

LUCAS GUIMARÃES FERREIRA

**EFEITO DO HORMÔNIO TIREOIDEANO SOBRE A
EXPRESSÃO GÊNICA DO TRANSPORTADOR DE
CREATINA (SLC6A8: CreaT) NA MUSCULATURA
ESQUELÉTICA E CARDÍACA DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**São Paulo
2008**

LUCAS GUIMARÃES FERREIRA

**EFEITO DO HORMÔNIO TIREOIDEANO SOBRE A
EXPRESSÃO GÊNICA DO TRANSPORTADOR DE
CREATINA (SLC6A8: CreaT) NA MUSCULATURA
ESQUELÉTICA E CARDÍACA DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana, na sub-área: Fisiologia Endócrina, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof.^a Maria Tereza Nunes

**São Paulo
2008**

RESUMO

FERREIRA, L. G. Efeito do hormônio tireoideano sobre a expressão gênica do transportador de creatina (SLC6A8: Creat) na musculatura esquelética e cardíaca de ratos. 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

A creatina (Cr) é uma reserva de fosfato de alta energia, sendo a fonte mais rápida de restauração do ATP intracelular. Como a grande maioria dos tecidos não sintetizam Cr, uma proteína denominada CreaT (SLC6A8) é responsável pela captação da mesma para o meio intracelular. Os hormônios tireoideanos T_3 e T_4 (HT) participam de forma importante na manutenção da taxa metabólica, aumentando a síntese e consumo de ATP, por meio da regulação transcricional e pós-transcricional de diferentes genes-alvo. Neste sentido, o presente estudo avaliou os efeitos do T_3 sobre a expressão gênica do CreaT e a regulação dos níveis intracelulares de Cr nos músculos esquelético e cardíaco. Para tanto, ratos Wistar machos (200-250 g), foram divididos em: grupo controle (eutireoideo), hipotireoideo (devido à tireoidectomia cirúrgica), hipotireoideo tratado com T_3 em diferentes doses (0,3 a 100 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, ip, 5 dias: curva dose-resposta) e hipotireoideo tratado com dose de saturação de receptores de T_3 (100 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, ev) e sacrificados após 30 min, 1, 2, 6, 12 e 24h (tempo-resposta). Além disso, animais eutireoideos foram tratados com Cr monohidratada (0,30 mg/g, por 5 dias, seguido de 0,08 mg/g por 10 dias) para avaliar se o aumento da disponibilidade de Cr resulta na regulação da expressão de seu transportador. Ao término do tratamento, os animais foram sacrificados e os músculos sóleo e extensor longo dos dedos (EDL), bem como parte do coração, foram removidos para análise da expressão gênica do CreaT por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real e do conteúdo total de Cr por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Em todos os tecidos, a indução do estado hipotireoideo levou a um

aumento significativo na expressão do CreaT. Entretanto, os níveis intracelulares de Cr só se mostraram elevados no músculo EDL. O tratamento crônico com doses suprafisiológicas de T₃ por 5 dias promoveu uma diminuição marcante na expressão do CreaT nos três músculos, apesar de somente no coração o conteúdo de Cr mostrar-se diminuído. O tratamento agudo, levou a um aumento da expressão após 6 e 2 horas no coração e sóleo, respectivamente. No EDL não houve modificação. O tratamento agudo resultou em aumento do conteúdo de Cr somente no sóleo, retornando a valores basais após 24 horas. A suplementação com Cr ocasionou um aumento da expressão do CreaT no coração e no sóleo e uma diminuição no EDL. Os níveis intracelulares de Cr não se mostraram modificados. Estes dados demonstram a complexidade da regulação do transporte de Cr em diferentes tipos de músculos, e podem explicar parte dos efeitos deletérios de altas doses de HT nos músculos esqueléticos e cardíaco.

Palavras-chaves: Hormônio tireoideano; Músculo esquelético; Músculo cardíaco; Creatina; Transportador de creatina.

