína M	178-ACCTCCTGGACCAATATGCATT	238-TTCGAAGAGGACCTCTCTGTAAGAG	NM008664
Miomesina	1237-TGCTCAAATTCAGCAGGAGTTG	1289-GGATATCAAGTTTGTCCCCTACGA	XM237523
EH-miomesina	471-GGAGGTAGCTTCTAAGGAGCAAAG	537-AGATGGCACCGCTACTGGAT	AY177416
TFIID	616-ACGGACAACGCGTTGATTTT	724-ACTTAGCTGGGAAGCCCAAC	D01034

3.1.5 Análise de imunomarcção

Ratos da linhagem Wistar do sexo masculino (250~300 g p.c.) foram tratados com T3 na dose 0.30 µg/100g pc (100 doses fisiológicas) por 2, 4 e 8 dias. Os ratos foram sacrificados por decapitação e tiveram os ventrículos esquerdos, músculo soléo e EDL retirados rapidamente e congelados em isopentano em nitrogênio líquido. Os tecidos foram cortados em criostato (7,0 µm). As secções foram coletadas em lâminas gelatinizadas, secas por 1 h a temperatura ambiente e fixadas em PFA 4% por 10 min. Bloqueamos com glicina 0,1 M por 5 min, permeabilizamos o tecido em 0,2 % Triton X-100/PB (tampão fosfato, *phosphate buffer*) por 10 min e incubamos com o anticorpo miomesina B4 (Grove, Kurer 1984) com soro normal contra cabra e PB 0,1 M + Triton 0,3 % durante a noite e, no dia seguinte, um anticorpo goat anti-mouse Alexa 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) foi usado para visualização da proteína. Realizamos a mesma metodologia para o anticorpo EH-miomesina (Agarkova et al., 2000) (utilizando um anticorpo secundário goat anti-rabbit Alexa 488 – Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) e proteína M clone AA259 (Vinkemeier et al., 1993) com secundário fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-mouse IgA (Sigma).

Foram realizados os mesmos experimentos de imunofluorescência nos músculos soléo e EDL utilizando o protocolo sugerido por Agarkova (Agarkova et al., 2004). Para diferenciar os diferentes tipos de fibra foram feitas imunofluorescências em cortes seriados para MHC I (clone NOQ7.5.4D, Sigma) e para MHCII (clone My32, Sigma), utilizando como anticorpo secundário o goat anti-mouse Alexa 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA).

3.1.6 Análise de Expressão Protéica

3.1.6.1 Extração da proteína total dos músculos Soléo e EDL tratados com T3

As amostras de tecido foram dissecadas e homogeneizadas em tampão SDS (3.7 M uréia; 134.6 mM Tris-HCl, pH 6.8; 5.4 % SDS; 2.3 % NP-40; 4.45 % β -mercaptoetanol; 4 % glycerol) e 0,1 mL de um coquetel de inibidores de proteinases (Sigma) (Agarkova et al., 2005). As amostras dos músculos foram homogeneizadas nesta solução na proporção de 10 mL por 1 g de tecido e centrifugadas por 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e realizou-se a dosagem de proteína total através do método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976) (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

3.1.6.2 Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e imunomarcagem

Para a realização da quantificação protéica, 25 μ g da proteína total foram submetidos à eletroforese em gel denaturante de poliacrilamida 6 % por 1 hora a 150 Volts. Após a eletroforese, as proteínas totais presentes no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Trans Blot Transfer Medium Pure Membrane – Bio-Rad) em um sistema úmido sob 20 Volts de tensão durante a noite. Após a transferência, a membrana foi incubada com leite em pó desnatado 5 % por 1 hora para bloqueio de ligações inespecíficas e, em seguida, os anticorpos primários específicos para miomesina (1:500, polyclonal rat anti-myomesin My190 Nrt antibody) (Obermann et al., 1996), EH-miomesina (1:1000, rabbit anti-mouse EH) (Agarkova et al., 2000) e proteína M (monoclonal mouse anti-M protein antibody, clone AA259, IgA) (Vinkemeier et al., 1993) foram incubados com leite (1 %). O anticorpo específico para a proteína α -actinina foi utilizado como controle interno da quantidade de proteína carregada (1:2000, Jackson Immuno Research, Newmarket, Suffolk, Reino Unido) (Diniz et al., 2007). Após 1 hora de incubação a temperatura ambiente, a membrana foi lavada com 1x tampão fosfato salino (PBS), por 30 minutos e foram adicionados os anticorpos secundários específicos (1:10000)

horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG, anti-mouse IgGs e anti-rat IgG (Jackson Immuno Research, Newmarket, Suffolk, Reino Unido) por 1 hora a temperatura ambiente. Após a ligação do anticorpo secundário, as membranas foram novamente lavadas com PBS e acrescentou-se a solução de ECL (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido). Ao término deste processo, as membranas foram então expostas ao filme de raio X (CL-Xposure Film – Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA), promovendo a marcação das bandas.

3.2 Experimentos *in vitro*

3.2.1 Obtenção de cultura primárias de cardiomiócitos

Para o estabelecimento das culturas primárias foi utilizado o protocolo descrito previamente (Barreto-Chaves et al., 2000). Ratos neonatos de 1 a 3 dias foram desinfetados com álcool 70 % e decapitados sob condições assépticas. Após abertura da caixa torácica e exposição do coração, este foi rapidamente retirado, os átrios foram desprezados e os ventrículos foram cortados em pequenos pedaços e transferidos para um tubo de centrífuga contendo tampão de digestão à base de pancreatina/colagenase (Worthington biochemical corporation). O tecido foi incubado a 37 °C, sob agitação, durante 10 minutos. Após esse período o sobrenadante foi desprezado e novo tampão de digestão foi adicionado aos fragmentos de tecido para nova incubação por 20 minutos. O sobrenadante contendo células em suspensão foi aspirado e centrifugado para a obtenção do precipitado celular. Esse foi ressuspensionado em soro de bezerro recém-nascido (NCS, *newborn calf serum* – Invitrogen) e guardado em garrafa de cultura mantida em estufa de CO₂, até utilização posterior. Este processo de digestão enzimática do tecido foi repetido até que ocorresse o processamento total do tecido cardíaco. Nesse momento, todas as suspensões celulares foram reunidas e centrifugadas novamente. Este precipitado total foi ressuspensionado em uma solução tampão à base de fosfato e aplicado a um gradiente de Percoll (GE Healthcare, Bucks, Reino Unido). Esse passo permitiu a separação dos miócitos cardíacos dos demais tipos celulares

presentes originalmente no tecido, levando em consideração que as células apresentam volumes e densidades diferentes. Após a centrifugação e formação do gradiente de Percoll (3000 rpm, por 30 minutos a 25 °C), duas bandas celulares se formaram: uma inferior e, portanto, de maior densidade (contendo miócitos), e outra superior, correspondendo aos não-miócitos, principalmente fibroblastos. Essas bandas foram retiradas separadamente do gradiente e lavadas com meio Eagle modificado por Dullbeco (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium – Invitrogen) para a total remoção do Percoll. Após este período as células (miócitos e não miócitos) foram contadas, sua viabilidade estimada pelo método de exclusão do corante azul de Trypan (Trypan Blue - Invitrogen) e, posteriormente plaqueadas em placas de 60 mm, utilizando DMEM contendo NCS e soro de cavalo (HS, Horse Serum - Invitrogen). As placas foram mantidas em estufa de CO₂, sob condições estéreis, até a realização dos experimentos.

3.2.2 Tratamento dos Cardiomiócitos

Antes do tratamento, as células foram privadas parcialmente de soro, sendo mantidas 24 hs com DMEM contendo 0,5 % de NCS e 1 % de 5-bromo-2'-deoxyuridine (Sigma). Os cardiomiócitos em cultura receberam tratamento com T3 (Sigma) por 12, 24 e 48 h na dose de 0,1 µM. O T3 foi previamente diluído em solução de estoque de 1 mg/mL em NaOH 0,04 M e estocado em freezer a -20 °C.

3.2.3 Análise da expressão gênica

Para análise da expressão gênica, a partir das culturas de cardiomiócitos, foi realizada a extração do RNA total, a transcrição reversa e a reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real Time PCR), protocolos estes já descritos anteriormente no item 3.1.4.

3.3 Experimentos de Transfecção Transiente

3.3.1 Cultivo das Células C2C12

Células da linhagem muscular C2C12 (Yaffe e Saxel, 1977) foram cultivadas numa placa de 24 poços em DMEM suplementado com 20 % de soro fetal bovino (FBS, fetal bovine serum) e antibióticos até a confluência de 70 %. Antes da transfecção, as células foram desprovidas de soro e antibióticos.

3.3.2 Transfecção das Células C2C12

As células C2C12 foram transfectadas utilizando-se o reagente Lipofectamina (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante, com ~2.3 Kb da região reguladora do gene da proteína M seguido pelo gene reporter da *firefly* luciferase (pGL3, Promega) (200 ng/poço), com 150 pb da região promotora e com o construto contendo promotor mínimo sem os 220 primeiros pares de bases do primeiro exon. Como controle da eficiência da transfecção, *renilla* luciferase (pRL-CMV, Promega) (10 ng/poço) foi utilizada. Os vetores de expressão contendo o cDNA dos receptores do hormônio tireoideano TR α e β também foram co-transfectados (10 ng/poço). Como controle da eficiência do tratamento com T3, transfectamos 3 cópias de TREs positivos da selenodesiodase do tipo 1, D1 (Zhang et al., 1998).

3.3.3 Tratamento das células C2C12

Após a transfecção, as células foram mantidas em DMEM + 5 % de soro de cavalo (HS, *horse serum*), para induzir a diferenciação. Após 24h o meio foi substituído por DMEM + 5 % HS estripado (hipotiroideo) e tratadas com T3 (50 nM) por 24 h. O HS foi estripado utilizando-se carvão ativado (CCS, *charcoal stripped serum*) (Merck, Darmstadt, Alemanha). O tratamento do soro com carvão ativado é utilizado basicamente para retirar lípidos, esteróides e hormônio tireoideano do soro, mantendo fatores essenciais para proliferação e sobrevivência das células.

