Márcia Silva Queiroz

**Efeito do hormônio tireoidiano sobre a expressão do mRNA
da proteína desacopladora de prótons 3 (UCP3) em
miocárdio e músculo esquelético de ratos**

Tese apresentada ao Departamento de
Clínica Médica da Faculdade de Medicina
da Universidade São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Daniel Giannella Neto

São Paulo

2005

André

A mais bela das artes é amar as pessoas

(Van Googh)

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Daniel Giannella Neto pela grande oportunidade de tê-lo como orientador, amenizando dificuldades e valorizando esforços.

Ao Dr. Faramarz Ismail-Beigi por ensinar-me o valor da ciência básica.

À Yvonne Shao pela amizade, carinho e imensa disposição em ensinar.

Quanto mais estudamos, mais descobrimos a nossa ignorância.

(Shelley)

SUMÁRIO

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
4 RESULTADOS	23
5 DISCUSSÃO	37
6 CONCLUSÕES	47
7 REFERÊNCIAS	48

RESUMO

Queiroz MS. Efeito do hormônio tireoidiano sobre a expressão do mRNA da proteína desacopladora de prótons 3 (UCP3) em miocárdio e músculo esquelético de ratos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 74p.

INTRODUÇÃO: As proteínas desacopladoras de prótons (UCPs: uncoupling proteins) pertencem à família dos transportadores mitocondriais H^+ /ácidos graxos e têm distribuição diferenciada nos tecidos. Sabe-se que a UCP1 é responsável pela termogênese, mas o exato papel fisiológico da UCP2 e UCP3 ainda não está completamente estabelecido. Os hormônios tireoideanos (T_3 e T_4) estimulam a expressão da UCP3 em músculo cardíaco e esquelético, no entanto o mecanismo pelo qual exercem esse efeito não é conhecido. Este projeto visa avaliar se as alterações na expressão gênica da UCP3 são relacionadas a efeito primário do T_3 ou são secundárias à estimulação do sistema renina-angiotensina ou do sistema β -adrenérgico. **MÉTODOS:** Para a realização do estudo, criou-se um modelo animal de hipertireodismo, em ratos machos Sprague-Dawley, através de 3 administrações de 100 μ g/100 g peso corpóreo de LT_3 , em dias alternados, associado ou não à captopril (1 mg/100 g de peso corpóreo), β -bloqueador propranolol (1 mg/100g

de peso corpóreo) ou β 2-agonista clenbuterol (0,04 mg/100 g de peso corpóreo). A expressão do mRNA da UCP3 foi semi-quantitativamente determinada por Northern blot em amostras de músculo ventricular cardíaco e músculo esquelético (gastrocnemius e soleus). A expressão da proteína UCP3 foi avaliada por Western blot em músculo esquelético (quadríceps). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de densitometria óptica. RESULTADOS: O tratamento com LT_3 resultou em aumento estatisticamente significativo do conteúdo de mRNA da UCP3 em miocárdio (~3 vezes) e músculo esquelético (~8 vezes) ($p < 0,05$) e esse efeito não foi alterado por nenhuma das medicações usadas concomitantemente. Não houve efeito sinérgico ou aditivo sobre a expressão do mRNA da UCP3 quando o LT_3 foi administrado conjuntamente ao β 2-agonista. O aumento na quantidade de mRNA da UCP3, em músculo esquelético, foi associado à aumento na expressão da proteína UCP3. CONCLUSÃO: O efeito do LT_3 sobre a expressão da UCP3, nos tecidos analisados, não são dependentes da angiotensina II, nem do sistema β -adrenérgico, provavelmente refletindo uma ação direta do LT_3 sobre a expressão do gene UCP3.

SUMMARY

Queiroz MS. Effect of thyroid hormone on UCP-3 mRNA expression in rat heart and skeletal muscle [thesis]. São Paulo: School of Medicine, São Paulo University; 2005. 74p.

Thyroid hormones (T_3 and T_4) stimulate UCP-3 expression in skeletal muscle. Here, we examined whether thyroid hormone-induced changes in UCP-3 mRNA expression are related to direct effects of T_3 or reflect secondary effects of the hormone through stimulation of renin-angiotensin or β -adrenergic systems. Hyperthyroidism was produced by three injections of 100 μ g T_3 /100 g body weight on alternate days with or without concomitant treatment with either captopril (an ACE inhibitor), propranolol (a β -blocker) or clenbuterol (a β_2 -agonist). The relative abundance of UCP-3 mRNA was measured in ventricular myocardium and skeletal muscle (gastrocnemius and soleus). T_3 resulted in a significant increase in the relative abundance of UCP-3 in heart and skeletal muscle ($P < 0.05$), and the effect was not altered by captopril or propranolol; the inhibitors alone had no effect on UCP-3 mRNA content. There was no synergistic or additive effect of T_3 and clenbuterol on UCP-3 mRNA expression in skeletal muscle. Increased UCP-3 mRNA

levels were associated with increased UCP-3 protein expression in skeletal muscle. We conclude that the effect of T_3 on UCP-3 expression in cardiac and skeletal muscle is not dependent on either angiotensin II or the β -adrenergic system and probably reflects a direct action of the hormone on UCP-3 gene expression.

INTRODUÇÃO

Os hormônios tireoideanos exercem uma gama de efeitos sobre o desenvolvimento, crescimento e metabolismo celular. As manifestações clínicas do excesso de hormônio tireoideano e sua deficiência são exemplos dramáticos do espectro de ação desse hormônio, com manifestações em diversos tecidos e sistemas¹. As alterações cardiovasculares, no hipertireoidismo, são amplamente reconhecidas e reprodutíveis^{2 3}, levando alguns autores, a princípio, a postularem erroneamente que a doença tireoidiana teria sua origem no coração. Atualmente, ainda não é possível explicar todas as manifestações cardiovasculares da doença tireoideana sem envolver múltiplos sítios de ação e outros sistemas hormonais, como catecolaminas e renina-angiotensina^{4 5}.

O hormônio tireoideano ativo, triiodotironina (T_3), exerce seu efeito após ligação à receptores nucleares específicos, nomeados de receptores tireoidianos (RT), pertencentes à família de fatores de transcrição nuclear hormônio-responsivo que compartilham similaridades estruturais e funcionais. Os RT contêm um domínio central de ligação ao DNA e um domínio C-terminal de ligação ao ligante. Ligam-se a sequências específicas do DNA, denominadas elementos de

resposta tireóidea (ERT), nas regiões promotoras do gene-alvo. De acordo com a natureza dos elementos reguladores no gene-alvo, o receptor ativado pode estimular ou inibir a transcrição⁶.

Os prováveis mecanismos pelos quais o hormônio tireoideano exerceria seus efeitos cardiovasculares são: 1) ação direta sobre o cardiomiócito, 2) interação com o sistema nervoso simpático e 3) alterações da circulação periférica e no metabolismo energético.

As propriedades contráteis do coração são dependentes de quantidades relativas de produtos de vários genes de miosina. A administração de T₃ aumenta a contratilidade do ventrículo esquerdo, primariamente por estimular a transcrição da cadeia pesada α de miosina e por inibir a expressão do gene da cadeia pesada β de miosina. No entanto, a expressão dos genes da cadeia pesada de miosina são, também, influenciados por mudanças hemodinâmicas independentemente da ação do hormônio tireoidiano^{1 7}.

As alterações hemodinâmicas produzidas pelo aumento da atividade simpática⁸ são consideradas os principais fatores indutores da hipertrofia cardíaca no hipertireoidismo, uma vez que o aumento da atividade do sistema nervoso simpático (SNS) estimula a atividade da renina plasmática (ARP) ativando do sistema renina-angiotensina circulante (SRA)⁹. O sistema renina-angiotensina está envolvido,

também no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca¹⁰, através de receptores específicos presentes na membrana basal dos cardiomiócitos¹¹, os quais são estimulados diretamente pela angiotensina II. Alguns trabalhos mostram que o hormônio tireoideano aumenta a atividade da renina plasmática, a concentração tecidual de angiotensina II e renina, bem como a aumento na expressão do mRNA da renina, em miocárdio e rim, sem envolver o SNS^{9 12 13}. Estas e outras evidências sugerem que a renina-angiotensina circulante e o SNS, de forma associada ou independente, participam do desenvolvimento da hipertrofia cardíaca no hipertireoidismo^{14 12 15}. Reforçando ainda mais esta idéia, os inibidores da enzima de conversão da angiotensina I^{8 16} e bloqueadores β -adrenérgicos são terapêuticamente efetivos na redução e prevenção da hipertrofia cardíaca^{8 5}.

As catecolaminas, assim como os hormônios tireoideanos, levam ao aumento no gasto energético em seres humanos e animais. Em modelos experimentais, a calorigênese induzida por catecolaminas parece ser modulada pelo estado tireoideano, com animais hipertiroideos exibindo uma resposta calorigênica exacerbada, enquanto animais hipotiroideos têm resposta reduzida a catecolaminas¹⁷. Estudo *in vitro*¹⁸ mostra clara amplificação da estimulação adrenérgica pelo T₃, através de efeito nas vias de transdução induzidas pela norepinefrina (NE), ou

regulação na concentração de receptores β -adrenérgicos, na atividade da adenilatociclase ou na quantidade de cAMP produzido. Fatores como exposição ao frio, estímulo β -adrenérgico, levariam à aumento do cAMP nas células alvos, ativando a proteinoquinase A (PKA), que fosforilando o C-erb (cAMP-responsive element binding protein) , aumenta a transcrição gênica da desiodinase do tipo II (DII) com maior conversão de T_4 em T_3 ¹⁹. Foi, também, descrito que a quantidade de receptores β_1 e β_2 -adrenérgicos e a produção de cAMP estão diminuídos no hipotireoidismo, sendo lentamente restaurados pela administração de T_3 ^{18 20}. A concentração tecidual de NE foi indetectável em músculo cardíaco de ratos hipotireoidianos, enquanto em animais hipertireoidianos esta concentração foi até 5,2x maiores que as encontradas miocárdio de ratos normotireodeos. Estes resultados indicam as alterações na concentração tecidual de catecolaminas e seus metabólitos como responsáveis, pelo menos em parte por sintomas cardiovasculares observados no hiper e hipotireoidismo²¹.