ABSTRACT

FERREIRA, L. G. Effect of thyroid hormone upon creatine transporter (CreaT: SLC6A8) gene expression in skeletal and cardiac muscles in rats. 2008. 77 p. Master Thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Creatine (Cr) is a high energy phosphate reservoir and the fastest source for intracellular ATP regeneration. As the vast majority of tissues do not synthesize Cr, a protein called CreaT (SLC6A8) is responsible for Cr uptake to the intracellular medium. The thyroid hormones T_3 and T_4 play a key role on the maintenance of basal metabolic rate, increasing the synthesis and the degradation of ATP through transcriptional and post-transcriptional regulation of target-genes. In this study, we explore the effects of T_3 on CreaT gene expression and regulation of intracellular pool of Cr in skeletal and cardiac muscles. Wistar male rats (200-250 g) were divided in control groups (euthyroid), hypothyroid (by surgical removal of thyroid gland), hypothyroid treat with several doses of T_3 (0,3 to 100 ug/100 g, ip, 5 days: dose-response curve) and hypothyroid treated with T_3 receptors saturation doses (100 ug/100 g, ev), killed after 30 min, 1, 2, 6, 12 and 24 hours (time-course). Moreover, euthyroid animals were treated with Cr monohydrate (0,30 mg/g, for 5 days, following 0,08 mg/g by 10 dias) to study if the increased availability of Cr can modulate the CreaT expression. Following the treatments, animals were killed and the soleus, EDL and cardiac muscles removed for CreaT gene expression and total Cr intracellular content analysis, by real time polymerase chain reaction (PCR) and high performance liquid chromatography (HPLC), respectively. In all tissues, hypothyroidism promotes a significant increase in CreaT expression. The intracellular levels of Cr, however, increase only in EDL. Chronic treatment with supra-physiological doses of T_3 for 5 days promote a great reduction in CreaT expression in all muscles analyzed, although only in cardiac muscle the Cr content decreased. The acute treatment increased the CreaT expression after 6 and 2

hours in heart and soleus, respectively. In EDL, the expression was not modified. The acute treatment led to an increase in Cr content only in soleus, returning to basal levels after 24 hours. Cr supplementation promotes an increase in CreaT gene expression in heart and soleus, and a reduction in EDL. The intracellular levels of Cr were not modified. These results show a complexity of Cr transport regulation in different types of muscles, and might explain some of the deleterious effects of high doses of thyroid hormones in skeletal and cardiac muscles.

Key words: Thyroid hormone; Skeletal muscle; Cardiac muscle; Creatine; Creatine transporter.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O SISTEMA DA FOSFOCREATINA / CREATINA QUINASE

A contração muscular é reconhecida há muito tempo como um processo que depende da energia derivada de reações químicas na célula. Fletcher e Hopkins, em 1907, verificaram que os níveis de ácido láctico no músculo aumentavam à medida que estes eram estimulados até a fadiga¹ (apud BESSEMAN e GEIGER, 1981). Posteriormente, foi demonstrado que o ácido láctico era proveniente do glicogênio muscular, que fornece a energia necessária para o trabalho contrátil.

Mais tarde, em 1927, a fosfocreatina (PCr) foi descoberta (EGGLETON e EGGLETON, 1927; FISKE e SUBBAROW, 1927). Lipmann e Meyerhof (1930; apud BESSEMAN & GEIGER, 1981) demonstraram que a quebra da PCr ocorre durante a contração muscular, havendo a liberação de creatina livre (Cr). Neste momento, atribuiu-se à PCr o papel de molécula capaz de prover a energia química para a contração. Ao ATP, descoberto pouco tempo depois, foi atribuída a função de regenerar a PCr, através da doação de um grupamento fosfato, via ação da enzima creatina quinase (CK, Modelo I, Figura 1A).

Em 1962, Cain e Davies, ao inibirem a CK com fluorodinitrobenzeno, verificaram que os níveis de PCr e Cr permaneciam constantes enquanto que os de ATP diminuía rapidamente até que as contrações musculares não mais podiam ocorrer. Além disso, foi demonstrado que a actomiosina só era capaz de se contrair com a adição de ATP (ENGLEHARDT e LJUBIMOVA, 1939). Esses achados levaram à constatação de que o ATP era o elemento essencial para o processo contrátil, mas que a sua ressíntese estava vinculada à síntese de PCr,

¹ Em FLETCHER, W. M.; HOPKINS, F. G. **J. Physiol.**, v. 35, p. 247, 1907.

que passou a ser considerada um tampão, cuja principal função seria a de regenerar o ATP (Modelo II, Figura 1B).