3.3.4 Atividade das Luciferases

A atividade das respectivas enzimas luciferase foi determinada com o kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) em luminômetro Lmax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

3.4 Análises Estatísticas

A análise de variância (ANOVA) e o subsequente teste de Tukey foram utilizados para a comparação das médias dos valores de mais de dois grupos experimentais. Para todas as comparações foi considerado significativo $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4. 1 Efeito do T3 na relação peso coração/peso corpóreo

Os efeitos já bem conhecidos do T3 na massa cardíaca são sustentados pelo aumento da razão do peso do coração (PCor) pelo peso corpóreo (PC) (PCor/PC). Conforme o esperado, o tratamento com T3 foi capaz de promover hipertrofia cardíaca (Tabela 2).

Tabela 2. Peso do coração, peso corpóreo e razão peso coração/peso corpóreo

Grupos	Peso coração (mg)	Peso corpóreo (g)	PCoração/PCorpo (mg/g)
Controle	905,33 ± 150,05	237,6 ± 14,12	3,8 ± 0,5
8 dias	1370 ± 134,35**	207,6 ± 5,80*	6,59 ± 0,46**

Animais controle e animais tratados com T3 (100 doses fisiológicas por 8 dias). Os valores são expressos como média ± DP. * $p < 0.005$ e ** $p < 0.001$ quando comparado com o grupo controle.

4.2 Ação do T3 nas proteínas estruturais da banda M no coração

4.2.1 Miomesina e EH-miomesina

Inicialmente, foi analisado o efeito do tratamento com T3 na expressão da miomesina e da EH-miomesina. A expressão gênica de EH-miomesina não foi alterada no coração de ratos induzidos ao hipertireoidismo e hipotireoidismo experimental, enquanto que a expressão gênica de miomesina foi alterada somente com 8 dias de tratamento com T3 (Figura 3).

O método de imunofluorescência foi empregado para a detecção das proteínas miomesina e EH-miomesina nos ventrículos esquerdos de ratos tratados com T3 (30 µg/g pc - 100 doses fisiológicas) por 8 dias. É possível notar que não há alteração da imunomarcagem de miomesina e EH-miomesina no tratamento com T3 (Figura 4).

Figura 3. Expressão gênica de miomesina e EH-miomesina no coração de ratos induzidos ao hipertireoidismo e hipotireoidismo experimental. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão; $n=5-6$ por grupo. * $p < 0.001$ vs controle.

Figura 4. Imunomarcção para miomesina e EH-miomesina nos ventrículos esquerdos de ratos controle e tratado com T3 por 8 dias. Microscopia Confocal. Aumento de 60 x. A barra representa 10 μm .

4.2.2 Proteína M

Os níveis do RNAm da proteína M foram avaliados no coração de ratos adultos eutireoideos, submetidos a indução de hipo e hipertireoidismo. Ratos hipotireoideos apresentaram um aumento de 3,4 vezes nos níveis de RNAm de proteína M no coração, quando comparados com ratos eutireoideos (Figura 5A). O oposto foi observado em ratos submetidos ao hipertireoidismo

experimental, os quais apresentaram repressão dos níveis de RNAm de proteína M a níveis indetectáveis (Figura 5A). Além disso, o tratamento de ratos eutireoideos com doses fisiológicas crescentes de T3 por 48h demonstrou uma repressão dose dependente da expressão gênica de proteína M (Figura 5B). Uma dose fisiológica foi suficiente para induzir uma redução de 33 % ($p < 0,01$) da expressão gênica de proteína M. Da mesma forma, doses crescentes de T3 também diminuíram a expressão gênica de proteína M, todos $p < 0.001$ (Figura 5B).

Figura 5. (A) Expressão gênica de proteína M no coração de ratos induzidos ao hipertireoidismo e hipotireoidismo experimental. (B) Expressão gênica de proteína M em coração de ratos tratados com diferentes doses de T3 por 48hs. Os valores estão expressos em média $\pm$ desvio padrão; $n=5-6$ por grupo * $p < 0.01$ vs controle, ** $p < 0.001$ vs controle.

Para avaliar o efeito do T3 na marcação de Proteína M no tecido cardíaco, nós utilizamos anticorpos específicos contra a proteína M (mAb AA259) em secções transversas de ventrículo esquerdo. Um padrão estriado, típico da localização da banda M, foi obtido. O tratamento com T3 (100 doses fisiológicas) resulta num decaimento da imunomarcação de proteína M com 8 dias de tratamento (Figura 6).

Figura 6. Imunomarcção para proteína M nos ventrículos esquerdos de ratos controle e tratado com T3 por 8 dias. Microscopia Confocal. Aumento de 60 x. A barra representa 10 μ m.

Com a finalidade de verificar se o efeito do T3 sobre a proteína M se dava através de uma ação sistêmica ou uma ação direta do T3 sobre os cardiomiócitos, foram realizados testes *in vitro* utilizando cultura primária de cardiomiócitos. O tratamento com T3 por 12, 24 e 48h diminuiu os níveis do RNAm da proteína M significativamente (Figura 7). O tratamento com T3 por 12h reduziu em 70% os níveis do RNAm da proteína M, quando comparados com o controle ($p < 0,01$). Esse efeito foi mantido ao longo do tempo até 48 horas (Figura 7).

Figura 7. Expressão gênica de proteína M em cultura primária de cardiomiócitos. As células foram mantidas em meio completo (controle) ou foram tratadas com T3 (10^{-7} M) por diferentes tempos (12h, 24h e 48h). Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão; n=4 -5 por grupo. * $p < 0.001$ vs controle.

Tendo em vista a ação direta do T3 sobre células musculares cardíacas, se fez necessário investigar se a ação observada se dava através da interação

direta T3-TR-TRE no promotor da proteína M ou por outro mecanismo. Para tanto, foi utilizada uma construção repórter contendo a região promotora proximal -2294 a +228 da proteína M dirigindo a transcrição da luciferase *firefly* (proteína M – Luc) em células C2C12.

O tratamento com T3 diminuiu a atividade promotora da proteína M (Figura 8). A transfecção de TR α 1 e TR β 1 reprimiram igualmente a atividade promotora de proteína M, de maneira dose-dependente (Figura 8).

Figura 8. Regulação da atividade promotora da proteína M pelo T3 através do TR α e TR β . O construto do promotor da proteína M dirigindo o gene da luciferase *firefly* foi co-transfectado em células C2C12 na presença e na ausência de vetores de expressão para TR α 1 e TR β 1 ou o vetor de expressão vazio, pCMX. Células foram tratadas com diferentes doses de T3 (0,1; 1 and 100 nM) ou veículo (V). * $p < 0,001$ vs controle.

Em um segundo experimento, células da linhagem C2C12 foram transfectadas com o promotor mínimo (-158 pb a +228) ou com uma porção de ~2.3 Kb do promotor da proteína M dirigindo a luciferase *firefly*. Essas células foram co-transfectadas com um vetor de expressão contendo o gene do TR α . Como controle positivo para o tratamento com T3 foi utilizado um vetor contendo 3 cópias de TREs positivos descritos no promotor do gene da D1. O tratamento com 50 nM de T3 foi efetivo, uma vez que a atividade promotora da D1 aumentou ~30 vezes (Figura 9). Pode-se notar que a atividade promotora do promotor mínimo ~5 vezes maior que a do promotor com 2.3 Kb. Isso indica

que há elementos repressores do promotor da proteína M na região de -2300pb a -158 pb, uma vez que, sendo tal região deletada, o promotor aumenta a sua atividade. O T3 reprimiu significativamente a atividade promotora do promotor mínimo e do promotor contendo 2.3 Kb (~50 %; $p < 0,01$ e $p < 0,001$ vs controle, respectivamente) (Figura 9). O mesmo experimento foi reproduzido em células HEK e L6. Nesses modelos, a transfecção do promotor mínimo e do promotor contendo 2.3 Kb gerou o mesmo resultado observado nas células C2C12, onde o promotor mínimo apresentou uma atividade promotora maior que o de 2.3 Kb.

A

B

Figura 9. Atividade transcripcional do controle positivo D1, pGL3 sem promotor, promotor da proteína M mínimo e com 2.3 Kb. Retângulo escuro representa a região de -2300pb a -158pb, retângulo branco representa a região de -158pb a +1pb, retângulo achurado representa a região de +1 a +228 e losangos representam possível TRE negativo. (A) Os dados estão expressos como unidades arbitrárias onde o grupo de células sem T3 transfectadas com TREs da desidase 1 foi arbitrariamente fixado como 1. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão; n=3 por grupo; (B) Os dados estão expressos como unidades arbitrárias onde os grupos sem T3 foram arbitrariamente fixados como 1. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão; n=3 por grupo. * $p < 0,01$ vs grupo sem T3, ** $p < 0,001$ vs sem T3

Esses resultados demonstram que o provável TRE responsivo ao T3 encontra-se na porção de -158 pb a +228 pb do promotor da proteína M. Desse modo, construímos dois construtos: um com a porção de -158 a +1 e outro com a porção +1 a +228. O construto contendo TREs positivos da D1, utilizado

como controle positivo, aumentou cerca de 10 vezes com o tratamento com T3 (Figura 8A). Além disso, ambos os construtos contendo as diferentes porções do promotor da proteína M responderam de forma semelhante ao tratamento com T3 (Figura 10). Sendo assim, acreditamos que há dois possíveis TREs negativos regulando o promotor da proteína M, um na região entre -158 a +1 e outro na de +1 a +228.