O hormônio tireoideano também exerce ação calorigênica no coração, manifestada por aumento no metabolismo cardíaco e no consumo de oxigênio, por estímulo direto no metabolismo de cardiomiócitos ou, indiretamente, em resposta a uma maior demanda dos tecidos periféricos por oxigênio e seus substratos. O excesso de

hormônio tireoideano também está associado ao aumento no número e no volume de mitocôndrias no músculo cardíaco e esquelético^{4 14 22}.

Dados preliminares, recentemente, publicados por nós²³, mostram que a quantidade de creatina (Cr) e fosfocreatina (CrP) e da relação ATP/ADP livre estão reduzidas em miocárdio de ratos tratados com T₃, como também a concentração de ATP relacionam-se negativamente com aumento do débito cardíaco, mantendo-se alta a quantidade de ADP livre. Esta diminuição na concentração tecidual de ATP sob trabalho cardíaco de alto débito poderia explicar as limitações na capacidade de trabalho máximo cardíaco no estado de hipertireoidismo^{24 25 26 22}, porém o exato mecanismo relacionado à esta limitação não está completamente esclarecido.

Na musculatura esquelética, a elevação crônica de T₃ aumenta a capacidade oxidativa tecidual que, potencializando a utilização de ácidos graxos pelo tecido, levam a adaptações que resultam em aumento na taxa de captação de Ca⁺² no retículo sarcoplasmático, redução da concentração citoplasmática de Ca⁺², com consequente relaxamento miofibrilar e liberação Ca⁺² pela troponina. Mudanças na propriedade de contração isométrica são correlacionadas com mudanças na atividade de captação de Ca⁺² pelo retículo endoplasmático. Neste contexto, a taxa de remoção de Ca⁺² do citoplasma mais rápida, secundária à aumento da

captação de Ca^{+2} pelo retículo sarcoplasmático, parece ser um possível mecanismo para intervalos mais curtos de contração e relaxamento do músculo soleus na tireotoxicose^{27 28 29 30 31 32 33}. Estas mudanças, bem como as transformações na isomiosina induzidas pelo T_3 , não ocorrem nas mesmas proporções em todos os músculos, sugerindo que a resposta do músculo ao hipertireoidismo pode ser específica ao tipo de fibra muscular^{34 35}, ou seja, grupos musculares que expressam alta porcentagem de miosina do tipo lenta são mais afetados que aqueles com maior concentração de fibras musculares rápidas, os quais seriam minimamente afetados pela exposição ao T_3 ³⁴.

Tem sido mostrado que o T_3 pode alterar a síntese protéica celular³⁶. O aumento da proteólise muscular após a administração de hormônio tireoidiano foi descrita tanto em humanos como em modelos animais, podendo explicar o mecanismo da fadiga muscular observada no hipertireoidismo.

Os efeitos dos agentes β -bloqueadores na renovação de proteínas musculares no estado de excesso de hormônio tireoidiano não são completamente conhecidos. Alguns estudos sugerem que o propranolol poderia reduzir o catabolismo muscular, enquanto outros resultados mostram que a taxa de degradação protéica permanece elevada durante o hipertireoidismo experimental, mesmo quando metoprolol ou

propranolol foram administrados, e a redução na quantidade de proteína e na massa muscular não foram afetadas pelo bloqueio adrenérgico³⁷. Clinicamente, o hipertireoidismo muitas vezes é acompanhado por importante fraqueza muscular, tanto de musculatura esquelética proximal, quanto distal, com expressiva melhora com o uso de propranolol³⁸ e retorno ao eutiroidismo, sugerindo o envolvimento de catecolaminas e do próprio hormônio tireoideano nas manifestações musculares do hipertireoidismo.

As células eucarióticas geram ATP por fosforilação oxidativa. As reações oxidativas na cadeia respiratória geram um gradiente eletroquímico de prótons nos dois lados da membrana interna mitocondrial - este gradiente é utilizado pela ATP-sintetase para fosforilar ADP em ATP. O desacoplamento entre a respiração e a fosforilação de ADP das células em geral, ocorre em mitocôndrias, onde a proteína desacopladora de prótons causa reentrada de prótons no interior da matriz que, reduzindo o gradiente eletroquímico, a energia liberada é então dissipada na forma de calor, com redução na síntese de ATP^{39 40 19}. A recente clonagem de novas proteínas desacopladoras de prótons (uncoupling proteins: UCPs) 2 e 3, presentes em vários outros tecidos, além da UCP1 presente no tecido adiposo marrom (TAM),

revelou a importância deste tipo de regulação do controle respiratório no metabolismo celular e gasto energético de diversos tecidos ⁴¹.

Potenciais mecanismos reguladores da reentrada de prótons incluem mudanças no tamanho e composição de fosfolípides da membrana interna mitocondrial e atividade de proteínas carreadoras da membrana, como transportador adenina-nucleotídeo (ANT)⁴². Nesse sentido, considerável atenção tem sido dada às proteínas desacopladoras de prótons, as quais pertencem à família dos transportadores mitocondriais H^+ /ácidos graxos e têm distribuição tecido-específica⁴³. A UCP2 está presente no miocárdio, músculos esqueléticos e vários outros tecidos⁴⁴, enquanto a UCP3 é confinada, principalmente, ao músculo esquelético e miocárdio, com pequenas quantidades presentes no TAM⁴⁵. O exato papel fisiológico da UCP2 e UCP3 ainda não está completamente esclarecido e encontra-se sob intensa investigação. A regulação da UCP1 pela tiroxina⁴⁶ está bem estabelecida, sabe-se também que o T_3 estimula a expressão do mRNA da UCP2 e UCP3 em músculo esquelético⁴⁵. As UCPs são fisiologicamente ativadas por diversos fatores. Enquanto a expressão do mRNA da UCP3 está aumentada no jejum, na restrição alimentar acentuada, em presença de concentrações elevadas de ácidos graxos livres, leptina e glucocorticóides, a expressão do mRNA da UCP2 seria estimulada, no

músculo esquelético, durante o jejum e restrição alimentar acentuada; e no miocárdio apenas pela exposição ao frio^{47 48 49 50}.

O T_3 é o maior regulador do gasto energético em mamíferos adultos^{51 52}, apesar do HT estimular a taxa metabólica e diminuir a eficiência do metabolismo basal, pouco se sabe sobre o mecanismo molecular desses efeitos. Presume-se que o T_3 regule a eficiência e o gasto energético por controlar, via interação com diferentes isoformas de receptores nucleares, a taxa de transcrição de genes ligados a proteínas-chave envolvidas no metabolismo celular.

Há mais de 50 anos, foi sugerido que o HT aumenta a taxa metabólica por desacoplar o transporte de elétrons da síntese de ATP. Mais recentemente, a hipótese do desacoplamento ganhou novo interesse com a evidência que a reentrada de prótons na mitocôndria contribui com porcentagem substancial de energia necessária pela célula e com a descoberta de proteínas desacopladoras presentes em quase todos os tecidos. Devido a suas propriedades de desacoplamento, as UCPs são excelentes candidatas para o papel molecular determinante do controle do metabolismo energético pelo HT⁵³. A ativação da termogênese, e consequente estímulo na UCP1, pela via β -adrenérgica em tecido adiposo marrom de ratos, ocorreria pela ligação do agonista RA- β estimulando a geração de cAMP, o qual ativa a proteinoquinase A

(PKA), essa fosforila o C-erb, levando a aumento da transcrição gênica; e pela ativação da lipase hormônio sensível (HSL) que aumenta a concentração de ácidos graxos livres, consequentemente estimula a UCP1. Supõem-se que o C-erb ativado induz diretamente a expressão do co-ativador (PGC-1) do receptor proliferador ativado dos peroxissomas gama (PPAR- γ) e da desidrodinase tipo II (DII). O PGC-1 ativaria fatores transcripcionais alocados na região promotora da UCP1, como os receptores retinóico (RxR) e tireoidiano (RT), e fatores transcripcionais nuclear respiratório 1 (NRF1), resultando em marcante estimulação da biogênese e função mitocondrial. Já a DII seria responsável pelo aumento da síntese de triiodotironina, ligante específico do RT, aumentando ainda mais a expressão da UCP1¹⁹. Ainda não está completamente esclarecido o mecanismo responsável pela ativação da UCP3, mas sabe-se que elementos responsáveis ao receptor tireoidiano, também estão presentes na região promotora da UCP3, aumentando sua transcrição⁵⁴.

Um aspecto importante do metabolismo mitocondrial que ainda necessita ser melhor entendido é a produção de ATP no hipertireoismo. O aumento no substrato oxidativo e a capacidade enzimática em vários tecidos sugerem que a produção de ATP seria aumentada pelo HT^{55 56 57 58 59 60}, no entanto, como mostram os dados publicados por nós²³, a

quantidade de ATP e a relação ATP/ADP livre estão diminuídos no miocárdio. Consequentemente, muito da energia proveniente da oxidação de glicose e ácidos graxos livres é perdida como calor, ao invés da sua utilização na produção de ATP, uma vez que a perda mitocondrial de prótons está aumentada^{61 62 63 64}.

O hipertireoidismo está associado ao aumento na reentrada de prótons através da membrana mitocondrial interna desacoplada à geração de ATP, evidenciando a participação do hormônio tireoideano na eficiência mitocondrial; no hipotireoidismo foi descrito efeito oposto⁶⁵. A UCP3 pode ser o mediador quantificável deste efeito, uma vez que vários achados apontam fortemente para seu papel nos mecanismos intrínsecos do gasto energético dependente de T_3 ⁶⁶. LOMBARDI et al.⁶⁷ inferem que ratos hipertireoideos correspondem ao modelo fisiológico análogo ao modelo geneticamente manipulado de animais com aumento da expressão da UCP3. De fato, ambos modelos animais mostram maior expressão de UCP3 que animais normais ou controles, têm aumento da taxa metabólica, utilizam lípidos como substrato preferencial e maior desacoplamento das mitocôndrias do músculo esquelético⁶⁸.