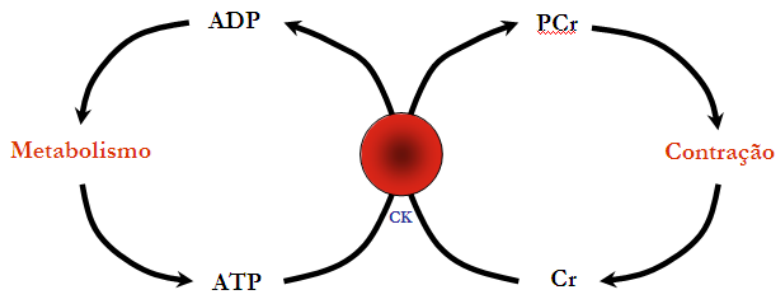
Na década de 70 surgiram, então, novas evidências sugerindo outras funções para a PCr. Demonstrou-se que após cerca de 1 minuto da indução de isquemia, ocorria interrupção da contração muscular, apesar dos níveis intracelulares de ATP apresentarem-se diminuídos em somente 20%; ainda, foi observado que nessa condição a PCr encontrou-se quase que completamente exaurida (GUDBJARNASON et al., 1970). Já havia sido descrito, no momento, a presença de diferentes isoformas de CK (JACOBS et al., 1964) com localizações subcelulares distintas. Estes achados, somados aos primeiros experimentos que demonstraram que o suprimento com Cr promovia um estímulo à respiração mitocondrial fundaram as bases da chamada teoria da “lançadeira de fosfocreatina”, proposta formalmente por Bessman² em 1972 (apud BESSMAN e GEIGER, 1981).

Neste modelo (Modelo III, Figura 1C), o fosfato de alta energia é transferido do ATP formado no processo de fosforilação oxidativa na mitocôndria (sítio de produção de ATP) para a Cr, via CK mitocondrial (CKmit), gerando PCr e ADP. A PCr se difunde para o citoplasma onde, via ação das isoformas citosólicas de CK (CK-BB, CK-MB e CK-MM), gera ATP e Cr. O ATP é então utilizado pelas ATPases citosólicas (sítios de utilização de ATP) enquanto que a Cr retorna para o interior da mitocôndria. Esta possui uma permeabilidade muito maior à membrana mitocondrial que os nucleotídeos de adenina, além de estar presente em níveis mais altos no meio intracelular. Desta forma, através de um sistema de compartimentalização espacial das isoformas de CK na célula, o sistema de “lançadeira” permite uma transferência do fosfato de alta energia, presente no ATP, da mitocôndria para o citosol (BESSMAN e GEIGER, 1981; WALLIMANN et al., 1992).

² Em BESSMAN, S. P. *Israel J. Med. Sci.*, v. 8, p. 344, 1972.