Figura 10. Atividade transcricional do controle positivo D1, promotor da proteína M mínimo, promotor da proteína M sem a porção 5' do exon 1 (-158 a +1), promotor da proteína M somente com a porção +1 a +228. Retângulo branco representa a região de -158pb a +1pb, retângulo achurado representa a região de +1 a +228 e losangos representam possível TRE negativo. (A) Os dados estão expressos como unidades arbitrárias onde o grupo de células sem T3 transfectadas com TREs da desiodase 1 foi arbitrariamente fixado como 1. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão; n=3 por grupo; (B) Os dados estão expressos como unidades arbitrárias onde os grupos hipotireoideos foram arbitrariamente fixados como 1. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão; n=3 por grupo. * $p < 0,05$ vs grupo sem T3, ** $p < 0,01$ vs sem T3, *** $p < 0,001$ vs sem T3

4.3 Ação do T3 nas proteínas estruturais da banda M nos músculos Sóleo e EDL

4.3.1 Miomesina e EH-miomesina no músculo Sóleo

A expressão gênica da miomesina e da EH-miomesina foi avaliada no músculo sóleo após 2, 4 e 8 dias de tratamento com T3 (100x). A avaliação dos níveis de RNAm demonstrou que o tratamento com T3 reduziu a expressão gênica de miomesina para ~50% e ~30% ($p<0.0001$) após 4 e 8 dias de tratamento, respectivamente (Figura 11A), enquanto a expressão gênica de EH-miomesina não foi alterada nos diferentes tempos de tratamento (Figura 11B).

Figura 11. Expressão gênica de miomesina (A) e EH-miomesina (B) no músculo sóleo de ratos controles e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão; $n=4-6$ por grupo * $p<0,0001$ vs controle

Com o objetivo de avaliar a distribuição da miomesina e EH-miomesina nos diferentes tipos de fibras no músculo sóleo, anticorpos específicos para MHC I (clone NOQ7.5.4D, Sigma), MHCII (clone My32, Sigma), miomesina (clone B4) e EH-miomesina (anti-moEH) foram utilizados. A miomesina (Figura 12), e a EH-miomesina (Figura 13) não apresentaram distribuição diferenciada nos tipos de fibra I e II, mesmo após o tratamento com T3 (2, 4 e 8 dias).

Figura 12. Imunomarcacão de MHC I, MHC II e Miomesina no músculo sóleo de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias. Microscopia Confocal. Aumento de 20 x. Barra, 50 μ m.

Figura 13. Imunomarcacão de MHCI, MHCII e EH-miomesina no músculo sóleo de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias. Microscopia Confocal. Aumento de 20x. Barra, 50µm.

A expressão protéica de miomesina e EH-miomesina foi avaliada no músculo sóleo através da técnica de Western blotting utilizando anticorpo específico para miomesina e EH-miomesina. Como controle da quantidade de proteína, utilizamos anticorpo para α -actinina. A expressão protéica de miomesina não foi alterada no músculo Sóleo ao longo do tratamento com T3 (100x) por 2, 4 e 8 dias (Figura 14). Por outro lado, a expressão protéica de EH-miomesina aumenta no músculo sóleo após 2 e 4 dias de tratamento com T3 e reduz com 8 dias de tratamento, mas mantendo-se mais alta que o controle (Figura 15).

Figura 14. Expressão protéica de miomesina no músculo sóleo de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão; n=4 por grupo.

Figura 15. Expressão protéica de EH-miomesina no músculo sóleo de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão; $n=4$ por grupo. * $p<0,001$ vs controle, ** $p<0,0001$ vs controle

4.3.2 Miomesina e proteína M no músculo EDL

O tratamento com T3 por 4 e 8 dias diminuiu a expressão gênica de miomesina no músculo EDL (para ~70% e ~50%, respectivamente, $p<0,0001$, Figura 16A). Além disso, o T3 diminuiu gradativamente a expressão gênica de proteína M ao longo do tempo; 2, 4 e 8 dias (Figura 16B).

Figura 16. Expressão gênica de miomesina (A) e proteína M (B) no músculo EDL de ratos controles e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão; n=4-6 por grupo * $p < 0,001$ vs controle ** $p < 0,0001$ vs controle

Em relação à distribuição de miomesina no músculo EDL, não foi observada alteração após tratamento com T3 nos diferentes tempos estudados (Figura 17). A proteína M apresentou uma imunomarcacão diferenciada nos tipos de fibra I e II. Observou-se que as fibras tipo II apresentaram maior marcação para proteína M e, ainda, o tratamento com T3 promoveu uma marcante diminuição na intensidade de marcação, sendo indetectável após 8 dias de exposição ao hormônio (Figura 18).

Figura 17. Imunomarcção de MHC I, MHC II e Miomesina no músculo EDL de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias. Microscopia Confocal. Aumento de 20 x. Barra, 50 μ m.

Figura 18. Imunomarcção de MHC I, MHC II e proteína M no músculo EDL de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias. Microscopia Confocal. Aumento de 20 x. Barra, 50 μ m.

A expressão protéica de miomesina não foi alterada no músculo EDL ao longo do tratamento com T3 (100x fisiológica) por 2, 4 e 8 dias (Figura 19). Os dados de expressão protéica da proteína M acompanharam os de expressão gênica, onde a expressão protéica de proteína M diminuiu em ratos tratados com T3 (100x fisiológica) por 4 e 8 dias (Figura 20).

Figura 19. Expressão protéica de miomesina no músculo EDL de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão; n=4 por grupo.

Figura 20. Expressão protéica de proteína M no músculo EDL de ratos controle e tratados com T3 por 2, 4 e 8 dias. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão; n=3-4 por grupo. * $p < 0,001$ vs controle

5 DISCUSSÃO

5.1 Influência do T3 na expressão de proteínas estruturais da banda M no coração de ratos

No presente estudo, demonstramos que o T3 possui um efeito forte e rápido na expressão gênica da proteína M no coração. Os efeitos de T3 no coração são marcantes na proteína M, porém pode-se observar que a expressão gênica de miomesina também foi alterada após um longo tratamento com T3, mas sem alterações da sua imunomarcagem. Além disso, os mecanismos moleculares da ação do T3 envolvem a transcrição da proteína M, pois esse foi capaz de reprimir a atividade promotora desse gene em ensaios de transfecção transiente.

Atualmente, está bem estabelecido que o T3 leva a um aumento do cronotropismo e inotropismo cardíacos, resultando em aumento de função. O aumento agudo de função cardíaca conduzidos pelo T3 evolui, entretanto, para hipertrofia, um cenário completamente oposto que eventualmente leva à severa perda de função, incluindo falência do miocárdio e arritmia atrial (Ching et al., 1996). Até hoje, o perfil da expressão de importantes genes no coração tem sido descrito de maneira aguda e crônica em animais tratados com T3, porém pouco se sabe sobre a expressão de genes durante a transição do estado de ganho para perda de função cardíaca. Está claro, por exemplo, que o T3, num período curto e longo de tratamento, aumenta a expressão do gene da miosina de cadeia pesada alfa (MHC- α), enquanto reprime o gene da MHC beta (MHC- β) (Dillmann, 1990; Klein e Ojamaa, 2001). Esse efeito leva a um aumento da velocidade de contração, sendo portanto, a base do ganho de cronotropismo induzido pelo T3. O gene da ATPase do retículo sarcoplasmático Ca^{+2} ativada (SERCA-2, *sarcoplasmic reticulum Ca^{+2} ATPase*) também é induzido pelo T3 num período agudo e acredita-se que esse é o principal evento molecular que auxilia no aumento da velocidade de relaxamento do coração (Muller et al., 1997; Takeuchi et al., 2003). Uma vez que a alta expressão de MHC- α e SERCA-2 são mantidas pelo T3, mesmo quando a hipertrofia descompensada é estabelecida, pode-se interpretar que esses genes não estão envolvidos diretamente na transição entre a hipertrofia adaptativa e insuficiência e, até

hoje, não há um gene candidato em potencial para tal dramática mudança de função.

Apesar de uma grande gama de estudos abordarem a ação do T3 na expressão de genes relacionados com a contração, pouco se sabe sobre sua influência na expressão de genes estruturais sarcoméricos. Proteínas estruturais sarcoméricas são cruciais para a manutenção da arquitetura sarcomérica e também são importantes para regular vias de sinalização no controle do tamanho celular. É bem conhecido, por exemplo, que o disco Z contém calcineurina, uma importante fosfatase envolvida na patogênese da hipertrofia cardíaca (Frey e Olson, 2003; Molkentin et al., 1998). Além disso, a proteína quinase C Epsilon (PKC ϵ), quinase que controla a contratilidade e hipertrofia, pode se ligar ao disco Z (Dorn e Force, 2005). De acordo, a banda M contém creatina kinase M, uma enzima envolvida no restabelecimento do reservatório de energia (Stolz et al., 1998). Enolase, fosfofrutoquinase e adenilato quinase também estão localizadas na banda M, sugerindo um papel adicional da banda M como uma estrutura ligada à regulação do metabolismo energético (Keller et al., 2000; Lange et al., 2002). Além de tudo, está claro que os elementos de ancoragem sarcoméricos podem também ser importantes lugares de sinalização, portanto um melhor entendimento dos genes estruturais sarcoméricos será de uso para aprofundarmos nosso conhecimento na plasticidade cardíaca.

Esse é o primeiro estudo que analisou sistematicamente a ação do T3 sobre a distribuição, regulação e expressão das proteínas estruturais sarcoméricas. Nossos resultados obtidos do tratamento de ratos com T3 demonstraram que o gene da proteína M é particularmente sensível ao hormônio. Somente uma única dose de T3 foi suficiente para reduzir significativamente os níveis de RNAm da proteína M. Doses crescentes de T3 progressivamente diminuíram os níveis de RNAm da proteína M, indicando um efeito dose dependente. A sensibilidade desse gene ao T3 foi confirmada por experimentos utilizando ratos hipotireoideos, onde foi observado um marcante aumento na expressão gênica de proteína M. O gene da miomesina não

apresentou a mesma sensibilidade que o da proteína M, uma vez que só foi regulado após 8 dias de tratamento com T3.