A adição de catecolaminas à cultura de células de miotúbulos L6 leva a um efeito positivo na regulação tanto da UCP2, quanto da UCP3, o qual parece ser mediado via receptor adrenérgicos β -2 (RA- β 2), uma

vez que este efeito pode ser prevenido pela adição de antagonistas RA- β 2 à cultura ⁶⁹. Observou-se, também, que a aldosterona tem poder de inibir a expressão e função da UCP1 e UCP3, mas não da UCP2, em cultura de adipócitos provenientes do tecido adiposo marrom⁷⁰. Por outro lado, as evidências que os hormônios tireoideanos levam a uma hiper-regulação do SNS e do SRA, aumentam a possibilidade dos efeitos tireoidianos sobre a expressão da UCP3 em miocárdio e músculo esquelético serem secundários, mais do que devido à ação hormonal direta sobre o gene da UCP3.

Baseado na literatura e em nossos dados preliminares²³, a presente investigação visa esclarecer, em um modelo animal de hipertireoidismo, se as alterações induzidas pelo hormônio tireoideano na expressão do mRNA de UCP3 estariam relacionadas aos efeitos diretos do T₃ ou são secundárias à ação desse hormônio, pela estimulação de outros hormônios e sistemas.

OBJETIVOS

O objetivo desse estudo é testar a hipótese que o hormônio tireoidiano exerce seu efeito diretamente nos cardiomiócitos e células musculares, e independente da ação de catecolaminas e sistema renina-angiotensina. Para tanto, será utilizado um modelo animal de hipertireoidismo, visando:

- 1) Determinar o efeito do T_3 na expressão gênica da UCP3 em miocárdio ventricular e músculo esquelético;
- 2) Avaliar o efeito da inibição β -adrenérgica e da angiotensina II sobre a expressão da UCP3 modulada por T_3
- 3) Determinar se os efeitos do T_3 sobre a UCP3 podem ser simulados por ação β_2 -agonista.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais: Ratos machos adultos Sprague-Dawley, pesando aproximadamente 250 g, foram mantidos sob condições controladas de luz, temperatura e umidade (ciclo dia-noite de 12:12h, 22° C, umidade constante), com livre acesso a água e ração.

Modelo experimental de hipertiroidismo: O modelo consiste na aplicação de 3 doses (100 µg/100 g peso corpóreo) de 3,3',5-triiodo-levotironina (LT₃) (Sigma Chemical Company. St Louis, E.U.A), via subcutânea, com intervalo de 48 h entre cada dose, a fim de produzir o máximo efeito hipertiroidiano^{71 72}.

Inibição β-adrenérgica: Propranolol (Sigma Chemical Company. St Louis, E.U.A.) foi injetado via intraperitoneal, por 7 dias consecutivos, na dose de 1 mg/100 g de peso corpóreo.

Inibição da angiotensina II: Foi utilizado captopril (Sigma Chemical Company. St Louis, E.U.A.) 1 mg/100 g de peso corpóreo, via intraperitoneal, diariamente por 7 dias.

Estímulo β₂-agonista: Os animais receberam 0,04 mg/100g de peso corpóreo de clenbuterol (Sigma Chemical Company. St Louis, E.U.A.), via intraperitoneal, por 7 dias consecutivos.

Controle: Ratos eutireoideanos foram usados como controles e submetidos às mesmas condições, bem como receberam injeções intraperitoneais de soro fisiológico, durante 7 dias.

Os animais foram alocados em 8 diferentes grupos e cada grupo recebeu um dos seguintes tratamentos: LT₃; propranolol; LT₃ e propranolol; captopril; LT₃ e captopril; clenbuterol; LT₃ e clenbuterol; soro fisiológico. As doses de propranolol, captopril e clenbuterol foram utilizadas baseadas em informações obtidas na literatura^{73 8 74 75 76 77 78 79 80}.

Após término do tratamento, os animais foram submetidos à narcose com CO₂, pesados e sacrificados por decapitação. O miocárdio ventricular e músculos esqueléticos (soleus, gastracnemius e quadríceps) foram removidos, após completa exsanguinação, e congelados prontamente a -80° C. O músculo soleus foi usado como tipo oxidativo-lento³² e músculo gastrocnemius como oxidativo-rápido, ou glicolítico³⁵.

Extração de RNA e Northern Blot;

A) Extração de RNA total: realizada pela técnica previamente descrita e consagrada pelo uso⁸¹, resumidamente, conforme as seguintes etapas: 1) homogeneização do tecido (50 a 100 mg) em 1 mL de Trizol, após transferência do material homogeneizado para tubos de Eppendorf

autoclavados, os mesmos foram mantidos a temperatura ambiente por 5 min; 2) adição de 0,2 mL de clorofórmio para cada mL de Trizol, seguido por agitação vigorosa do tubo por 15 s e repouso da mistura por 5 min, em temperatura ambiente; 3) centrifugação a 15.000 g, por 20 min, a 4° C; 4) coleta do sobrenadante e transferência para tubo de Eppendorf limpo e autoclavado; 5) adição de 0,5 mL de álcool isopropílico para cada mL de Trizol utilizado e incubação a temperatura ambiente por 10 min; 6) centrifugação a 15.000 g, por 15 min, a 4° C. 7) descarte do sobrenadante; 8) suspensão do material precipitado no fundo do tubo com 100 µL de bidestilada (ddH₂O) tratada com dietilpirocarboneto (DEPC) e autoclavada; 9) adição de 400 µL de fenolclorofórmio (19:1) a cada tubo; 10) agitação e centrifugação a 15.000 g; 11) descarte do sobrenadante; 12) repetição das etapas 9 a 11; 13) adição de clorofórmio em quantidade semelhante a existente no tubo de Eppendorf; 14) agitação e centrifugação a 15.000 g; 15) descarte do sobrenadante; 16) precipitação do RNA presente na amostra, pela adição de solução salina hipertônica, 1/10 do volume da amostra, e etanol, 2x o volume da amostra; incubado a -80° C por 12 h; 17) centrifugação por 20 min, a 4° C; 18) descarte de toda a fase líquida; 19) reconstituição do “pellet” em 20 a 30 µL de ddH₂O; 20) determinação da concentração de

RNA presente na amostra por espectrofotometria UV (Beckman Coulter, Inc. Fullerton, E.U.A.) nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. Somente amostras com relação $A_{260/280} \geq 1,8$ foram utilizadas.

B) Northern Blot: 1) Entre 30 a 40 μg de RNA total, isolado de músculo ventricular, soleus e gastrocnemius de ratos dos diferentes grupos de tratamento, foram eletroforeticamente separados em gel de agarose a 1%, contendo 6% de formaldeído; 2) transferência para membrana de nitrocelulose (0,45 μm ; Bio-Rad Laboratories. Hercules, E.U.A.), por capilaridade^{82 83}; 3) coloração com brometo de etídeo do gel e da membrana de nitrocelulose; 4) marcação das bandas de 28S e 18S de RNA ribossomal; 5) confirmação se quantidades semelhantes de RNA foram utilizadas e avaliada a eficiência da transferência; 6) incubação das membranas resultantes com sondas radiomarcadas com cDNA da UCP3 murina.

C) Síntese do cDNA da UCP3 , pela técnica de reação em cadeia da polimerase pós transcrição reversa (RT-PCR): Síntese de fita única de cDNA: 1) adição à tubo de Eppendorf de 2 μg de RNA (extraído de miocárdio de ratos controles), 10 μL de ddH₂O, 1 μL de hexanucleotídeos randômicos e 1 μL de 10 mM dNTP; 2) aquecimento da mistura a 65° C, por 5 min; 3) resfriamento rápido em gelo e

centrifugação rápida; 3) adição de 4 µL de 5x tampão da primeira fita, 2 µL de 0,1 M DTT, 1 µL de inibidor de RNase; 4) os reagentes foram misturados cuidadosamente e incubados a 42° C, por 2 min; 5) adição de 1 µL de transcriptase reversa (Superscript II. Promega Corporation. Madison. E.U.A.); 6) incubação a 42° C, por 50 min; 7) inativação da reação por incubação da amostra a 70° C durante 50 min. Este material foi utilizado como amostra na realização de PCR: 1) em tubo próprio para realização de PCR, adição de 77 µL de ddH₂O, 10 µL de 10x tampão de reação, 3 µL de 50 mM de MgCl₂, 2 µL de 10 mM de dNTPs, 2 µL de oligodesoxinucleotídeo positivo, 2 µL de oligodesoxinucleotídeo negativo e 4 µL da amostra de cDNA obtida por reação de transcriptase reversa descrita acima. Os iniciadores positivo e negativo foram sintetizados de acordo com as seguintes seqüências, respectivamente:

Iniciador (+): 5'-CCATCCTCCGGAACCATGGT-3'

Iniciador (-): 5'-GGAGATTCCCGCAGTACCTG-3'

2) pré-aquecimento no equipamento termociclador à temperatura padrão; 3) equilíbrio da temperatura dos tubos por 1 min; 5) adição de 0,5 µL TaqDNA polimerase; 6) início da reação nas seguintes condições: 1 ciclo a 95° C, 4 min; 30 ciclos a 95° C, 30 s; 55° C, 45 s e 72° C, 2

min; e , finalmente 1 ciclo a 72° C, 10 min. 7) a verificação da semelhança do produto da reação de PCR, por seqüenciamento, à UCP3 murina (GenBank, número de acesso à seqüência: AF030163), foi realizada por empresa especializada com seqüenciador ALFexpress DNA (Amersham Pharmacia Biotech.) e Fragment Manager Software.