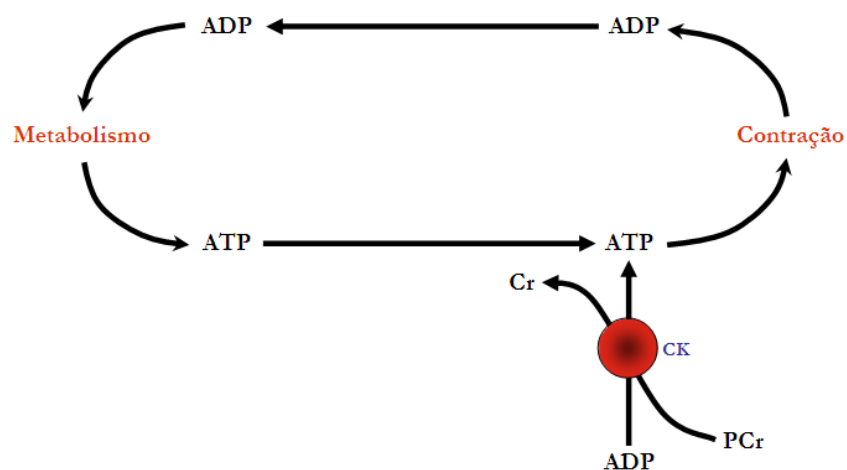
Modelo I: 1932 - 1962

A



Modelo II: 1962 - 1970

B



Modelo III: anos 70 em diante

C

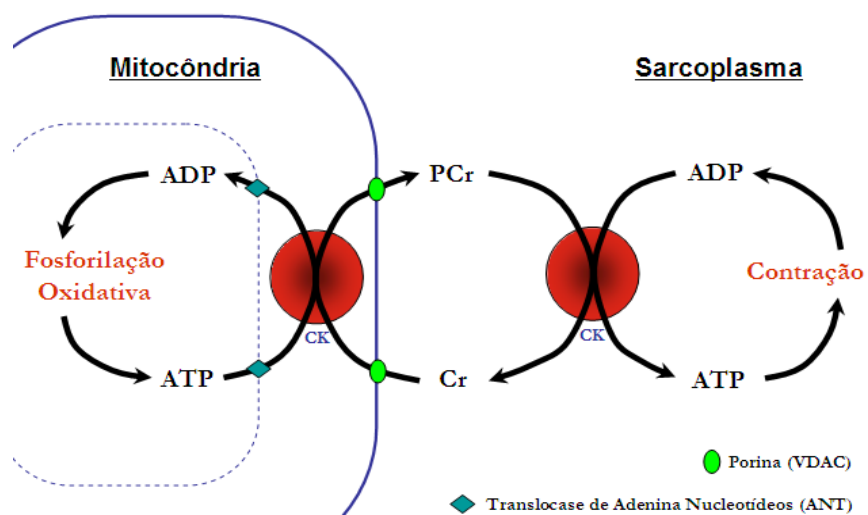


Figura 1: História do sistema da fosfocreatina / creatina quinase ao longo dos anos. Adaptado de Neubauer (1998).

O simples aumento das concentrações intracelulares de ATP para estocagem de energia não seria uma estratégia eficiente, uma vez que as concentrações locais de ATP, ADP e AMP, bem como a relação ATP/ADP, são reguladores-chave de muitos processos metabólicos celulares. Desta forma, são necessários mecanismos capazes de regenerar o ATP, tornando-o disponível nos sítios utilizadores de energia na célula.

A atividade contrátil envolve dois eventos principais: modificações iônicas, especialmente nas concentrações intracelulares de cálcio, e a ativação da miosina ATPase. Estes eventos formam um sistema de transdução químico-mecânica, que leva ao processo de excitação-contração, em que a despolarização da membrana desencadeia o influxo de cálcio. Assim, mais cálcio é liberado do retículo sarcoplasmático, levando à ativação da miosina ATPase e desencadeando o processo de contração muscular. O processo de relaxamento necessita da ativação de Ca^{2+} -ATPases do retículo sarcoplasmático, que resulta no bombeamento deste íon para o interior do retículo e no restauro dos níveis basais de cálcio intracelular. Desta forma, as principais reações químicas que utilizam ATP, no músculo esquelético e cardíaco, estão associadas ao acoplamento excitação-contração: a miosina ATPase nas miofibrilas, a Ca^{2+} -ATPase no retículo sarcoplasmático e a Na^+/K^+ -ATPase no sarcolema. Foi demonstrado que a CK encontra-se localizada nestes sítios, acoplada funcionalmente a estas ATPases.

A Cr é um composto que contém carbono, hidrogênio e nitrogênio (PERSKY et al., 2003). A primeira reação na síntese de Cr é a transferência do grupamento amidino da L-arginina para a glicina, formando L-ornitina e guanidinoacetato, através da ação da L-arginina glicina amidinotransferase (AGAT). O guanidinoacetato formado é então metilado, formando a Cr, etapa que ocorre pela ação da guanidinoacetato metiltransferase (GAMT). Em mamíferos, o pâncreas contém altos níveis de ambas as enzimas, enquanto que os rins possuem altos níveis de AGAT e baixos de GAMT. Já no fígado, a GAMT é altamente expressa. Desta forma, a principal via de biossíntese da Cr parece

envolver a formação de guanidinoacetato nos rins, e o seu transporte através da corrente sanguínea até o fígado, onde é metilado (WYSS e WALLIMANN, 1994). A Cr formada volta para a circulação tornando-se disponível para ser captada pelos tecidos (Figura 2). Por esta razão, ratos nefrectomizados apresentam uma redução drástica na produção de Cr (HORNER, 1959; FITCH et al., 1961).