Além dos dados obtidos a partir da análise da expressão gênica, ainda avaliamos a imunomarcação para proteínas da banda M em situações controle e após estímulo com T3. A imunofluorescência para proteína M mostrou um padrão típico estriado, o que corrobora o padrão obtido em estudos anteriores utilizando o mesmo anticorpo (Grove et al., 1985; Grove et al., 1984; Obermann et al., 1996). A intensidade da imunomarcação da proteína M diminuiu com tratamento com T3, o que sugere uma menor expressão protéica da proteína M. O fato de que tanto os níveis de RNAm, quanto a intensidade de imunomarcação da proteína M foram rapidamente e intensamente reprimidos, sugere que mecanismos relacionados ao controle da transcrição e estabilidade do RNAm podem estar envolvidos. No entanto, não é descartado que uma proteólise rápida, como o sistema ubiquitina/proteassoma, possa estar envolvido no processo celular da proteína M dependente de T3.

A fim de descartar influências sistêmicas, testamos os efeitos do T3 sobre a expressão gênica de proteína M em cultura primária de cardiomiócitos. O T3 rapidamente diminuiu a expressão gênica de proteína M (em 12 horas), um efeito que se estabilizou ao longo de 48 horas. Esses resultados demonstraram que o T3 age diretamente nos cardiomiócitos para reprimir a expressão da proteína M e tal efeito não depende da interação do T3 com outros sistemas ou com outros hormônios, como hormônio do crescimento, sistema simpatoadrenal ou regulação autonômica.

Na maioria dos casos, o controle da expressão por T3 é realizado através de receptores nucleares, TR, que reconhecem e se ligam a seqüências do TRE. Dessa maneira, transfectamos células da linhagem C2C12 com um construto contendo 2.3 Kb do promotor da proteína M dirigindo a região codificadora da luciferase *firefly* para verificar a responsividade de tal promotor ao T3. Os resultados mostram que o T3 regula a atividade promotora da proteína M via ligação a TR α e β . Além disso, a responsividade do promotor da proteína M foi dose dependente, demonstrando a sensibilidade desse promotor

ao T3. Em outro ensaio, demonstramos que o possível TRE negativo do promotor da proteína M encontra-se na região de -158 a +228 pb, uma vez que esse construto respondeu da mesma maneira que o de 2.3 Kb ao tratamento com T3. Acreditamos ainda que possam existir dois TREs em potencial no fragmento menor do promotor (-158 a +228 pb), um presente na região de -158 a +1 pb e outro de +1 a +228 pb, pois ambos os fragmentos do promotor da proteína M diminuíram sua atividade no tratamento com T3.

Um estudo do nosso grupo demonstrou previamente, por microscopia eletrônica, que a banda M é primeiramente afetada pelo T3, um efeito que precede a falência do miocárdio, sugerindo que a degeneração da banda M pode provocar a desorganização do sarcômero (Ferreira et al., 2003). Poucos estudos analisaram a banda M sob diferentes condições patológicas. No nível estrutural, foi demonstrado que o consumo de álcool perturba a estrutura normal da banda M no miocárdio fetal (Syslak et al., 1994). Esse efeito parece ser específico na banda M, uma vez que outras estruturas sarcoméricas estão bem preservadas, isto é, bandas I e A e disco Z (Syslak et al., 1994). Estudos subseqüentes abordaram a abundância da miomesina em doenças cardíacas. Hein e colaboradores (1995) reportaram que a isquemia no miocárdio resulta na diminuição da imunoexpressão de miomesina (Hein et al., 1995). Por outro lado, Wang e colaboradores (1999) não encontraram alteração na imunoexpressão de miomesina no coração submetido à sobrecarga de pressão (Wang et al., 1999). Finalmente, a imunoexpressão foi utilizada para avaliar a abundância de miomesina em hamsters distróficos e nenhuma alteração foi encontrada (Eppenberger et al., 1984). Não há estudos demonstrando a regulação da proteína M no coração devido à sobrecarga cardíaca ou outras cardiomiopatias. Na verdade, pelo nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo a demonstrar de forma sistemática a regulação da miomesina, EH-miomesina e proteína M combinadas.

O impacto biológico da repressão da proteína M dependente de T3 na organização e estabilidade da banda M ainda não está claro, mas é válido ressaltar que esse fenômeno precede o conhecido desarranjo miofibrilar observado numa tirotoxicose induzindo hipertrofia cardíaca e também parece

ser específica uma vez que outras proteínas da banda M não são sensíveis ao T3. Foi demonstrado que a proteína M é uma proteína importante para a estabilidade da banda M (Agarkova e Perriard, 2005), portanto é possível visionar que o aumento do inotropismo/cronotropismo, bem conhecidos por ocorrerem no hipertireodismo, junto com a deficiência da banda M, pode resultar num severo desarranjo na estrutura sarcomérica. É interessante notar que o disco Z parece ser preferencialmente o alvo, comparado com a banda M, em outras alterações fisiopatológicas como hipertrofia cardíaca e insuficiência, causada por aumento de sobrecarga por pressão (Knoll et al., 2002; Pyle e Solaro, 2004; Solaro, 2005), o que leva à possibilidade de proteínas ancoraduras no sarcômero serem diferencialmente afetadas sob tais alterações fisiológicas.

Outros estudos utilizando modelos diferentes de plasticidade cardíaca, como hipertensão, diabetes e cardiomiopatias genéticas, são necessários para explorar o papel da proteína M. Ainda está para ser elucidado se alterações nas proteínas sarcoméricas estruturais são a causa ou a consequência do aumento da atividade cardíaca.

5.2 Influência do T3 na expressão de proteínas estruturais da banda M no músculo esquelético de ratos

Devido à ação do T3 no coração e sua influência no músculo esquelético, decidimos avaliar também a expressão das proteínas estruturais da banda M nesse tecido. Dessa forma, demonstramos que o T3 possui diferentes efeitos nos músculos sóleo (predomínio de fibras tipo I) e EDL (predomínio de fibras tipo II). No músculo sóleo, o T3 diminuiu a expressão gênica de miomesina e não alterou a de EH-miomesina. Em contrapartida, com relação à expressão protéica, o T3 aumentou a expressão de EH-miomesina e não alterou a de miomesina. No músculo EDL, T3 diminuiu a expressão gênica e protéica de proteína M, enquanto diminuiu a expressão gênica de miomesina, mas não altera sua expressão protéica.

O T3 é um importante fator para o desenvolvimento normal do músculo esquelético de vertebrados, sendo necessário para formação da massa muscular e diferenciação das características bioquímicas e contráteis desse tecido (Finkelstein et al., 1991). Os HTs modulam reações de consumo de energia (contração e relaxamento) bem como reações de produção de energia, sendo assim, uma alteração dos níveis de HTs pode levar à fraqueza muscular e fadiga (Silvestri et al., 2007).

O T3 é um dos mais potentes reguladores da expressão de isoformas de proteínas miofibrilares. O T3 possui um papel crucial na diferenciação de características bioquímicas e contráteis do músculo esquelético de vertebrados, como a transformação de MHC embrionária ou fetal para as isoformas de MHC adultas (Finkelstein et al., 1991, Gambke et al., 1983). No adulto, o T3 exerce efeitos profundos na expressão de genes codificantes de isoformas específica de MHC e outras proteínas contráteis (Caiozzo et al., 1998; Caiozzo e Haddad, 1996; Haddad et al., 1998; Izumo e Mahdavi, 1988). Tanto a diminuição quanto o excesso de HT regulam a expressão de MHC lenta, reduzindo-a ou aumentando-a, respectivamente (Caiozzo et al., 1992; Ianuzzo et al., 1991; Izumo et al., 1986). A regulação da família MHC é complexa e o mesmo gene MHC pode ser regulado pelo T3 diferentemente, de forma tecido-específica (Izumo et al., 1986). O T3 afeta profundamente as propriedades mecânicas e o perfil de expressão de miosinas no sóleo, mas não no plantar (Caiozzo et al., 1991). Da mesma forma, o T3 também leva a um grande aumento no conteúdo de mitocôndria, enzimas e mioglobina no músculo esquelético lento de ratos comparado com o rápido, sugerindo que o T3 também influencie o perfil metabólico dos músculos esqueléticos numa maneira músculo-específico (dos Santos et al., 2001).

Quase 400 genes do músculo esquelético são responsivos ao T3 em humanos (Clement et al., 2002), sendo a maioria deles envolvida no metabolismo energético e na síntese protéica. No entanto, apesar dos inúmeros estudos sobre a influência do T3 em diversos genes musculares, pouco se sabe sobre sua influência na expressão de proteínas estruturais sarcoméricas, como as proteínas da banda M. Esse é o primeiro estudo a

analisar sistematicamente a expressão de proteínas estruturais sarcoméricas em diferentes tipos musculares.

A influência do T3 foi analisada em dois tipos musculares distintos, o músculo sóleo (predominância de fibras tipo I) e músculo EDL (predominância de fibras tipo II). Já está bem estabelecido o efeito diferencial do T3 nos diferentes tipos de músculos. Um exemplo é o controle da expressão gênica das MHCs pelo T3. Em músculos de contração lenta, como o sóleo, o hipertireoidismo está associado com um aumento da expressão de RNAm da MHC II, enquanto o hipotireoidismo está associado com um aumento nos níveis de RNAm de MHC I. Nos músculos de contração rápida, como o EDL, o hipotireoidismo está associado com aumento de MHC IIa, enquanto o hipertireoidismo diminui a expressão de MHC IIa (Izumo et al., 1986). Fica claro, portanto, a importância em estudar o tratamento do T3 em diferentes tipos musculares.

Agarkova e colaboradores (2004) descreveram a expressão das proteínas estruturais da banda M nos diferentes tipos musculares. A banda M das fibras de contração rápida é caracterizada por uma alta expressão dos níveis de proteína M e da isoforma menor de miomesina, com ausência do fragmento EH, enquanto na banda M de fibras de contração lenta, a proteína M é praticamente ausente e uma parcela significativa da molécula de miomesina maior (EH-miomesina) é expressa (Agarkova et al., 2004). Desse modo, analisamos a expressão de miomesina e EH-miomesina no músculo sóleo e a expressão de miomesina e proteína M no músculo EDL.