D) Preparação de sondas radioativas de cDNA: 1) diluição do cDNA da UCP3, obtido por RT-PCR, para uma concentração de 2,5 - 25 ng em 45 µL de ddH₂O; 2) desnaturação por aquecimento, a 95° C, por 5 min; 3) centrifugação rápida, para precipitar os componentes ao fundo do tubo; 4) incubação em gelo por 10 min; 5) adição de mistura corante ao cDNA desnaturado; 6) reconstituição, por agitação suave, até a coloração azul ser completamente distribuída; 7) adição de 5 µL de dCTP marcado com fósforo radiotivo (γ [³²P]dCTP) à amostra e homogeneizado cuidadosamente por pipetagem; 8) incubação a 37° C por 30 min; 9) a. purificação da sonda radioativa por microcoluna G-50 (ProbeQuant™. Amersham Pharmacia Biotech); b. resuspensão da resina presente na microcoluna G-50 por vortex; c. transferência da microcoluna para tubos de 1,5 mL empregados como suporte durante a centrifugação a 3000 rpm, por 1 min; d. transferência da coluna para um novo tubo 1,5 mL; e. aplicação, lenta, de 50 µL da amostra radioativa no centro superior da

coluna de resina; f. centrifugação a 3000 rpm por 2 min; g. coleta da amostra radioativa purificada; 10) adição de 100 µL DNA de esperma de salmão à sonda radiomarcada; 11) aquecimento da mistura, em água fervente, por 10 min; 12) incubação em gelo por 5 min.

E) Hibridização⁸⁴: 1) umedecimento das membranas de nitrocelulose com solução 4x SSC, pré-hibridizadas com solução QuickHyb, a 68° C por 1 h; 2) seguindo-se hibridização com a sonda marcada, a 68° C por 12 h; 3) descarte da solução radioativa; 4) enxágüe das membranas, 1 vez, com solução 0,1x SSC, 0,1% SDS; 5) e lavagem com a mesma solução, a 60°C por 15 min; 6) repetição da lavagem, nas mesmas condições, por 4 vezes.

Para determinar o efeito do hormônio tireoideano e das outras drogas utilizadas sobre a abundância de mRNA de UCP3, os filmes resultantes dos experimentos foram digitalizados e a densidade das bandas apropriadas nas linhas contendo RNA de cada rato controle foram corrigidas em relação a intensidade do 28S rRNA (RNA ribossomal) do *blot*, realizando-se a média dos valores e, então, normalizados para 1.0 (The SciScanTM 5000 System, United States Biochemical, Cleveland, E.U.A.; OS-ScanTM Image Analysis System, Oberlin Scientific Corporation. Oberlin, E.U.A.). A densidade de cada

uma das bandas de RNA nos grupos tratados foi calculada em relação aos controles e, então calculada a média dos valores.

Amostras provenientes de miocárdio e músculo esquelético de animais tratados com hormônio tireoideano e soro fisiológico foram utilizadas para análise das proteínas UCP3 e UCP2, pela técnica de “Western Blot”, seguindo-se as etapas: 1) homogeneização dos músculos quadríceps e miocárdio em homogenizador tipo *polytron* na velocidade nº 2 com 2 mL da solução de 25 mM de HEPES, 5 mM de EDTA, 20 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 200 mM sacarose, 1 mM PMSF, 4 µM de leupatin, 4 µM de pepstatin e centrifugado a 10.000 g a 4°C por 10 min; 2) transferência do sobrenadante para um tubo limpo; 3) cálculo da concentração de proteína por espectrofotometria, usando-se reagentes comerciais (Bio-Rad) e albumina como padrão; 4) separação em gel de dodecilsulfato de sódio (SDS) poliacrilamida a 12% de 80 µg proteínas por amostra; 5) transferência para membrana de nitrocelulose; 6) incubação por aproximadamente 12 h em solução contendo 1x tampão Tris salina (TBS), com 0,1% Tween-20 e 5% (v/v) de leite desnatado em pó; 7) incubação com anticorpo monoclonal leporino anti-UCP3 e UCP2 humanos purificados (affinity-purified rabbit anti-human antiserum. Calbiochem-Novabiochem Corporation. San Diego, E.U.A.) por 2 h, em temperatura ambiente; 8) enxágüe das membranas com TBS-Tween-20

(TBS-T) e 5% (v/v) de leite em pó desnatado; 9) incubação com anticorpo secundário ovino anti-coelho conjugado com peroxidase de raiz forte (*horseradish peroxidase-linked goat-anti-rabbit*. Calbiochem-Novabiochem Corporation. San Diego, E.U.A.), durante 1 h, em temperatura ambiente; 10) lavagem das membranas com TBS-T, por 15 min, a temperatura ambiente; 11) lavagem das membranas com TBS-T, por 5 min, a temperatura ambiente; 12) repetir item 11; 13) exposição das membranas a amplificador de quimiluminescência (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, E.U.A.), por 1 min; 14) secagem das membranas com papel filtro; 15) exposição a filmes KodakBioMax; 16) revelação dos filmes; 17) quantificação das bandas resultantes por densitometria (Imagemaster, Amersham Pharmacia Biotech), as quais foram expressas como relativas à média dos valores obtidos nos controles.

Análise Estatística:

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prism (GraphPad Prism Software Inc.), os testes utilizados foram: ANOVA, Teste de Comparação Múltipla de Bonferroni ou teste *T de Student* não-pareado. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os valores foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

RESULTADOS

O sucesso na reprodução do modelo de hipertireoidismo pôde ser comprovado analisando-se os efeitos do hormônio tireoideano sobre peso corpóreo, peso cardíaco e na relação peso cardíaco/peso corpóreo, apresentados nas figuras 1A e 1B. Houve redução, estatisticamente significativa, no peso corpóreo dos animais tratados com LT_3 , também evidenciado nos grupos tratados com as associações de LT_3 e propranolol e LT_3 e captopril, quando comparados aos animais controles e aqueles tratados com propranolol ou captopril isoladamente (Figura 1A); no entanto, a perda de peso foi menor na associação LT_3 e propranolol, ou seja, o peso final dos animais tratados com LT_3 foi menor que no grupo tratado com LT_3 e propranolol; respectivamente: 254 ± 5 g e 263 ± 6 g.

Observou-se hipertrofia cardíaca em todos os grupos de ratos tratados com LT_3 , confirmada por aumento no peso cardíaco nesses animais; e a associação com β -bloqueador ou inibidor da enzima de conversão da angiotensina não foi efetiva em bloquear ou reverter este processo (Figura 1B).

Figura 1A. Efeito do hormônio tireoideano, em monoterapia, ou em associação com captopril ou propranolol, sobre o peso corpóreo (n = 4-8). Valores apresentados como média±erro padrão da média (*: $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle).

Figura 1B. Efeito do hormônio tireoideano, em monoterapia, ou em associação com captopril ou propranolol, sobre o peso cardíaco e relação peso cardíaco/peso corpóreo ($n = 4-8$). Valores apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (*: $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle).

Figura 2A. Efeito do hormônio tireoideano sobre a quantidade relativa de mRNA de UCP3 em miocárdio.

Em relação aos efeitos do LT_3 , propranolol e captopril sobre a expressão do mRNA da UCP3 em miocárdio ventricular, observamos um aumento estatisticamente significativo na quantidade relativa de UCP3 após tratamento com LT_3 , em monoterapia, quando comparados à controles ($p < 0,05$) (Figura 2A).

A associação de β -bloqueador ou inibidor da enzima de conversão da angiotensina não foi capaz de impedir o aumento na expressão do mRNA da UCP3 causada pelo LT_3 , mantendo-se a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Figura 2B). Propranolol ou captopril, administrados em monoterapia, não alteraram a expressão da UCP3.

Ao avaliar músculo esquelético gastrocnemius, observamos aumento estatisticamente significativo na quantidade de mRNA de UCP3 (Figura 3A), resultante da ação do hormônio tireoideano. Esse estímulo na expressão da UCP3 manteve-se nas mesmas proporções quando propranolol ou captopril foi associado ao LT_3 (Figura 3B). A administração isolada de propranolol ou captopril não resultou em diferença na quantidade de UCP3. Os efeitos observados após terapia com LT_3 ocorreram de maneira semelhante ao músculo gastrocnemius (Figura 3A), porém com menor intensidade, ou seja, houve um incremento na quantidade relativa de mRNA de UCP3 pelo LT_3 , o qual

persistiu mesmo com a associação a β -bloqueador ou inibidor da ECA; o uso dessas drogas em monoterapia não alteraram a expressão da UCP3 (Figura 3B).

O músculo esquelético quadríceps foi escolhido para estudar os efeitos do LT_3 sobre as proteínas UCP3 e UCP2, por possuir uma composição mista de fibras musculares lentas e rápidas. O tratamento com o hormônio tireoideano resultou em aumento modesto, mas estatisticamente significativo, dessas proteínas (~30%) quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$, $n = 6$ para cada grupo) (Figura 4). Já no miocárdio ventricular houve apenas uma tendência de aumento na quantidade de proteína UCP3 (dados não mostrados), sem contudo atingir significância estatística.

Afim de verificar se os efeitos do LT_3 sobre a UCP3 poderiam ser simulados por ação β_2 -agonista ⁶⁹, clenbuterol foi utilizado em um grupo de animais, em monoterapia ou associado ao LT_3 . Como observado nos demais experimentos, o tratamento com LT_3 diminuiu o peso corpóreo e aumentou a relação peso cardíaco/peso corpóreo, ambos de forma estatisticamente significativa. Em monoterapia, o clenbuterol não causou mudanças estatisticamente significativas no peso corpóreo, nem no peso cardíaco total, mantendo a relação peso cardíaco/peso corpóreo semelhante ao controle, no entanto quando o clenbuterol foi

administrado em associação ao LT_3 , observamos uma diminuição adicional do peso corporal em 20% e um discreto aumento no peso cardíaco, quando comparado ao tratamento exclusivo com LT_3 , resultando em grande aumento na relação peso cardíaco/peso corpóreo, com os seguintes valores: 0,0029; 0,004 e 0,005, no grupo controle, LT_3 em monoterapia e LT_3 associado a clenbuterol, respectivamente.