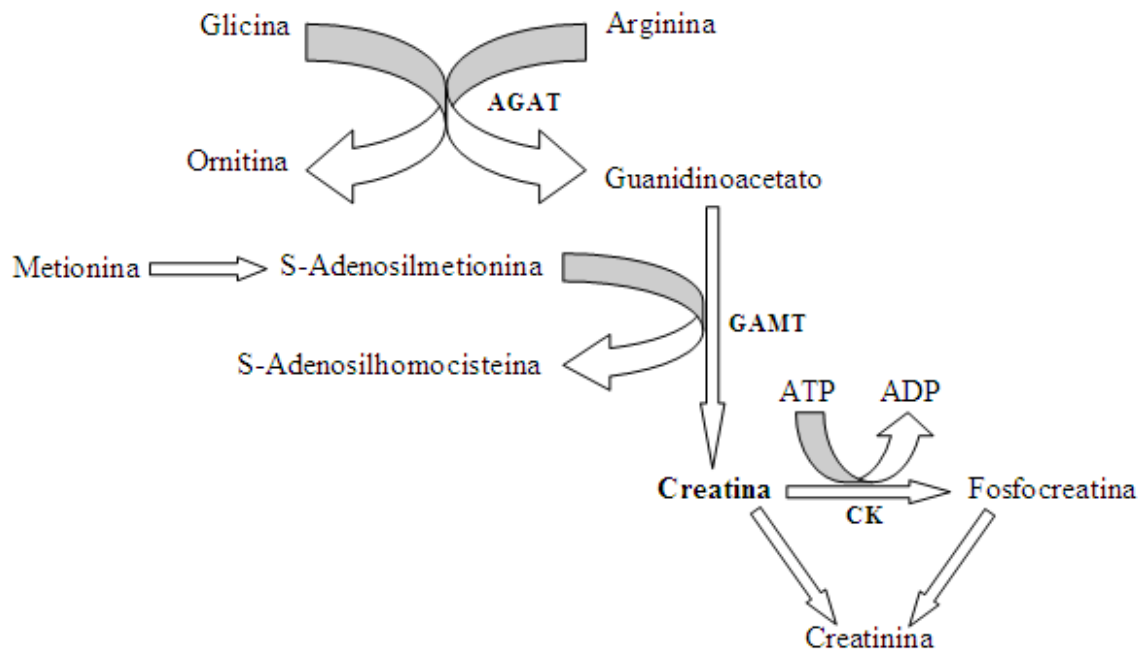


Figura 2: Metabolismo da creatina. Adaptado de Wyss e Kaddurah-Daouk (2000) e Persky et al. (2003).

Diariamente, aproximadamente 2 g de Cr são convertidos, através de reação não-enzimática, em creatinina que atravessa livremente a membrana celular sendo posteriormente excretada pelos rins (GREENHAFF, 1997; WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000). A reposição dos estoques de Cr se dá tanto por síntese endógena quanto pela ingestão alimentar na dieta onívora típica. Os estoques intracelulares de Cr total giram em torno de 120-125 mmol/kg de peso

seco, resultando em cerca de 120 g para um indivíduo de 70 kg, sendo 95 % deste valor encontrado no músculo esquelético (PERSKY et al., 2003).

1.2 TRANSPORTADOR DE CREATINA

Como os principais tecidos não são capazes de produzir a Cr, eles dependem de uma proteína para realizar o seu transporte do meio extracelular para o interior das células, o que ocorre contra um gradiente de concentração. Esta proteína foi identificada e denominada de CreaT, sendo caracterizadas duas isoformas da mesma: o CreaT1 e o CreaT2. Eles pertencem a uma família de transportadores de neurotransmissores dependentes de Na^+/Cl^- , denominada SLC6, ou *solute carrier family 6* (GUIMBAL e KILIMANN., 1993). O CreaT2 (SLC6A10 - *solute carrier family 6, member 10*) é expresso apenas nos testículos, de modo que o CreaT1 (SLC6A8 - *solute carrier class 6, member 8*), por ter uma expressão mais ubíqua é considerado o principal transportador de Cr, razão pela qual é denominado simplesmente por CreaT.

O CreaT é uma proteína integral de membrana, com 12 domínios transmembrana e aproximadamente 70,5 kDa, apresentando cadeia de 635 aminoácidos (SNOW e MURPHY, 2001). Sua estrutura é muito similar às dos transportadores de dopamina, GABA, taurina e noradrenalina, todos dependentes de Na^+/Cl^- . Três sítios de glicosilação foram encontrados ao longo da cadeia do CreaT, sendo dois nas alças extracelulares entre os domínios transmembrana 3 e 4 e um entre o 11 e 12 (SALTARELLI et al., 1996; SORA et al., 1994). Além disso, sítios de fosforilação foram identificados na terminação amino e carboxílica, bem como em alças intracelulares, totalizando cinco locais de fosforilação (SALTARELLI et al., 1996; SORA et al., 1994). Os estados de glicosilação e fosforilação da proteína são possíveis moduladores da atividade do CreaT e, conseqüentemente, da taxa de captação de Cr pela célula (NASH et al., 1994; ZHAO et al., 2002).