No músculo sóleo, o T3 diminuiu a expressão gênica de miomesina com 4 e 8 dias de tratamento, enquanto a expressão gênica de EH-miomesina não foi alterada. Além disso, estudos de imunomarcagem de miomesina e EH-miomesina revelaram que tais proteínas não são diferencialmente expressas nas fibras tipo I e nas fibras tipo II do músculo sóleo, bem como não sofreram alteração significativa na imunomarcagem com o tratamento com T3 (100 x fisiológica) por 2, 4 e 8 dias. No entanto, através da técnica de Western blotting, notou-se que o T3 não alterou a expressão protéica de miomesina ao

longo do tratamento, enquanto que a EH-miomesina apresentou um aumento de expressão com 2 e 4 dias de tratamento com T3 e, após 8 dias, diminuiu, mas para níveis ainda mais altos que o controle. A modulação diferencial de miomesina e EH-miomesina no músculo sóleo, pode se dever à capacidade do T3 em modular a expressão de diversas proteínas no nível traducional ou pós-traducional, onde, apesar da regulação negativa da expressão gênica de miomesina, T3 pode recrutar mecanismos compensatórios, não afetando a expressão protéica da mesma, enquanto que, apesar de T3 não modular a expressão gênica de EH-miomesina, provavelmente mecanismos traducionais ou pós-traducionais regulam sua expressão protéica.

O tratamento com T3, no músculo EDL, foi capaz de diminuir tanto a expressão gênica de miomesina, quanto a de proteína M. Os dados de imunofluorescência demonstraram que a imunomarcação de miomesina também não foi alterada no músculo EDL após o tratamento com T3, entretanto a proteína M foi detectada nas fibras tipo II, enquanto nas fibras tipo I, não há marcação para proteína M, de acordo com estudos anteriores (Agarkova et al., 2004). Além disso, o T3 diminuiu a imunomarcação de proteína M ao longo do tratamento, sendo que com 8 dias de tratamento, os níveis de fluorescência de proteína M estavam indetectáveis. Através da técnica de Western Blotting, pode-se notar que os níveis da proteína miomesina não foram alterados no tratamento com T3, entretanto, o T3 foi capaz de reduzir os níveis protéicos da proteína M com 4 e 8 dias de tratamento. O mesmo mecanismo ocorrido no músculo sóleo, provavelmente se repete no músculo EDL para a proteína miomesina, onde sua expressão gênica é alterada pelo T3, enquanto os níveis protéicos são mantidos. T3 pode regular no nível traducional ou pós-traducional os níveis de miomesina no músculo EDL. Já a proteína M é regulada pelo T3 no nível transcricional, pois a expressão gênica de proteína M é diminuída no tratamento com T3, bem como sua imunomarcação e sua expressão protéica. Como demonstrado em nossos estudos no coração, o gene da proteína M é regulado diretamente pelo T3, o mesmo pode ocorrer no músculo EDL, onde o T3 regule o promotor da proteína M.

Sabe-se que o T3 afeta a expressão de proteínas musculares no nível pós-transcricional, traducional e pós-traducional (Caiozzo e Haddad, 1996), mas os mecanismos subjacentes a esses efeitos continuam obscuros. Diferentes músculos de ratos de ambos os gêneros mostram variações nas respostas ao tratamento com T3. O mecanismo exato envolvido nessas diferenças músculo específico e tipo de fibra específica não são conhecidas, entretanto, foi sugerido que essas diferenças estão no número e tipo de TR (d'Albis et al., 1990), ou no fato que músculos de contração lenta e rápida captam o T3 a diferentes taxas (van Hardeveld e Kassenaar, 1978). Ambas isoformas de TR, TR α e TR β , são expressas no músculo esquelético baseados em análises de RNAm e proteína (Haddad et al., 1998; White e Dauncey, 1999). Análises de modelos knockout demonstraram que ambos os receptores podem, em princípio, induzir os efeitos do T3 (Yu et al., 2000). O TR α , entretanto, parece ser a isoforma predominante a mediar os efeitos do T3 na expressão gênica, o que é mais evidente nos músculos de contração lenta (Johansson et al., 2003; Yu et al., 2000). Isso é sustentado pela falência do agonista seletivo para TR β , o GC-24, a induzir a troca de isoformas de MHC no músculo sóleo (Miyabara et al., 2005). A maior expressão de TR α no músculo lento comparado com o rápido tem sido sugerido como responsável pela diferença da responsividade ao HT (Bahi et al., 2005). No entanto, medidas da capacidade de ligação nuclear do T3 indicam valores idênticos para ambos os tipos musculares (Haddad et al., 1998). As isoformas de TR, bem como seus níveis de expressão, portanto, não parecem ser variáveis relevantes. Todavia, múltiplos co-ativadores e inibidores, bem como a expressão de isoformas de TR não ligantes ao T3, podem modular a transcrição mediada por TR e não pode ser excluído que essa é uma fonte de variação fibra específica na sensibilidade do hormônio (O'Shea e Williams, 2002; Pircher et al., 2005). Muscat (1995) relatou que a captação de T3 ou seu processamento é mais eficiente em células musculares de contração lenta que em fibras musculares de contração rápida (Muscat et al., 1995), uma vez que a conversão de T4 a T3 não ocorre no músculo esquelético de roedores (van Doorn et al., 1983).

Como mencionado anteriormente, as fibras de contração lenta do músculo esquelético de roedores expressam a isoforma EH-miomesina, que foi caracterizada previamente como componente específico do coração na fase embrionária (Agarkova et al., 2000). Essa isoforma é gerada a partir da inserção de um exon denominado EH no meio da molécula. Tal região exonica pode agir como uma molécula elástica similar ao domínio PEVK da proteína sarcomérica elástica titina, que protege o domínio semelhante à imunoglobulina de se desdobrar durante estiramento extremo (Linke et al., 1998).

A expressão de EH-miomesina começa nas fibras de contração lenta dos membros do camundongo vários dias após o nascimento, isto é, quando sua acumulação cessa no músculo cardíaco. Todas as fibras dos músculos dos membros inferiores do camundongo possuem a mesma composição de banda M, expressando quantidades iguais de proteína M e não apresentando expressão de EH-miomesina. No entanto, todas as fibras tipo I do camundongo adulto são EH-miomesina positivas. Portanto, podemos assumir que a composição molecular da banda M em fibras lentas, em particular a expressão de EH-miomesina, não é completamente controlada por mecanismos genéticos levando à co-expressão com certas isoformas de MHC lenta. O progressivo aumento da locomoção dos animais após o nascimento pode estimular o desenvolvimento de estruturas especializadas da banda M nas fibras lentas maduras. O aumento pós-natal da expressão de EH-miomesina é acompanhado pela repressão da proteína M nas mesmas fibras (Agarkova et al., 2004; Carlsson e Thornell, 1987). Como resultado, parece que a proteína M e a EH-miomesina imprimem propriedades exclusivas à banda M. A banda M das fibras rápidas é caracterizada pela expressão de altos níveis de proteína M e miomesina. Tal composição molecular provavelmente melhora o alinhamento e firmeza dos filamentos espessos nas fibras rápidas, caracterizadas pelo rápido desenvolvimento da força (Pask et al., 1994). Portanto, a composição da banda M provavelmente reflete as adaptações do citoesqueleto sarcomérico a um regime funcional especial em diferentes músculos. Um exemplo disso é a taxa muscular de contração e relaxamento, que aumenta com o aumento dos níveis de T3 e, esse aumento de trabalho, pode levar a uma adaptação

muscular na tentativa de suprir as necessidades do tecido. Desse modo, o aumento da expressão protéica de EH-miomesina no músculo sóleo, bem com a queda de expressão de proteína M no músculo EDL pode ser um mecanismo compensatório, para o aumento de demanda muscular estabelecido pelo T3. O músculo extraocular (EOM), que contém predominantemente fibras rápidas, expressa uma alta proporção de EH-miomesina e baixos níveis de proteína M (Andrade et al., 2003). A composição da banda M parece depender mais do nível de atividade ou da taxa de trabalho dos sarcômeros numa fibra específica do que ao tipo da fibra. Uma característica peculiar de todos os músculos murinos que apresentam um regime funcional especial (por exemplo, diafragma, sóleo e EOM) são os baixos níveis de proteína M acompanhados de altos níveis de EH-miomesina. Todos esses músculos estão comprometidos à contratilidade contínua normalmente acompanhada de estiramento (Collins et al., 1975; Gillis, 1996; Walmsley et al., 1978). É conhecido que tal stress (normalmente denominado contração excêntrica) pode levar ao dano das estruturas contráteis (Allen, 2001). Estudos revelam que o rompimento das pontes da banda M é um dos sinais mais proeminentes de dano após contração excêntrica (Macpherson et al., 1996; Ogilvie et al., 1988). No entanto, a hipótese sobre a importância da EH-miomesina e da proteína M para as propriedades mecânicas da banda M ainda tem de ser testada.

6 CONCLUSÃO

Pode-se concluir com o presente estudo:

1. T3 é um potente regulador da proteína sarcomérica estrutural, proteína M, no coração de ratos.
2. Além disso, T3 age diretamente no promotor do gene da proteína M, reprimindo sua expressão.
3. A expressão gênica de miomesina diminui durante longa exposição e a altas doses de T3 no coração.
4. No músculo esquelético, T3 foi capaz de aumentar a expressão protéica de EH-miomesina no músculo sóleo e diminuir a expressão de proteína M no EDL.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Agarkova I, Auerbach D, Ehler E, Perriard JC. A novel marker for vertebrate embryonic heart, the EH-myomesin isoform. *J Biol Chem*. 2000;275(14):10256-64.

Agarkova I, Perriard JC. The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere. *Trends Cell Biol*. 2005;15(9):477- 85.

Agarkova I, Schoenauer R, Ehler E, Carlsson L, Carlsson E, Thornell LE, et al. The molecular composition of the sarcomeric M-band correlates with muscle fiber type. *Eur J Cell Biol*. 2004;83(5):193-204.

Allen DG. Eccentric muscle damage: mechanisms of early reduction of force. *Acta Physiol Scand*. 2001;171(3):311-19.

Andrade FH, Merriam AP, Guo W, Cheng G, McMullen CA, Hayess K, et al. Paradoxical absence of M lines and downregulation of creatine kinase in mouse extraocular muscle. *J Appl Physiol*. 2003;95(2):692-99.