Figura 2B. Efeito do hormônio tireoideano, em monoterapia, ou em associação com captopril ou propranolol, sobre a quantidade relativa de mRNA de UCP3 em miocárdio. Valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (*: $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle).

Figura 3A. Efeito do hormônio tireoideano sobre a quantidade relativa de mRNA de UCP3 em músculo esquelético.

Figura 3B. Efeito do hormônio tireoideano, em monoterapia, ou em associação com captopril ou propranolol, sobre a quantidade relativa de mRNA de UCP3 em músculo esquelético. Valores são apresentados como média±erro padrão da média (*: $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle)

Figura 4. Efeito do tratamento com hormônio tireoideano sobre a proteína UCP3 e UCP2 em músculo esquelético.

Nos dois grupos musculares estudados, gastrocnemius e soleus, após tratamento com LT_3 , a quantidade relativa de mRNA de UCP3 apresentou aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) (Figuras 5A). No entanto, o tratamento apenas com clenbuterol levou a uma diminuição estatisticamente significativa na quantidade de UCP3 ($p < 0,05$), e a associação clenbuterol/ LT_3 não resultou em aumento adicional na expressão da UCP3 que os alcançados com LT_3 em monoterapia (Figura 5B).

Figura 5A. Efeito do hormônio tireoideano e clenbuterol sobre a quantidade relativa de mRNA de UCP3 em músculo esquelético. Valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (*: $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle).

Figura 5B. Efeito do hormônio tireoideano, em monoterapia, ou em associação com clenbuterol, sobre a quantidade relativa de mRNA de UCP3 em músculo esquelético.

DISCUSSÃO

A administração de HT reproduziu precocemente, após três dias, os efeitos cardiovasculares encontrados no hipertireoidismo, caracterizados pela hipertrofia cardíaca e aumento da relação peso cardíaco/peso corpóreo; acompanhado por marcante aumento na taxa de síntese proteica, comprovando a eficácia do modelo utilizado^{84 85}.

A eficácia do tratamento com drogas inibidoras da conversão da angiotensina⁸⁶ e drogas β -bloqueadoras^{8 5} no tratamento da hipertrofia cardíaca, evidenciado pelo envolvimento do sistema renina-angiotensina¹⁵ e do sistema nervoso simpático^{14 5} na miocardiopatia tireoidiana, proporcionou a investigação se o HT age diretamente nos tecidos alvos ou se essa alteração seria secundária a ação do hormônio tireoidiano, pelo estímulo de outros sistemas ou hormônios, como o SNS ou SRA.

A presente investigação permitiu demonstrar-se que o tratamento adjuvante com propranolol não foi capaz de impedir o desenvolvimento da hipertrofia miocárdica induzida pelo LT_3 . Esse achado está de acordo com as conclusões GERDES et al.⁸⁷ de que no hipertireoidismo a estimulação β -adrenérgica não é necessária para induzir cardiomegalia, pois a fibrose ventricular direita induzida pelo excesso de HT, não foi

prevenida pelo propranolol. Em outro estudo⁸⁸, este autor mostrou que a relação peso cardíaco/peso corpóreo foi similarmente elavada em ratos tratados com HT ou HT e propranolol, sendo que o hormônio tireoidiano levou à hipertrofia do miócito por aumento no diâmetro, enquanto no tratamento exclusivo com propranolol houve aumento no comprimento e redução no diâmetro, assim o volume dos miócitos manteve-se inalterado, justificando a falta de proteção encontrada no estudo com a associação medicamentosa.

A falta de prevenção da hipertrofia miocárdica, no modelo utilizado, não pode ser atribuída à dose insuficiente de propranolol, uma vez que, apesar de não se determinar o grau de bloqueio β -adrenérgico, observou-se menor perda ponderal nos animais tratados com LT_3 e propranolol, comparada ao grupo tratado apenas com LT_3 . Este fato sugere uma ação efetiva se for considerado que doses terapêuticas de propranolol proporciona redução ou, mesmo, estabilização do peso em pacientes hipertireoidianos⁸⁹.

Existem controvérsias sobre o efeito da administração de propranolol sobre a concentração sérica de hormônio tireoidiano. Estudo publicado por MURAKAMI et al.⁹⁰ concluiu que o propranolol tem atividade antitireoiana direta pela inibição do transporte de iodo e não por sua ação β -bloqueadora. JONES et al.⁹¹ mostraram queda

estatisticamente significativa nas concentrações séricas de T₃ e T₄ livre 96 h após início do tratamento com propranolol, enquanto outro estudo de FRANKLYN et al.⁹², onde amostras de sangue foram coletadas 18 horas após a última dose de propranolol, evidenciou diminuição estatisticamente significativa do T₃ total sérico. A dose convencional de propranolol (160 mg/dia) mostrou-se efetiva em reduzir o índice de tirotoxicose e correlacionou-se positivamente com mudanças na frequência cardíaca e peso corpóreo, uma vez que houve persistente perda de peso em indivíduos hipertireoideos com baixa concentração sérica de propranolol, enquanto aqueles com alta concentração sérica de propranolol, ganharam peso⁸⁹. No presente estudo utilizou-se o ganho de peso dos animais tratados com propranolol como um marcador indireto de eficiência no uso de β -bloqueador. Além disso, quando propranolol foi administrado aos animais com hipertensão espontânea, na dose de 5 mg/kg de peso corpóreo/dia, a concentração sérica foi de aproximadamente 100 ng/mL, atingindo bloqueio β -adrenérgico efetivo com redução da frequência cardíaca e pressão sanguínea⁹³. Com isto, foi possível inferir que a dose de propranolol utilizada, bem como a via de administração, foram adequadas no presente estudo.

A fim de verificar se o bloqueio do sistema renina-angiotensina estaria de alguma forma atuando no desenvolvimento da hipertrofia

cardíaca no hipertireoidismo, um grupo de animais foi tratado com a associação captopril-LT₃. Foi possível mostrar que a inibição da ECA também não foi capaz de prevenir a hipertrofia cardíaca no modelo utilizado. Esses dados estão de acordo com o trabalho de BEDOTTO et al.⁹⁴, que avaliou a atuação destas drogas na hipertrofia cardíaca no estado de hipertireoidismo e mostrou que o tratamento com captopril e propranolol foi incapaz de alterar a frequência cardíaca, bem como falharam em prevenir o aumento da relação peso ventrículo esquerdo/peso corpóreo em animais tratados com T₄. Já os trabalhos que resultaram na redução da hipertrofia cardíaca^{95,96 97} foram realizados em modelos de hipertensão arterial e puderam refletir o mecanismo fisiopatogênico diferente da hipertrofia cardíaca do hipertireoidismo. Segundo FREEMAN et al.⁹⁸, captopril causa redução da massa ventricular esquerda, em ratos normais, como resultado da redução na pressão sanguínea, independente de efeitos na enzima conversora de angiotensina I. Outros dados sugerem que drogas inibidoras da conversão da angiotensina I (captopril) e antagonista do receptor de angiotensina II (irbesartan, losartan) são similarmente efetivos em melhorar a função miocárdica na hipertrofia ventricular, por prevenir mudanças na expressão gênica e subsequente remodelação subcelular decorrentes da diminuição do débito cardíaco^{99 100 101}. Este benefício

sobre a hipertrofia cardíaca em alguns modelos e a falta de resposta em outros sugerem uma ação indireta da droga, via sistema renina-angiotensina e a independência deste sistema na hipertrofia cardíaca do hipertireoidismo, reforçando ainda mais a ação direta do HT, conforme também demonstrado nesse estudo, uma vez que nenhuma das associações utilizadas (propranolol + LT₃ ou captopril + LT₃) foram capazes de alterar a ação do LT₃.

O aumento na reentrada de prótons através da membrana mitocondrial interna desacoplada à geração de ATP, mostra a influência do hormônio tireoideano na eficiência mitocôndrial⁶⁵ e apontam para o papel da UCP3 no mecanismo intrínseco do gasto energético dependente de T₃⁶⁶.

O LT₃ levou a aumento estatisticamente significante na quantidade de mRNA de UCP3 em músculo cardíaco de aproximadamente 3 vezes, em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Como aventado anteriormente por LOMBARDI et al.⁶⁷, ratos hipertireoidianos correspondem ao modelo fisiológico análogo ao modelo geneticamente manipulado de animais superexpressando UCP3. Seguindo essa linha de raciocínio, o relato de CLAPHAM et al.⁶⁸ demonstrando que a superexpressão de UCP3 foi associada ao desacoplamento mitocondrial, avaliado pela diminuição na taxa de controle respiratório, devido a aumento de $26 \pm 9\%$

no estadio 4 da respiração e diminuição de $12\pm 6\%$ no estadio 3, sendo que o aumento no estadio 4, acompanhado de diminuição no potencial transmembrana é considerado indicador do desacoplamento mitocondrial.

De acordo com os dados preliminares obtidos²³, observou-se um declínio estatisticamente significativo na medida de ATP em estado de alto débito cardíaco, bem como na relação ATP/ADP livre em miocárdio de ratos tratados com HT e, evidenciando o desacoplamento mitocondrial, justifica o presente achado de aumento na expressão da UCP3 neste grupo de animais. Porém de maneira independente da via β -adrenérgica, descrita para ativação da termogênese em tecido adiposo marrom¹⁹, uma vez que o aumento da UCP3 não foi bloqueado pela associação propranolol ou captopril (Figura 2A e B) e possibilitou inferir que ação do LT_3 sobre a expressão da UCP3 ocorre de forma direta. Segundo recente publicação de TAEGTMEYER et al.¹⁰² a regulação da expressão de UCP3 é independente de qualquer mudança trófica no coração, como poderia ser sugerido pela hipertrofia cardíaca do hipertireoidismo.