O CreaT foi identificado em diversos tecidos, como o músculo esquelético, cérebro, miocárdio, rins, testículos, fígado, pulmões, enterócitos, retina e eritrócitos (GUIMBAL e KILIMANN, 1993; SNOW e MURPHY, 2001; SPEER, et al., 2004; TOSCO et al., 2004; NAKASHIMA et al., 2004). Quanto à localização celular do transportador, foi demonstrado, através de imagem por fluorescência e análise imunohistoquímica, que o CreaT está localizado juntamente com a isoforma $\alpha 1$ da Na^+/K^+ ATPase e a enzima citrato sintase, presentes, respectivamente, nas membranas plasmática e mitocondrial (SNOW e MURPHY, 2001). O transporte da Cr através deste transportador utiliza um sistema de co-transporte com Cl^- e Na^+ , com estequiometria de 2 Na^+ e 1 Cl^- por molécula de Cr transportada (GARCIA-DELGADO et al., 2001 e PERAL et al., 2002), utilizando a energia do gradiente eletroquímico do Na^+ , gerado pela Na^+/K^+ ATPase (GUERRERO-ONTIVEROS e WALLIMANN, 1998).

O conteúdo intracelular de Cr e a quantidade do transportador possuem relação direta com a atividade da enzima Cr quinase e, conseqüentemente, com a taxa de refosforilação do ADP e formação de ATP (WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000), evidenciando a importância do CreaT para manter uma taxa de transferência de energia adequada nas células.

Demonstrou-se que a atividade do CreaT é regulada negativamente pela PKC (NASH et al., 1994), já que ativadores desta enzima, como o forbol 12-miristato 13-acetato, inibem a captação de Cr, de forma dependente do tempo e concentração (DAI et al., 1999). Outros transportadores da família SLC6 também são regulados distintamente pela PKC, o que indica que essa quinase participa da regulação da atividade dos transportadores de solutos dependentes de Na^+ e Cl^- (COREY et al., 1994; QIAN et al., 1997; LAW et al., 2000).

Por outro lado, há evidências de que a PKA e a mTOR (*mamalian target of rapamycin*) estejam envolvidas na ativação do CreaT (NASH et al., 1994; ODOOM et al., 1996), já que células musculares incubadas com o análogo do AMPc, N6,2'-O-dibutiriladenosina, apresentam aumento na taxa de captação de Cr e que em

células incubadas com rapamicina, um inibidor da mTOR, ocorre diminuição significativa do influxo de Cr (SHOJAIEFARD et al., 2006).

1.3 HORMÔNIOS TIREOIDEANOS

Os efeitos do hormônio tireoideano (HT) na modulação da expressão gênica têm início com a interação deste com seu receptor (TR), que se encontra associado na região promotora de genes responsivos ao HT, em uma sequência consenso denominada de Elemento Responsivo ao Hormônio Tireoideano (TRE), do que resulta a estimulação ou inibição da expressão destes genes (YEN, 2001).

Na ausência do hormônio, o receptor encontra-se associado a proteínas co-repressoras, sendo as principais o NcoR e a SMRT (HU e LAZAR, 2000). Uma vez ligado ao receptor, o hormônio tireoideano promove a dissociação destes co-repressores e a associação de co-ativadores. Desta forma, a transcrição dos genes-alvo é ativada (BARRA et al., 2004; YEN, 2001). Entretanto, além da ativação da transcrição de genes-alvo, os HT também podem reprimir, após ligação ao TR, a expressão de determinados genes.

Por meio deste mecanismo, o HT promove efeitos no metabolismo, diferenciação e crescimento celular, virtualmente em todos os tecidos. Entretanto, alguns efeitos do HT são evidenciados em tempo extremamente curto (segundos a poucos minutos) (DAVIS et al., 2005), bem como na presença de ciclohexamida ou actinomicina D, inibidores da síntese protéica e transcrição gênica, respectivamente, o que demonstra que o HT atua também por mecanismos independentes de transcrição gênica (LEONARD et al., 1990; DAVIS e DAVIS, 1996).

Essas ações não genômicas têm sido descritas em organelas citoplasmáticas, como mitocôndrias, onde aumenta o influxo de ADP, retículo

sarcoplasmático (RS), onde aumenta a atividade da bomba de Ca^{2+} do RS (SERCA), em proteínas do citoesqueleto, o que foi observado em células gliais, osteoblastos e células hipofisárias, onde o HT promove sua polimerização (GOULART DA SILVA et al., 2006) e na membrana plasmática, onde regula a atividade do trocador Na^+/H^+ e outros transportadores iônicos. A atividade de algumas quinases, como PKC, MAPK, PI3K e mTOR também é estimulada pelo HT (DAVIS e DAVIS, 1996; HOFFMAN et al., 2002; BERGH et al., 2005; DAVIS et al., 2005). Compostos que se ligam ao T_4 e T_3 , como agarose, impedindo-os de penetrar nas células não impedem que esses efeitos se manifestem, o que descarta que eles decorram da interação do HT com seus receptores nucleares, e sugere que esse “receptor” esteja presente na membrana celular.