Au Y. The muscle ultrastructure: a structural perspective of the sarcomere. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(24):3016-33.

Bahi L, Garnier A, Fortin D, Serrurier B, Veksler V, Bigard AX, et al. Differential effects of thyroid hormones on energy metabolism of rat slow- and fast-twitch muscles. *J Cell Physiol*. 2005;203(3):589-98.

Bahler M, Wallimann T, Eppenberger HM. Myofibrillar M-band proteins represent constituents of native thick filaments, frayed filaments and bare zone assemblages. *J Muscle Res Cell Motil*. 1985;6(6):783-800.

Bantle S, Keller S, Haussmann I, Auerbach D, Perriard E, Muhlebach S, et al. Tissue-specific isoforms of chicken myomesin are generated by alternative splicing. *J Biol Chem*. 1996;271(32):19042-52.

*De acordo com :

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2004 May 06].

Barreto-Chaves ML, Heimann A, Krieger JE. Stimulatory effect of dexamethasone on angiotensin-converting enzyme in neonatal rat cardiac myocytes. *Braz J Med Biol Res = Rev Bras Pesq Med Biol.* 2000;33(6):661-64.

Barrett EJ, Gelfand RA. The in vivo study of cardiac and skeletal muscle protein turnover. *Diabetes Metab Rev.* 1989;5(2):133-48.

Bassett JH, Harvey CB, Williams GR. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Mol Cell Endocrinol.* 2003;213(1):1-11.

Beato M, Herrlich P, Schutz G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell.* 1995;83(6):851-57.

Bengel FM, Lehnert J, Ibrahim T, Klein C, Bulow HP, Nekolla SG, et al. Cardiac oxidative metabolism, function, and metabolic performance in mild hyperthyroidism: a noninvasive study using positron emission tomography and magnetic resonance imaging. *Thyroid.* 2003;13(5):471-77.

Biondi B, Palmieri EA, Lombardi G, Fazio S. Effects of thyroid hormone on cardiac function: the relative importance of heart rate, loading conditions, and myocardial contractility in the regulation of cardiac performance in human hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metabol.* 2002;87(3):968-74.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.

Caiozzo VJ, Baker MJ, Baldwin KM. Novel transitions in MHC isoforms: separate and combined effects of thyroid hormone and mechanical unloading. *J Appl Physiol.* 1998;85(6):2237-48.

Caiozzo VJ, Haddad F. Thyroid hormone: modulation of muscle structure, function, and adaptive responses to mechanical loading. *Exerc Sport Sci Rev.* 1996;24:321-61.

Caiozzo VJ, Herrick RE, Baldwin KM. Influence of hyperthyroidism on maximal shortening velocity and myosin isoform distribution in skeletal muscles. *Am J Physiol.* 1991;261(2 Pt 1):C285-95.

Caiozzo VJ, Herrick RE, Baldwin KM. Response of slow and fast muscle to hypothyroidism: maximal shortening velocity and myosin isoforms. *Am J Physiol.* 1992;263(1 Pt 1):C86-94.

Canaris GJ, Manowitz NR, Mayor G, Ridgway EC. The Colorado thyroid disease prevalence study. *Arch Intern Med.* 2000;160(4):526-34.

Carlsson E, Grove BK, Wallimann T, Eppenberger HM, Thornell LE. Myofibrillar M-band proteins in rat skeletal muscles during development. *Histochemistry.* 1990;95(1):27-35.

Carlsson E, Thornell LE. Diversification of the myofibrillar M-band in rat skeletal muscle during postnatal development. *Cell Tissue Res.* 1987;248(1):169-80.

Carr AN, Kranias EG. Thyroid hormone regulation of calcium cycling proteins. *Thyroid.* 2002;12(6):453-57.

Chassande O, Fraichard A, Gauthier K, Flamant F, Legrand C, Savatier P, et al. Identification of transcripts initiated from an internal promoter in the c-erbA alpha locus that encode inhibitors of retinoic acid receptor-alpha and triiodothyronine receptor activities. *Mol Endocrin.* (Baltimore, Md. 1997;11(9):1278-90.

Ching GW, Franklyn JA, Stallard TJ, Daykin J, Sheppard MC, Gammage MD. Cardiac hypertrophy as a result of long-term thyroxine therapy and thyrotoxicosis. *Heart.* 1996;75(4):363-68.

Clement K, Viguerie N, Diehn M, Alizadeh A, Barbe P, Thalamas C, et al. In vivo regulation of human skeletal muscle gene expression by thyroid hormone. *Genome Res.* 2002;12(2):281-91.

Coleman PS, Parmacek MS, Lesch M, Samarel AM. Protein synthesis and degradation during regression of thyroxine-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 1989;21(9):911-25.

Collins CC, O'Meara D, Scott AB. Muscle tension during unrestrained human eye movements. *J Physiol.* 1975;245(2):351-69.

d'Albis A, Chanoine C, Janmot C, Mira JC, Couteaux R. Muscle-specific response to thyroid hormone of myosin isoform transitions during rat postnatal development. *Eur J Biochem.* 1990;193(1):155-61.

Danzi S, Dubon P, Klein I. Effect of serum triiodothyronine on regulation of cardiac gene expression: role of histone acetylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(4):H1506-11.

Danzi S, Klein I. Thyroid hormone and blood pressure regulation. *Curr Hypertens Rep*. 2003;5(6):513-20.

Danzi S, Klein I. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *Minerva Endocrinol*. 2004;29(3):139-50.

Davis PJ, Davis FB. Nongenomic actions of thyroid hormone on the heart. *Thyroid*. 2002;12(6):459-66.

Davis PJ, Davis FB, Lawrence WD. Thyroid hormone regulation of membrane Ca^{2+} -ATPase activity. *Endocri Res*. 1989;15(4):651-82.

Davis PJ, Shih A, Lin HY, Martino LJ, Davis FB. Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR. *J Biol Chem*. 2000;275(48):38032-39.

Dieckman LJ, Solaro RJ. Effect of thyroid status on thin-filament Ca^{2+} regulation and expression of troponin I in perinatal and adult rat hearts. *Circ Res*. 1990;67(2):344-51.

Diez D, Grijota-Martinez C, Agretti P, De Marco G, Tonacchera M, Pinchera A, et al. Thyroid hormone action in the adult brain: Gene expression profiling of the effects of single and multiple doses of Triiodo-L-thyronine in the rat striatum. *Endocrinology*. 2008;149(8):3989-4000

Dillmann WH. Biochemical basis of thyroid hormone action in the heart. *Am J Med*. 1990;88(6):626-30.

Diniz GP, Carneiro-Ramos MS, Barreto-Chaves ML. Angiotensin type 1 (AT1) and type 2 (AT2) receptors mediate the increase in TGF-beta1 in thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy. *Pflugers Arch*. 2007;454(1):75-81.

Dorn GW, 2nd, Force T. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Investig*. 2005;115(3):527-37.

dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, et al. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev.* 2003;83(2):433-73.

dos Santos RA, Giannocco G, Nunes MT. Thyroid hormone stimulates myoglobin expression in soleus and extensorum digitalis longus muscles of rats: concomitant alterations in the activities of Krebs cycle oxidative enzymes. *Thyroid.* 2001;11(6):545-50.

Ehler E, Rothen BM, Hammerle SP, Komiyama M, Perriard JC. Myofibrillogenesis in the developing chicken heart: assembly of Z-disk, M-line and the thick filaments. *J Cell Sci.* 1999;112 (Pt 10):1529-39.

Eppenberger ME, Eppenberger HM, Kaplan NO. Evolution of creatine kinase. *Nature.* 1967;214(85):239-41.

Eppenberger ME, Schoenenberger R, Eppenberger HM. Myofibrillar M-line structure in normal and dystrophic hamster muscle. *Muscle Nerve.* 1984;7(4):304-11.

Everts ME. Effects of thyroid hormones on contractility and cation transport in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* 1996;156(3):325-33.

Everts ME, van Hardeveld C, Ter Keurs HE, Kassenaar AA. Force development and metabolism in perfused skeletal muscle of euthyroid and hyperthyroid rats. *Horm Metab Res Hormon- Stoffwechselforschung.* 1983;15(8):388-93.

Fazio S, Palmieri EA, Lombardi G, Biondi B. Effects of thyroid hormone on the cardiovascular system. *Recent Prog Horm Res.* 2004;59:31-50.

Fernandez V, Tapia G, Varela P, Gaete L, Vera G, Mora C, et al. Causal role of oxidative stress in liver preconditioning by thyroid hormone in rats. *Free Radic Biol Med.* 2008;44(9):1724-31.

Ferreira PJ, L'Abbate C, Abrahamsohn PA, Gouveia CA, Moriscot AS. Temporal and topographic ultrastructural alterations of rat heart myofibrils caused by thyroid hormone. *Microsc Res Tech.* 2003;62(5):451-59.

Finkelstein DI, Andrianakis P, Luff AR, Walker D. Effects of thyroidectomy on development of skeletal muscle in fetal sheep. *Am J Physiol.* 1991;261(5 Pt 2):R1300-06.

Fitts RH, Brimmer CJ, Troup JP, Unsworth BR. Contractile and fatigue properties of thyrotoxic rat skeletal muscle. *Muscle Nerve*. 1984;7(6):470-77.

Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol*. 2003;65:45-79.

Gambke B, Lyons GE, Haselgrove J, Kelly AM, Rubinstein NA. Thyroidal and neural control of myosin transitions during development of rat fast and slow muscles. *FEBS Lett*. 1983;156(2):335-39.

Garlick PJ, Burns HJ, Palmer RM. Regulation of muscle protein turnover: possible implications for modifying the responses to trauma and nutrient intake. *Bailliere's Clin Gastroenterol*. 1988;2(4):915-40.

Gillis JM. The mdx mouse: why diaphragm? *Muscle Nerve*. 1996;19(9):1230.

Granzier HL, Labeit S. The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ Res*. 2004;94(3):284-95.