Estudos anteriores mostram que o aumento da atividade enzimática mitocondrial, após a administração de hormônio tireoidiano, ocorre mais rapidamente e em maior amplitude em músculos oxidativos

que em glicolíticos^{55 103 104}, associado ao fato da musculatura esquelética conter, de forma quiescente, 33% do oxigênio consumido pelo corpo inteiro, muita atenção tem sido dada à função e controle da UCP3 como possível regulador do gasto energético e peso corpóreo¹⁰⁵. O presente estudo permitiu observar, também, que a quantidade relativa de mRNA de UCP3, foi positivamente regulada pelo hormônio tireoideano, isto é consistente com a reconhecida regulação da UCP3 em músculo esquelético pelo T₃^{45 106 107 108}. Contudo, este efeito não foi específico ao tipo de fibra muscular mais abundantemente expressa no músculo, visto que ambos os músculos utilizados responderam de forma semelhante à indução do hipertireoidismo. Estes dados estão de acordo com DE LANGE et al.¹⁰⁹ que mostraram aumento expressivo tanto na quantidade de mRNA UCP3, quanto na proteína UCP3 mitocondrial, em gastrocnemius e tibial anterior após tratamento com T₃. SHORT et al.¹¹⁰, também evidenciaram aumento na expressão de UCP2 e UCP3 em músculo esquelético com predomínio glicolítico, da mesma forma que oxidativo, em animais hipertireoideos, porém a produção de ATP foi mantida ou mesmo aumentou nesses grupos musculares, indicando que exato o papel das UCPs no mecanismo do gasto energético dependente do HT, não está elucidado. A avaliação do conteúdo protéico de UCP3 em músculo esquelético, durante o tratamento com hormônio

tireoideano, estudado nesta investigação revelou aumento estatisticamente significativo na quantidade de proteína UCP3 ($p < 0,05$) após estimulação com LT_3 em concordância ao descrito na literatura¹⁰⁹ e, mais uma vez, estes efeitos não foram alterados pela adição de propranolol ou captopril ao tratamento com hormônio tireoideano.

Estudos em cultura de células de músculo esquelético mostram que as catecolaminas exercem uma regulação positiva sobre a UCP3^{69 111}¹¹². Buscando esclarecer se o incremento na expressão do mRNA da UCP3 atribuído ao hormônio tireoideano, não seria parcialmente devido à ação β_2 -agonista, um segundo modelo animal, no qual se utilizou o clenbuterol em monoterapia ou em associação com LT_3 , foi comparado aos achados obtidos com animais tratados com LT_3 e controles. O tratamento apenas com clenbuterol não resultou na elevação da UCP3, pelo contrário observou-se importante diminuição na expressão do mRNA de UCP3, tanto em músculo soleus quanto em gastrocnemius. Estudo “*in vitro*” com células T37i, provenientes de tumor maligno de gordura marrom, estimuladas com isoproterenol, descreve aumento de 15 a 20 na expressão de UCP1⁷⁰, estes dados divergentes podem ser explicados pela utilização de tecidos diferentes (músculo esquelético x tecido adiposo marrom) e modelos experimentais opostos (*in vivo* x *in vitro*), lembrando que a utilização de células tumorais transformadas

nem sempre representam, de maneira fidedigna, ao que ocorre “*in vivo*”. Segundo RAJAB et al.¹¹³ o clenbuterol levou a um aumento na concentração de ATP, em torno de 29%, com redução de ADP, em músculo soleus; documentando o aumento no acoplamento mitocondrial e consequente maior produção de ATP, ratificando o achado da diminuição da UCP3 durante o tratamento com clenbuterol. Estas alterações, no entanto, não ocorreram em músculo extensor longo, o qual possui predomínio de fibras musculares rápidas semelhante ao músculo gastrocnemius. De qualquer forma, a associação do β 2-agonista ao LT₃ (Figura 5A e B) não levou a um aumento adicional da estimulação da UCP3, quando comparada à ação isolada do LT₃, praticamente excluindo a possibilidade de ação do HT na expressão gênica da UCP3, via estímulo β 2-agonista.

Quando analisados em conjunto, os dados apresentados sugerem que o hormônio tireoidiano age diretamente aumentando a expressão da UCP3, tanto em miocárdio quanto em musculatura esquelética. Baseado no trabalho apresentado por Lowell¹⁹, poder-se-ia inferir que este estímulo ocorreria por aumento na concentração de T₃, ligante específico do receptor tireoidiano presente na região promotora do gene, e não por outros fatores transcripcionais, como aumento na geração de cAMP por estímulo β -adrenérgico e consequente ativação da PKA, C-erb, HSL ou

PGC1, uma vez que, como demonstrado, o estímulo β -agonista não desencadeou alterações na expressão da UCP3. Recentemente, SOLANES et al.⁵⁴ demonstraram que a ação do HT na transcrição gênica da UCP3 é mediada pela ligação do receptor tireoidiano à região proximal da região promotora do gene da UCP3 em músculo esquelético; corroborando resultados aqui apresentados, bem como sugerindo uma ligação entre a expressão da UCP3 e os efeitos do HT na função mitocondrial.

CONCLUSÕES

1) O LT_3 aumentou a quantidade de mRNA de UCP3 em músculo cardíaco e esquelético (tanto gastrocnemius, quanto soleus), em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

2) O sistema adrenérgico e a angiotensina II não têm capacidade estimulatória, nem bloqueadora da ação do LT_3 , sobre a expressão da UCP3, uma vez que o efeito estimulatório do LT_3 não foi bloqueado pela associação de propranolol ou captopril ao tratamento.

3) O tratamento com β_2 -agonista diminuiu a expressão do mRNA da UCP3 tanto em músculo soleus quanto em gastrocnemius. A associação do β_2 -agonista ao LT_3 não levou a um aumento adicional da estimulação da UCP3, quando comparada à ação isolada do LT_3 .

4) Os dados obtidos nesse estudo mostram que o efeito do LT_3 sobre a expressão do mRNA da UCP3, em miocárdio ventricular e músculo esquelético, não é dependente da angiotensina II nem do sistema β -adrenérgico e reflete uma ação direta do LT_3 sobre a expressão da UCP3 nesses tecidos.

REFERÊNCIAS

- 1 Brent GA. The molecular basis of thyroid hormone action. *N Engl J Med.* 1994;331:847-853.
- 2 DeGroot LJ. Thyroid and the heart. *Mayo Clin Proc.* 1972;47:864-871.
- 3 Morkin E, Flink IL, Goldman S. Biochemical and physiologic effects of thyroid hormone on cardiac performance. *Prog Cardiovasc Dis.* 1983;25:435-464.
- 4 Klein I, Levey GS. New perspectives on thyroid hormone, catecholamines, and the heart. *Am J Med.* 1984;76:167-172.
- 5 Levey GS, Klein I. Catecholamine-thyroid hormone interactions and the cardiovascular manifestations of hyperthyroidism. *Am J Med.* 1990;88:642-646.
- 6 Lazar MA. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr Rev.* 1993;14:184-193.
- 7 Dillmann WH. Biochemical basis of thyroid hormone action in the heart. *Am J Med.* 1990;88:626-630.
- 8 Klein I. Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: time course of development and inhibition by propranolol. *Endocrinology.* 1988;123:203-210.

- 9 Hauger-Klevene JH, Brown H, Zavaleta J. Plasma renin activity in hyper- and hypothyroidism: effect of adrenergic blocking agents. *J Clin Endocrinol Metab.* 1972;34:625-629.
- 10 Sadoshima J, Qiu Z, Morgan JP, Izumo S. Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G protein-coupled receptors activate tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and 90-kD S6 kinase in cardiac myocytes. The critical role of Ca(2+)-dependent signaling. *Circ Res.* 1995;76:1-15.
- 11 Baker KM, Singer HA. Identification and characterization of guinea pig angiotensin II ventricular and atrial receptors: coupling to inositol phosphate production. *Circ Res.* 1988;62:896-904.
- 12 Kobori H, Ichihara A, Suzuki H, Takenaka T, Miyashita Y, Hayashi M, Saruta T. Role of the renin-angiotensin system in cardiac hypertrophy induced in rats by hyperthyroidism. *Am J Physiol.* 1997;273:H593-H599.
- 13 Kobori H, Ichihara A, Suzuki H, Miyashita Y, Hayashi M, Saruta T. Thyroid hormone stimulates renin synthesis in rats without involving the sympathetic nervous system. *Am J Physiol.* 1997;272:E227-E232.
- 14 Klein I. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *Am J Med.* 1990;88:631-637.