Recentemente, demonstrou-se que os HT são capazes de se ligar à integrina $\alpha_v\beta_3$ (DAVIS et al., 2005). Essa proteína é um membro de uma grande família que integra sinais da matriz extracelular com o citoesqueleto, no meio intracelular, para mediar adesão e migração celular (PLOW et al., 2000). Posteriormente também foram identificados efeitos sobre o crescimento e diferenciação celular (QIN, 2004), o que estaria relacionado à ativação da MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) por este hormônio (HOFFMAN et al., 2002; BERGH et al., 2005).

Os HT exercem importantes efeitos sobre o metabolismo energético. Um dos primeiros a serem descritos refere-se ao aumento da taxa metabólica que ele induz, o que leva à produção de calor. Esses efeitos decorrem da ativação dos ciclos fúteis (síntese e catabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas) o que leva a uma grande produção e hidrólise de ATP, sendo que, em ambos os processos gera-se calor. Ainda, aumenta a expressão gênica, bem como a atividade de ATPases, como a SERCA e a bomba de Na^+/K^+ , as quais são importantes fontes de calor, pela hidrólise de ATP que provocam.

Nesse sentido, o elevado consumo de ATP promovido pelo HT exige que uma regeneração do mesmo ocorra em igual nível, o que pode se dar por meio da

maior utilização de glicose e ácidos graxos, o que gera ATP. No entanto a fonte mais rápida de regeneração de ATP é a PCr, composto que apresenta uma ligação fosfato altamente energética que, quando hidrolisada, libera energia suficiente para promover a ligação de um fosfato ao ADP, regenerando assim o ATP. Nesse sentido torna-se interessante avaliar o papel do HT na expressão do gene que codifica o CreaT, proteína que controla o fluxo de Cr para as células.

O primeiro estudo a investigar o efeito do T₃ na captação de Cr foi realizado em mioblastos G8 em cultura, nos quais se observou aumento significativo desta após 48 horas da incubação com o hormônio (ODOOM et al., 1996). Os autores atribuíram tal efeito ao aumento da atividade da Na⁺-K⁺ ATPase.

Por outro lado, Queiroz et al. (2002) verificaram que em ratos hipertireoideos, o conteúdo do mRNA do CreaT no miocárdio e no músculo esquelético apresentou valores em torno de 35% e 30%, respectivamente, dos observados em ratos eutireoideanos. Além disso, no coração, verificou-se uma redução de cerca de 50% no conteúdo de PCr e Cr, além da diminuição no conteúdo de ATP e da razão ATP/ADP (QUEIROZ et al., 2002). A diminuição do conteúdo de CreaT no miocárdio e músculo esquelético e, conseqüentemente, a diminuição dos níveis de Cr e PCr nestas células pode estar relacionada às altas doses de T₃ administradas (100 µg/100g BW, sc), que promovem efeitos deletérios no músculo cardíaco (DANZI e KLEIN, 2004) e esquelético (RODOLICO et al., 1998; DUYFF et al., 2000).

Ainda, conforme salientado, há evidências de que os HT, por meio de mecanismos não genômicos, promovem ativação das vias de sinalização, que envolvem a PI3K e mTOR (DAVIS e DAVIS, 1996; HOFFMAN et al., 2002; BERGH et al., 2005; DAVIS et al., 2005), as quais são capazes de aumentar a captação de Cr (SHOJAIEFARD et al., 2006), sugerindo um possível efeito deste hormônio na modulação dos níveis intracelulares de Cr por mecanismos que não envolvam a modulação da transcrição de genes.

7 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados demonstram que o HT é capaz de regular a expressão gênica do CreaT e as concentrações intracelulares de Cr nos músculos esqueléticos e cardíaco. Chama a atenção que o tratamento crônico com T_3 reduz o mRNA da CreaT, enquanto que o agudo, o eleva (nos músculos cardíaco e sóleo), dado indicativo de uma regulação diferencial dependente do tempo. Em especial no miocárdio, a diminuição do conteúdo de Cr pode estar relacionada ao prejuízo na função cardíaca observado no coração de animais que recebem altas doses do hormônio. Já no músculo sóleo, é possível que o aumento deste conteúdo, de forma aguda, exerça um efeito modulador positivo sobre a respiração mitocondrial, uma vez que está amplamente demonstrado na literatura que o aumento dos níveis de creatina na mitocôndria estimulam a geração de ATP nesta organela. Em suma, a regulação da expressão do CreaT na musculatura esquelética e cardíaca difere de acordo com as características mecânicas e metabólicas destes tecidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AOKI, M. S. et al. Deleterious effects of immobilization upon rat skeletal muscle: role of creatine supplementation. **Clinical Nutrition**, v. 23, p. 1176–1183, 2004.