Grove BK, Cerny L, Perriard JC, Eppenberger HM. Myomesin and M-protein: expression of two M-band proteins in pectoral muscle and heart during development. *J Cell Biol*. 1985;101(4):1413-21.

Grove BK, Cerny L, Perriard JC, Eppenberger HM, Thornell LE. Fiber type-specific distribution of M-band proteins in chicken muscle. *J Histochem Cytochem*. 1989;37(4):447-54.

Grove BK, Kurer V, Lehner C, Doetschman TC, Perriard JC, Eppenberger HM. A new 185,000-dalton skeletal muscle protein detected by monoclonal antibodies. *J Cell Biol*. 1984;98(2):518-24.

Gunning P, Hardeman E. Multiple mechanisms regulate muscle fiber diversity. *Faseb J*. 1991;5(15):3064-70.

Haddad F, Arnold C, Zeng M, Baldwin K. Interaction of thyroid state and denervation on skeletal myosin heavy chain expression. *Muscle Nerve*. 1997;20(12):1487-96.

Haddad F, Qin AX, McCue SA, Baldwin KM. Thyroid receptor plasticity in striated muscle types: effects of altered thyroid state. *Am J Physiol*. 1998;274(6 Pt 1):E1018-26.

Hausman GJ, Watson R. Regulation of fetal muscle development by thyroxine. *Acta Anat (Basel)*. 1994;149(1):21-30.

Hein S, Scheffold T, Schaper J. Ischemia induces early changes to cytoskeletal and contractile proteins in diseased human myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1995;110(1):89-98.

Hennemann G, Docter R, Friesema EC, de Jong M, Krenning EP, Visser TJ. Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. *Endocr Rev*. 2001;22(4):451-76.

Hodin RA, Lazar MA, Chin WW. Differential and tissue-specific regulation of the multiple rat c-erbA messenger RNA species by thyroid hormone. *J Clin Invest*. 1990;85(1):101-05.

Hodin RA, Lazar MA, Wintman BI, Darling DS, Koenig RJ, Larsen PR, et al. Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science*. 1989;244(4900):76-79.

Holmes KC, Geeves MA. The structural basis of muscle contraction. *Philos Trans R Soc Lond*. 2000;355(1396):419-31.

Hudecova S, Vadaszova A, Soukup T, Krizanova O. Effect of thyroid hormones on the gene expression of calcium transport systems in rat muscles. *Life Sci*. 2004;75(8):923-31.

Hughes SM, Taylor JM, Tapscott SJ, Gurley CM, Carter WJ, Peterson CA. Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. *Development*. 1993;118(4):1137-47.

Huxley AF, Niedergerke R. Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature*. 1954;173(4412):971-73.

Huxley H, Hanson J. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature*. 1954;173(4412):973-76.

Ianuzzo CD, Hamilton N, Li B. Competitive control of myosin expression: hypertrophy vs. hyperthyroidism. *J Appl Physiol*. 1991;70(5):2328-30.

Izumo S, Mahdavi V. Thyroid hormone receptor alpha isoforms generated by alternative splicing differentially activate myosin HC gene transcription. *Nature*. 1988;334(6182):539-42.

Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. All members of the MHC multigene family respond to thyroid hormone in a highly tissue-specific manner. *Science*. 1986;231(4738):597-600.

Johansson C, Lunde PK, Gothe S, Lannergren J, Westerblad H. Isometric force and endurance in skeletal muscle of mice devoid of all known thyroid hormone receptors. *J Physiol*. 2003;547(Pt 3):789-96.

Kahaly GJ, Dillmann WH. Thyroid hormone action in the heart. *Endocr Rev*. 2005;26(5):704-28.

Katz A, Bogardus C. Insulin-mediated increase in glucose 1,6-bisphosphate is attenuated in skeletal muscle of insulin-resistant man. *Metab Clin Exp*. 1990;39(12):1300-04.

Katz MG, Cohen AJ, Schwalb H, Segal J, Merin G, Schachner A. Interaction of thyroid hormone and heparin in postischemic myocardial recovery. *Ann Thorac Surg*. 1995;60(5):1215-18.

Kavok NS, Krasilnikova OA, Babenko NA. Thyroxine signal transduction in liver cells involves phospholipase C and phospholipase D activation. Genomic independent action of thyroid hormone. *BMC Cell Biol*. 2001;2:5.

Keller A, Demeurie J, Merkulova T, Geraud G, Cywiner-Golenzer C, Lucas M, et al. Fibre-type distribution and subcellular localisation of alpha and beta enolase in mouse striated muscle. *Biol Cell*. 2000;92(7):527-35.

Kiss E, Brittsan AG, Edes I, Grupp IL, Grupp G, Kranias EG. Thyroid hormone-induced alterations in phospholamban-deficient mouse hearts. *Circ Res*. 1998;83(6):608-13.

Klein I, Danzi S. Thyroid disease and the heart. *Circulation*. 2007;116(15):1725-35.

Klein I, Hong C. Effects of thyroid hormone on cardiac size and myosin content of the heterotopically transplanted rat heart. *J Clin Invest*. 1986;77(5):1694-98.

Klein I, Ojamaa K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N Engl J Med*. 2001;344(7):501-09.

Knoll R, Hoshijima M, Hoffman HM, Person V, Lorenzen-Schmidt I, Bang ML, et al. The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell*. 2002;111(7):943-55.

Kohrle J. The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *Cell Mol Life Sci*. 2000;57(13-14):1853-63.

Kohrle J. The selenoenzyme family of deiodinase isozymes controls local thyroid hormone availability. *Rev Endocr Metab Disord*. 2000;1(1-2):49-58.

Kurowski TT, Czerwinski SM. Glucocorticoid modulation of cardiac mass and protein. *Med Sci Sports Exerc*. 1990;22(3):312-15.

Labeit S, Kolmerer B. Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science*. 1995;270(5234):293-96.

Lange S, Auerbach D, McLoughlin P, Perriard E, Schafer BW, Perriard JC, et al. Subcellular targeting of metabolic enzymes to titin in heart muscle may be mediated by DRAL/FHL-2. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 24):4925-36.

Larsson L, Li X, Teresi A, Salviati G. Effects of thyroid hormone on fast- and slow-twitch skeletal muscles in young and old rats. *J Physiol*. 1994;481 (Pt 1):149-61.

Larsson L, Muller U, Li X, Schiaffino S. Thyroid hormone regulation of myosin heavy chain isoform composition in young and old rats, with special reference to IIX myosin. *Acta Physiol Scand*. 1995;153(2):109-16.

Larsson L, Yu F. Gender-related differences in the regulatory influence of thyroid hormone on the expression of myosin isoforms in young and old rats. *Acta Physiol Scand*. 1997;159(1):81-89.

Lazar MA. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr Rev*. 1993;14(2):184-93.

Lazar MA, Chin WW. Nuclear thyroid hormone receptors. *J Clin Invest*. 1990;86(6):1777-82.

Li X, Larsson L. Contractility and myosin isoform compositions of skeletal muscles and muscle cells from rats treated with thyroid hormone for 0, 4 and 8 weeks. *J Muscle Res Cell Motil.* 1997;18(3):335-44.

Linke WA, Ivemeyer M, Mundel P, Stockmeier MR, Kolmerer B. Nature of PEVK-titin elasticity in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(14):8052-57.

Liu W, Saint DA. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal Biochem.* 2002;302(1):52-59.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.).* 2001;25(4):402-08.

Lompre AM, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *J Biol Chem.* 1984;259(10):6437-46.

Lynch MA, Andrews JF, Moore RE. Administration of low doses of TSH result in a rapid increase in the metabolic rate of young lambs. *Horm Metab Res Hormon- Stoffwechselforschung.* 1985;17(3):136-40.

Macpherson PC, Schork MA, Faulkner JA. Contraction-induced injury to single fiber segments from fast and slow muscles of rats by single stretches. *Am J Physiol.* 1996;271(5 Pt 1):C1438-46.

Maggs AM, Taylor-Harris P, Peckham M, Hughes SM. Evidence for differential post-translational modifications of slow myosin heavy chain during murine skeletal muscle development. *J Muscle Res Cell Motil.* 2000;21(2):101-13.

Maruyama K, Kimura S, Ohashi K, Kuwano Y. Connectin, an elastic protein of muscle. Identification of "titin" with connectin. *J Biochem.* 1981;89(3):701-09.

Masaki T, Takaiti O. M-protein. *J Biochem (Tokyo).* 1974;75(2):367-80.

Mintz G, Pizzarello R, Klein I. Enhanced left ventricular diastolic function in hyperthyroidism: noninvasive assessment and response to treatment. *The J Clin Endocrinol Metabol.* 1991;73(1):146-50.

Miyabara EH, Aoki MS, Soares AG, Saltao RM, Vilicev CM, Passarelli M, et al. Thyroid hormone receptor-beta-selective agonist GC-24 spares skeletal muscle type I to II fiber shift. *Cell Tissue Res.* 2005;321(2):233-41.

Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell.* 1998;93(2):215-28.

Morkin E. Control of cardiac myosin heavy chain gene expression. *Microsc Res Tech.* 2000;50(6):522-31.

Muller A, Zuidwijk MJ, Simonides WS, van Hardeveld C. Modulation of SERCA2 expression by thyroid hormone and norepinephrine in cardiocytes: role of contractility. *Am J Physiol.* 1997;272(4 Pt 2):H1876-85.

Muller MJ, Seitz HJ. Thyroid hormone action on intermediary metabolism. Part III. Protein metabolism in hyper- and hypothyroidism. *Klin Wochenschr.* 1984;62(3):97-102.

Muscat GE, Downes M, Dowhan DH. Regulation of vertebrate muscle differentiation by thyroid hormone: the role of the myoD gene family. *Bioessays.* 1995;17(3):211-18.

Nave R, Furst DO, Weber K. Visualization of the polarity of isolated titin molecules: a single globular head on a long thin rod as the M band anchoring domain? *J Cell Biol.* 1989;109(5):2177-87.

O'Shea PJ, Williams GR. Insight into the physiological actions of thyroid hormone receptors from genetically modified mice. *J Endocrinol.* 2002;175(3):553-70.