- 15 Morgan HE, Baker KM. Cardiac hypertrophy. Mechanical, neural, and endocrine dependence. *Circulation*. 1991;83:13-25.
- 16 Dunn FG, Oigman W, Ventura HO, Messerli FH, Kobrin I, Frohlich ED.
Enalapril improves systemic and renal hemodynamics and allows regression of left ventricular mass in essential hypertension. *Am J Cardiol*. 1984;53:105-108.
- 17 Steele RE, Wekstein DR. Effects of throxine on calorogenic response of the newborn rat to norepinephrine. *Am J Physiol*. 1973;224:979-984.
- 18 Hernandez A, Obregon MJ. T3 potentiates the adrenergic stimulation of type II 5'-deiodinase activity in cultured rat brown adipocytes. *Am J Physiol*. 1996;271:E15-E23.
- 19 Lowell BB, Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*. 2000;404:652-660.
- 20 Rubio A, Raasmaja A, Silva JE. Thyroid hormone and norepinephrine signaling in brown adipose tissue. II: Differential effects of thyroid hormone on beta 3-adrenergic receptors in brown and white adipose tissue. *Endocrinology*. 1995;136:3277-3284.
- 21 Mano T, Sakamoto H, Fujita K, Makino M, Kakizawa H, Nagata M, Kotake M, Hamada M, Uchimura K, Hayakawa N, Hayashi R, Nakai A, Itoh M, Kuzuya

- H, Nagasaka A. Effects of thyroid hormone on catecholamine and its metabolite concentrations in rat cardiac muscle and cerebral cortex. *Thyroid*. 1998;8:353-358.
- 22 Woeber KA. Thyrotoxicosis and the heart. *N Engl J Med*. 1992;327:94-98.
- 23 Queiroz MS, Shao Y, Berkich DA, Lanoue KF, Ismail-Beigi F. Thyroid hormone regulation of cardiac bioenergetics: role of intracellular creatine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H2527-H2533.
- 24 Buccino RA, Spann JF, Jr., Pool PE, Sonnenblick EH, Braunwald E. Influence of the thyroid state on the intrinsic contractile properties and energy stores of the myocardium. *J Clin Invest*. 1967;46:1669-1682.
- 25 Liggett SB, Shah SD, Cryer PE. Increased fat and skeletal muscle beta-adrenergic receptors but unaltered metabolic and hemodynamic sensitivity to epinephrine in vivo in experimental human thyrotoxicosis. *J Clin Invest*. 1989;83:803-809.
- 26 Polikar R, Burger AG, Scherrer U, Nicod P. The thyroid and the heart. *Circulation*. 1993;87:1435-1441.
- 27 Fanburg BL. Calcium transport by skeletal muscle sarcoplasmic reticulum in the hypothyroid rat. *J Clin Invest*. 1969;47:2499-2506.

- 28 Gold HK, Spann JF, Jr., Braunwald E. Effect of alterations in the thyroid state on the intrinsic contractile properties of isolated rat skeletal muscle. *J Clin Invest.* 1970;49:849-854.
- 29 Ianuzzo D, Patel P, Chen V, O'Brien P, Williams C. Thyroidal trophic influence on skeletal muscle myosin. *Nature.* 1977;270:74-76.
- 30 Winder WW, Holloszy JO. Response of mitochondria of different types of skeletal muscle to thyrotoxicosis. *Am J Physiol.* 1977;232:C180-C184.
- 31 Baldwin KM, Ernst SB, Herrick RE, Hooker AM, Mullin WJ. Exercise capacity and cardiac function in trained and untrained thyroid-deficient rats. *J Appl Physiol.* 1980;49:1022-1026.
- 32 Baldwin KM, Hooker AM, Herrick RE, Schrader LF. Respiratory capacity and glycogen depletion in thyroid-deficient muscle. *J Appl Physiol.* 1980;49:102-106.
- 33 Fitts RH, Winder WW, Brooke MH, Kaiser KK, Holloszy JO. Contractile, biochemical, and histochemical properties of thyrotoxic rat soleus muscle. *Am J Physiol.* 1980;238:C14-C20.
- 34 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:C285-C295.

- 35 Fitzsimons DP, Herrick RE, Baldwin KM. Isomyosin distributions in rodent muscles: effects of altered thyroid state. *J Appl Physiol.* 1990;69:321-327.
- 36 Oppenheimer JH, Schwartz HL, Mariash CN, Kinlaw WB, Wong NC, Froke HC. Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level. *Endocr Rev.* 1987;8:288-308.
- 37 Angeras U, Hasselgren PO. Protein degradation in skeletal muscle during experimental hyperthyroidism in rats and the effect of beta-blocking agents. *Endocrinology.* 1987;120:1417-1421.
- 38 Olson BR, Klein I, Benner R, Burdett R, Trzepacz P, Levey GS. Hyperthyroid myopathy and the response to treatment. *Thyroid.* 1991;1:137-141.
- 39 Himms-Hagen J. Role of thermogenesis in the regulation of energy balance in relation to obesity. *Can J Physiol Pharmacol.* 1989;67:394-401.
- 40 Silva JE, Rabelo R. Regulation of the uncoupling protein gene expression. *Eur J Endocrinol.* 1997;136:251-264.
- 41 Fleury C, Sanchis D. The mitochondrial uncoupling protein-2: current status. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999;31:1261-1278.

- 42 Schonfeld P, Wieckowski MR, Wojtczak L. Thyroid hormone-induced expression of the ADP/ATP carrier and its effect on fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.* 1997;416:19-22.
- 43 Boss O, Hagen T, Lowell BB. Uncoupling proteins 2 and 3: potential regulators of mitochondrial energy metabolism. *Diabetes.* 2000;49:143-156.
- 44 Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D, Warden CH. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet.* 1997;15:269-272.
- 45 Gong DW, He Y, Karas M, Reitman M. Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3-adrenergic agonists, and leptin. *J Biol Chem.* 1997;272:24129-24132.
- 46 Silva JE. Full expression of uncoupling protein gene requires the concurrence of norepinephrine and triiodothyronine. *Mol Endocrinol.* 1988;2:706-713.
- 47 Boss O, Samec S, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P, Giacobino JP. Tissue-dependent upregulation of rat uncoupling protein-2 expression in response to fasting or cold. *FEBS Lett.* 1997;412:111-114.
- 48 Boss O, Samec S, Kuhne F, Bijlenga P, Assimacopoulos-Jeannet F, Seydoux J, Giacobino JP, Muzzin P. Uncoupling protein-3 expression in rodent skeletal

muscle is modulated by food intake but not by changes in environmental temperature. *J Biol Chem.* 1998;273:5-8.

- 49 Millet L, Vidal H, Andreelli F, Larrouy D, Riou JP, Ricquier D, Laville M, Langin D. Increased uncoupling protein-2 and -3 mRNA expression during fasting in obese and lean humans. *J Clin Invest.* 1997;100:2665-2670.
- 50 Weigle DS, Selfridge LE, Schwartz MW, Seeley RJ, Cummings DE, Havel PJ, Kuijper JL, BeltrandelRio H. Elevated free fatty acids induce uncoupling protein 3 expression in muscle: a potential explanation for the effect of fasting. *Diabetes.* 1998;47:298-302.
- 51 Goglia F, Moreno M, Lanni A. Action of thyroid hormones at the cellular level: the mitochondrial target. *FEBS Lett.* 1999;452:115-120.
- 52 Fenske HC, Oppenheimer JH. Thermogenesis and thyroid function. *Annu Rev Nutr.* 1995;15:263-291.
- 53 Silva JE. The thermogenic effect of thyroid hormone and its clinical implications. *Ann Intern Med.* 2003;139:205-213.
- 54 Solanes G, Pedraza N, Calvo V, Vidal-Puig A, Lowell BB, Villarroya F. Thyroid hormones directly activate the expression of the human and mouse uncoupling protein-3 genes through a thyroid response element in the proximal promoter region. *Biochem J.* 2004;

- 55 Capo LA, Sillau AH. The effect of hyperthyroidism on capillarity and oxidative capacity in rat soleus and gastrocnemius muscles. *J Physiol.* 1983;342:1-14.
- 56 Paradies G, Ruggiero FM, Petrosillo G, Quagliariello E. Enhanced cytochrome oxidase activity and modification of lipids in heart mitochondria from hyperthyroid rats. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1225:165-170.
- 57 Tata JR, ERNSTER L, LINDBERG O, ARRHENIUS E, PEDERSEN S, HEDMAN R. The action of thyroid hormones at the cell level. *Biochem J.* 1963;86:408-428.
- 58 Winder WW, Holloszy JO. Response of mitochondria of different types of skeletal muscle to thyrotoxicosis. *Am J Physiol.* 1977;232:C180-C184.
- 59 Paradies G, Ruggiero FM. Effect of hyperthyroidism on the transport of pyruvate in rat-heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1988;935:79-86.
- 60 Sillau AH, Ernst V, Reyes N. Oxidative capacity distribution in the cardiac myocytes of hypermetabolic rats. *Respir Physiol.* 1990;79:279-291.
- 61 Bobyleva V, Pazienza TL, Maseroli R, Tomasi A, Salvioli S, Cossarizza A, Franceschi C, Skulachev VP. Decrease in mitochondrial energy coupling by thyroid hormones: a physiological effect rather than a pathological hyperthyroidism consequence. *FEBS Lett.* 1998;430:409-413.

- 62 Hafner RP, Nobes CD, McGown AD, Brand MD. Altered relationship between protonmotive force and respiration rate in non-phosphorylating liver mitochondria isolated from rats of different thyroid hormone status. *Eur J Biochem.* 1988;178:511-518.
- 63 Harper ME, Brand MD. Hyperthyroidism stimulates mitochondrial proton leak and ATP turnover in rat hepatocytes but does not change the overall kinetics of substrate oxidation reactions. *Can J Physiol Pharmacol.* 1994;72:899-908.
- 64 Harper ME, Ballantyne JS, Leach M, Brand MD. Effects of thyroid hormones on oxidative phosphorylation. *Biochem Soc Trans.* 1993;21 (Pt 3):785-792.
- 65 Hafner RP, Nobes CD, McGown AD, Brand MD. Altered relationship between protonmotive force and respiration rate in non-phosphorylating liver mitochondria isolated from rats of different thyroid hormone status. *Eur J Biochem.* 1988;178:511-518.
- 66 Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P, Giacobino JP. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett.* 1997;408:39-42.
- 67 Lombardi A, Silvestri E, Moreno M, de Lange P, Farina P, Goglia F, Lanni A. Skeletal muscle mitochondrial free-fatty-acid content and membrane potential

sensitivity in different thyroid states: involvement of uncoupling protein-3 and adenine nucleotide translocase. *FEBS Lett.* 2002;532:12-16.