Obermann WM, Gautel M, Steiner F, van der Ven PF, Weber K, Furst DO. The structure of the sarcomeric M band: localization of defined domains of myomesin, M-protein, and the 250-kD carboxy-terminal region of titin by immunoelectron microscopy. *J Cell Biol.* 1996;134(6):1441-53.

Ogilvie RW, Armstrong RB, Baird KE, Bottoms CL. Lesions in the rat soleus muscle following eccentrically biased exercise. *Am J Anat.* 1988;182(4):335-46.

Oppenheimer JH, Schwartz HL, Mariash CN, Kinlaw WB, Wong NC, Freaque HC. Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level. *Endocr Rev.* 1987;8(3):288-308.

Otey CA, Carpen O. Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2004;58:104–11

Pask HT, Jones KL, Luther PK, Squire JM. M-band structure, M-bridge interactions and contraction speed in vertebrate cardiac muscles. *J Muscle Res Cell Motil*. 1994;15(6):633-45.

Phillips GN, Jr., Fillers JP, Cohen C. Tropomyosin crystal structure and muscle regulation. *J Mol Biol*. 1986;192(1):111-31.

Pircher P, Chomez P, Yu F, Vennstrom B, Larsson L. Aberrant expression of myosin isoforms in skeletal muscles from mice lacking the rev-erbAalpha orphan receptor gene. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288(2):R482-90.

Plateroti M, Gauthier K, Domon-Dell C, Freund JN, Samarut J, Chassande O. Functional interference between thyroid hormone receptor alpha (TRalpha) and natural truncated TRDeltaalpha isoforms in the control of intestine development. *Mol Cell Biol*. 2001;21(14):4761-72.

Polikar R, Burger AG, Scherrer U, Nicod P. The thyroid and the heart. *Circulation*. 1993;87(5):1435-41.

Portman MA. Thyroid hormone regulation of heart metabolism. *Thyroid*. 2008;18(2):217-25.

Pyle WG, Solaro RJ. At the crossroads of myocardial signaling: the role of Z-discs in intracellular signaling and cardiac function. *Circ Res*. 2004;94(3):296-305.

Ribeiro RC, Apriletti JW, Wagner RL, West BL, Feng W, Huber R, et al. Mechanisms of thyroid hormone action: insights from X-ray crystallographic and functional studies. *Recent Prog Horm Res*. 1998;53:351-92; discussion 392-54.

Robson RM, Goll DE, Arakawa N, Stromer MH. Purification and properties of alpha-actinin from rabbit skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta*. 1970;200:296–318

Rohrer D, Dillmann WH. Thyroid hormone markedly increases the mRNA coding for sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in the rat heart. *J Biol Chem*. 1988;263(15):6941-44.

Rooyackers OE, Nair KS. Hormonal regulation of human muscle protein metabolism. *Annu Rev Nutr*. 1997;17:457-85.

Schiaffino S, Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev*. 1996;76(2):371-423.

Schmidt BM, Martin N, Georgens AC, Tillmann HC, Feuring M, Christ M, et al. Nongenomic cardiovascular effects of triiodothyronine in euthyroid male volunteers. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(4):1681-86.

Silvestri E, Burrone L, de Lange P, Lombardi A, Farina P, Chambery A, et al. Thyroid-state influence on protein-expression profile of rat skeletal muscle. *J Proteome Res*. 2007;6(8):3187-96.

Simonides WS, van Hardeveld C. Thyroid hormone as a determinant of metabolic and contractile phenotype of skeletal muscle. *Thyroid*. 2008;18(2):205-16.

Solaro RJ. Remote control of A-band cardiac thin filaments by the I-Z-I protein network of cardiac sarcomeres. *Trends Cardiovasc Med*. 2005;15(4):148-52.

Stockholm D, Herasse M, Marchand S, Praud C, Roudaut C, Richard I, et al. Calpain 3 mRNA expression in mice after denervation and during muscle regeneration. *Am J Physiol*. 2001;280(6):C1561-69.

Stolz M, Kraft T, Wallimann T. The isoenzyme-diagnostic regions of muscle-type creatine kinase, the M-260 and M-300 box, are not responsible for its binding to the myofibrillar M-band. *Eur J Cell Biol*. 1998;77(1):1-9.

Stromer MH, Goll DE. Studies on purified α -actinin II. Electron microscopic studies on the competitive binding of α -actinin and tropomyosin to Z-line extracted myofibrils. *J Mol Biol*. 1972;67:489-94.

Sugden PH, Clerk A. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med*. 1998;76(11):725-46.

Syslak PH, Nathaniel EJ, Novak C, Burton L. Fetal alcohol effects on the postnatal development of the rat myocardium: an ultrastructural and morphometric analysis. *Exp Mol Pathol*. 1994;60(3):158-72.

Takeuchi K, Minakawa M, Otaki M, Odagiri S, Itoh K, Murakami A, et al. Hyperthyroidism causes mechanical insufficiency of myocardium with possibly increased SR Ca²⁺-ATPase activity. *Jpn J Physiol*. 2003;53(6):411-16.

Trinick J, Knight P, Whiting A. Purification and properties of native titin. *J Mol Biol*. 1984;180(2):331-56.

Trost SU, Swanson E, Gloss B, Wang-Iverson DB, Zhang H, Volodarsky T, et al. The thyroid hormone receptor-beta-selective agonist GC-1 differentially affects plasma lipids and cardiac activity. *Endocrinology*. 2000;141(9):3057-64.

Vadaszova A, Zacharova G, Machacova K, Jirmanova I, Soukup T. Influence of thyroid status on the differentiation of slow and fast muscle phenotypes. *Physiol Res*. 2004;53 Suppl 1:S57-61.

van den Beld AW, Visser TJ, Feelders RA, Grobbee DE, Lamberts SW. Thyroid hormone concentrations, disease, physical function, and mortality in elderly men. *J Clin Endocrinol Metabolism*. 2005;90(12):6403-09.

van Doorn J, van der Heide D, Roelfsema F. Sources and quantity of 3,5,3'-triiodothyronine in several tissues of the rat. *J Clin Invest*. 1983;72(5):1778-92.

van Hardeveld C, Kassenaar AA. Thyroid hormone uptake and T4 derived T3 formation in different skeletal muscle types of normal and hyperthyroid rats. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1978;88(2):306-20.

Vinkemeier U, Obermann W, Weber K, Furst DO. The globular head domain of titin extends into the center of the sarcomeric M band. cDNA cloning, epitope mapping and immunoelectron microscopy of two titin-associated proteins. *J Cell Sci*. 1993;106 (Pt 1):319-30.

Walmsley B, Hodgson JA, Burke RE. Forces produced by medial gastrocnemius and soleus muscles during locomotion in freely moving cats. *J Neurophysiol*. 1978;41(5):1203-16.

Wang SM, Lo MC, Shang C, Kao SC, Tseng YZ. Role of M-line proteins in sarcomeric titin assembly during cardiac myofibrillogenesis. *J Cell Biochem*. 1998;71(1):82-95.

Wang X, Li F, Campbell SE, Gerdes AM. Chronic pressure overload cardiac hypertrophy and failure in guinea pigs: II. Cytoskeletal remodeling. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31(2):319-31.

White P, Dauncey MJ. Differential expression of thyroid hormone receptor isoforms is strikingly related to cardiac and skeletal muscle phenotype during postnatal development. *J Mol Endocrinol.* 1999;23(2):241-54.

Whiting A, Wardale J, Trinick J. Does titin regulate the length of muscle thick filaments? *J Mol Biol.* 1989;205(1):263-68.

Williams GR. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Mol Cell Biol.* 2000;20(22):8329-42.

Winegrad S, Wisnewsky C, Schwartz K. Effect of thyroid hormone on the accumulation of mRNA for skeletal and cardiac alpha-actin in hearts from normal and hypophysectomized rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(7):2456-60.

Wrutniak-Cabello C, Casas F, Cabello G. Thyroid hormone action in mitochondria. *J Mol Endocrinol.* 2001;26(1):67-77.

Wrutniak C, Cabello G. Influence of tri-iodothyronine or lipid administration on the response of the pituitary-thyroid axis to exposure to cold in the newborn lamb. *J Endocrinol.* 1989;121(2):361-65.

Wu Y, Koenig RJ. Gene regulation by thyroid hormone. *Trends Endocrinol Metab.* 2000;11(6):207-11.

Yaffe D, Saxel O. A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation. *Differentiation.* 1977;7(3):159-66.

Yamashita A, Maeda K, Maeda Y. Crystal structure of CapZ: structural basis for actin filament barbed end capping. *EMBO J.* 2003;22(7):1529-38.

Yang YG, Obinata T, Shimada Y. Developmental relationship of myosin binding proteins (myomesin, connectin and C-protein) to myosin in chicken somites as studied by immunofluorescence microscopy. *Cell Struct Funct.* 2000;25(3):177-85.

Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev.* 2001;81(3):1097-42.

Yen PM, Ando S, Feng X, Liu Y, Maruvada P, Xia X. Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;246(1-2):121-27.

Yu F, Degens H, Li X, Larsson L. Gender- and age-related differences in the regulatory influence of thyroid hormone on the contractility and myosin composition of single rat soleus muscle fibres. *Pflugers Arch.* 1998;437(1):21-30.

Yu F, Gothe S, Wikstrom L, Forrest D, Vennstrom B, Larsson L. Effects of thyroid hormone receptor gene disruption on myosin isoform expression in mouse skeletal muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;278(6):R1545-54.

Zarain-Herzberg A, Marques J, Sukovich D, Periasamy M. Thyroid hormone receptor modulates the expression of the rabbit cardiac sarco (endo) plasmic reticulum Ca(2+)-ATPase gene. *J Biol Chem.* 1994;269(2):1460-67.

Zhang CY, Kim S, Harney JW, Larsen PR. Further characterization of thyroid hormone response elements in the human type 1 iodothyronine deiodinase gene. *Endocrinology.* 1998;139(3):1156-63.

Zurcher RM, Horber FF, Grunig BE, Frey FJ. Effect of thyroid dysfunction on thigh muscle efficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989;69(5):1082-86.