- 68 Clapham JC, Arch JR, Chapman H, Haynes A, Lister C, Moore GB, Piercy V, Carter SA, Lehner I, Smith SA, Beeley LJ, Godden RJ, Herrity N, Skehel M, Changani KK, Hockings PD, Reid DG, Squires SM, Hatcher J, Trail B, Latcham J, Rastan S, Harper AJ, Cadenas S, Buckingham JA, Brand MD, Abuin A. Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature.* 2000;406:415-418.
- 69 Nagase I, Yoshida T, Saito M. Up-regulation of uncoupling proteins by beta-adrenergic stimulation in L6 myotubes. *FEBS Lett.* 2001;494:175-180.
- 70 Viengchareun S, Penfornis P, Zennaro MC, Lombes M. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors inhibit UCP expression and function in brown adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;280:E640-E649.
- 71 Ismail-Beigi F, Edelman IS. Time-course of the effects of thyroid hormone on respiration and $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase activity in rat liver. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1974;146:983-988.
- 72 Somjen D, Ismail-Beigi F, Edelman IS. Nuclear binding of T3 and effects of QO_2 , Na-K-ATPase, and alpha-GPDH in liver and kidney. *Am J Physiol.* 1981;240:E146-E154.

- 73 Ishac EJ, Eskay R, Hirata F, Axelrod J, Kunos G. Adrenergic regulation of beta-endorphin secretion from anterior pituitary in conscious rats: effects of thyroid state. *Endocrinology*. 1987;120:1073-1078.
- 74 Evered MD, Robinson MM. Increased or decreased thirst caused by inhibition of angiotensin-converting enzyme in the rat. *J Physiol*. 1984;348:573-588.
- 75 Levens NR, Peach MJ, Vaughan ED, Jr., Weed WC, Carey RM. Responses of blood pressure and angiotensin-converting enzyme activity to acute captopril administration in normotensive and hypertensive rats. *Endocrinology*. 1981;108:536-544.
- 76 Lopez-Sela P, Brime JJ, Diaz F, Marin B, Costales M, Vijande M. Effects of inhibitors of the renin-angiotensin system on water intake after insulin administration. *Appetite*. 1989;13:143-154.
- 77 Culmsee C, Stumm RK, Schafer MK, Weihe E, Kriegstein J. Clenbuterol induces growth factor mRNA, activates astrocytes, and protects rat brain tissue against ischemic damage. *Eur J Pharmacol*. 1999;379:33-45.
- 78 McElroy JF, O'Donnell JM. Discriminative stimulus properties of clenbuterol: evidence for beta adrenergic involvement. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988;245:155-163.

- 79 Moore NG, Pegg GG, Sillence MN. Anabolic effects of the beta 2-adrenoceptor agonist salmeterol are dependent on route of administration. *Am J Physiol.* 1994;267:E475-E484.
- 80 von Deutsch DA, Abukhalaf IK, Wineski LE, Aboul-Enein HY, Pitts SA, Parks BA, Oster RA, Paulsen DF, Potter DE. Beta-agonist-induced alterations in organ weights and protein content: comparison of racemic clenbuterol and its enantiomers. *Chirality.* 2000;12:637-648.
- 81 Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry.* 1979;18:5294-5299.
- 82 Pressley TA, Ismail-Beigi F, Gick GG, Edelman IS. Increased abundance of Na⁺-K⁺-ATPase mRNAs in response to low external K⁺. *Am J Physiol.* 1988;255:C252-C260.
- 83 Thomas PS. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77:5201-5205.
- 84 Chaudhury S, Ismail-Beigi F, Gick GG, Levenson R, Edelman IS. Effect of thyroid hormone on the abundance of Na,K-adenosine triphosphatase alpha-subunit messenger ribonucleic acid. *Mol Endocrinol.* 1987;1:83-89.

- 85 Oppenheimer J, Samuels H. Molecular basis of thyroid hormone action. 1983;498-
- 86 Dunn FG, Oigman W, Ventura HO, Messerli FH, Kobrin I, Frohlich ED. Systemic and renal effects of enalapril and its effects on cardiac mass. J Hypertens Suppl. 1984;2:S57-S61.
- 87 Gerdes AM, Moore JA, Bishop SP. Failure of propranolol to prevent chronic hyperthyroid induced cardiac hypertrophy and multifocal cellular necrosis in the rat. Can J Cardiol. 1985;1:340-345.
- 88 Gerdes AM, Moore JA, Hines JM. Regional changes in myocyte size and number in propranolol-treated hyperthyroid rats. Lab Invest. 1987;57:708-713.
- 89 Feely J, Forrest A, Gunn A, Hamilton W, Stevenson I, Crooks J. Propranolol dosage in thyrotoxicosis. J Clin Endocrinol Metab. 1980;51:658-661.
- 90 Murakami S, Nasu M, Fukayama H, Krishnan L, Sugawara M. Propranolol has direct antithyroid activity: inhibition of iodide transport in cultured thyroid follicles. Cell Biochem Funct. 1993;11:159-165.
- 91 Jones MK, John R, Jones GR. The effect of oxprenolol, acebutolol and propranolol on thyroid hormones in hyperthyroid subjects. Clin Endocrinol (Oxf). 1980;13:343-347.

- 92 Franklyn JA, Wilkins MR, Wilkinson R, Ramsden DB, Sheppard MC. The effect of propranolol on circulating thyroid hormone measurements in thyrotoxic and euthyroid subjects. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1985;108:351-355.
- 93 Nies AS, Shand DG. Clinical pharmacology of propranolol. *Circulation*. 1975;52:6-15.
- 94 Bedotto JB, Gay RG, Graham SD, Morkin E, Goldman S. Cardiac hypertrophy induced by thyroid hormone is independent of loading conditions and beta adrenoceptor blockade. *J Pharmacol Exp Ther*. 1989;248:632-636.
- 95 Antonaccio MJ, McGill M. Comparative effects of captopril and MK 421 on sympathetic function in spontaneously hypertensive rats. *Am J Cardiol*. 1982;49:1533-1534.
- 96 Higashimori K, Nakamaru M, Tabuchi Y, Nagano M, Mikami H, Ogihara T, Inagami T. Angiotensin converting enzyme inhibitors suppress the vascular renin-angiotensin system of spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 1991;4:56S-59S.
- 97 Iwao H, Fukui K, Yamamoto A, Shoji T, Abe Y. Effects of captopril on plasma atrial natriuretic polypeptide and the renin angiotensin system in rats. *Clin Exp Hypertens A*. 1987;9:697-701.

- 98 Freeman GL, Little WC, Haywood JR. Reduction of left ventricular mass in normal rats by captopril. *Cardiovasc Res.* 1987;21:323-327.
- 99 Carraway JW, Park S, McCune SA, Holycross BJ, Radin MJ. Comparison of irbesartan with captopril effects on cardiac hypertrophy and gene expression in heart failure-prone male SHHF/Mcc-fa(cp) rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999;33:451-460.
- 100 Liu X, Sentex E, Golfman L, Takeda S, Osada M, Dhalla NS. Modification of cardiac subcellular remodeling due to pressure overload by captopril and losartan. *Clin Exp Hypertens.* 1999;21:145-156.
- 101 Komine N, Khang S, Wead LM, Blantz RC, Gabbai FB. Effect of combining an ACE inhibitor and an angiotensin II receptor blocker on plasma and kidney tissue angiotensin II levels. *Am J Kidney Dis.* 2002;39:159-164.
- 102 Taegtmeyer H, Razeghi P, Young ME. Mitochondrial proteins in hypertrophy and atrophy: a transcript analysis in rat heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002;29:346-350.
- 103 Winder WW, Holloszy JO. Response of mitochondria of different types of skeletal muscle to thyrotoxicosis. *Am J Physiol.* 1977;232:C180-C184.
- 104 Winder WW. Time course of the T3- and T4-induced increase in rat soleus muscle mitochondria. *Am J Physiol.* 1979;236:C132-C138.

- 105 Jucker BM, Dufour S, Ren J, Cao X, Previs SF, Underhill B, Cadman KS, Shulman GI. Assessment of mitochondrial energy coupling in vivo by $^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:6880-6884.
- 106 Lanni A, De Felice M, Lombardi A, Moreno M, Fleury C, Ricquier D, Goglia F. Induction of UCP2 mRNA by thyroid hormones in rat heart. *FEBS Lett*. 1997;418:171-174.
- 107 Larkin S, Mull E, Miao W, Pittner R, Albrandt K, Moore C, Young A, Denaro M, Beaumont K. Regulation of the third member of the uncoupling protein family, UCP3, by cold and thyroid hormone. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;240:222-227.
- 108 Masaki T, Yoshimatsu H, Kakuma T, Hidaka S, Kurokawa M, Sakata T. Enhanced expression of uncoupling protein 2 gene in rat white adipose tissue and skeletal muscle following chronic treatment with thyroid hormone. *FEBS Lett*. 1997;418:323-326.
- 109 de Lange P, Lanni A, Beneduce L, Moreno M, Lombardi A, Silvestri E, Goglia F. Uncoupling protein-3 is a molecular determinant for the regulation of resting metabolic rate by thyroid hormone. *Endocrinology*. 2001;142:3414-3420.
- 110 Short KR, Nygren J, Barazzoni R, Levine J, Nair KS. T(3) increases mitochondrial ATP production in oxidative muscle despite increased

expression of UCP2 and -3. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;280:E761-E769.

- 111 Nakamura Y, Nagase I, Asano A, Sasaki N, Yoshida T, Umekawa T, Sakane N, Saito M. Beta 3-adrenergic agonist up-regulates uncoupling proteins 2 and

skeletal muscle of the mouse. *J Vet Med Sci.* 2001;63:309-314.

Cherrier D, Bouillaud F, Toumelin P, Mory G, Bazin R, Arch J, Penicaud L.

Expression of uncoupling protein mRNA in thermogenic or weakly thermogenic brown adipose tissue. Evidence for a rapid beta-adrenoreceptor-mediated and transcriptionally regulated step during activation of thermogenesis. *J Biol Chem.* 1986;261:13905-13910.

- 113 Rajab P, Fox J, Riaz S, Tomlinson D, Ball D, Greenhaff PL. Skeletal muscle myosin heavy chain isoforms and energy metabolism after clenbuterol treatment in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;279:R1076-R1081.