ATHÉA, Y. et al. Mitochondrial and energetic cardiac phenotype in hypothyroid rat. Relevance to heart failure **Pflugers Arch.**, v. 455, n. 3, p. 431-442, 2007.

BARRA, G. B. et al. Molecular mechanism of thyroid hormone action. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 48, n. 1, p. 25-39, 2004.

BEDOTTO, J. B. Cardiac hypertrophy induced by thyroid hormone is independent of loading conditions and beta adrenoceptor blockade. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 248, n. 2, p. 632, 636, 1989.

BERGH, J. J. et al. Integrin $\alpha V\beta 3$ contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of MAPK and induction of angiogenesis, **Endocrinology**, v. 146, p. 2864–2871, 2005.

BESSEMAN, S.P.; GEIGER, P.J. Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle. **Science**, v. 211, n. 30, p. 448-452, 1981.

BRENT, G. A. The molecular basis of thyroid hormone action. **N. Engl. J. Med.**, v. 331, p. 847-853, 1994.

CAIN, D. F.; DAVIES, R. E. Breakdown of adenosine triphosphate during a single contraction of working muscle. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 8, p. 361-366, 1962.

COREY, J. L. et al. Protein kinase C modulates the activity of a cloned gammaaminobutyric acid transporter expressed in *Xenopus* oocytes via regulated subcellular redistribution of the transporter. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 14759–14767, 1994.

DAI, W. et al. Molecular characterization of the human CRT-1 creatine transporter expressed in *Xenopus* oocytes. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 361, n. 1, p. 75-84, 1999.

DANZI, S.; KLEIN, I. Thyroid hormone and the cardiovascular system. **Minerva Endocrinol.**, v. 29, n. 3, p. 139-150, 2004.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

DAVIS, P. J. et al. Membrane receptors mediating thyroid hormone action. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 16, n. 9, p. 429-435, 2005.

DAVIS, P. J.; DAVIS, F. B. Nongenomic actions of thyroid hormone. **Thyroid**, v. 6, p. 497-504, 1996.

DILLMANN, W. H. et al. Thyroid hormone induced changes in cardiac proteins and mRNAs. **Horm. Metab. Res. Suppl.**, v. 17, p. 26-29, 1987.

DOLDER, M. et al. Mitochondrial creatine kinase in contact sites: interaction with porin and adenine nucleotide translocase, role in permeability transition and sensitivity to oxidative damage. **Biol. Signals Recept.**, v. 10, n. 1-2, p. 93-11, 2001.

DOS SANTOS, R.A.; GIANNOCCO, G.; NUNES, M. T. 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**, v. 11, n. 6, p. 545-550, 2001.

DUMMLER, K. et al. Regulation of adenine nucleotide translocase and glycerol 3-phosphate dehydrogenase expression by thyroid hormones in different rat tissues. **Biochem. J.**, v. 317, p. 913-918, 1996.

DUYFF, R. F. et al. Neuromuscular findings in thyroid dysfunction: a prospective clinical and electrodiagnostic study. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.**, v. 68, p. 750-755, 2000.

EGGLETON, P.; EGGLETON, G. P. The Inorganic Phosphate and a Labile Form of Organic Phosphate in the Gastrocnemius of the Frog. **Biochem. J.**, v. 21, n. 1, p. 190-195, 1927.

EGGLETON, P.; EGGLETON, G. P. The physiological significance of "phosphagen". **J. Physiol.**, v. 63, n. 2, p. 155-161, 1927.

ENGLEHARDT, W. A.; LJUBIMOVA, M. N. Myosin and adenosine triphosphatase. **Nature**, v. 144, p. 688, 1939.

FISKE, C. H.; SUBBAROW, Y. The nature of the "inorganic phosphate" in voluntary muscle. **Science**, v. 65, p. 401-403, 1927.

FITCH, C. D. et al. The mechanism of kidney transaminidase reduction in vitamin E-deficient rabbits. **J. Biol. Chem.**, v. 236, p. 490-492, 1961.

GIANNOCCO, G.; DOS SANTOS, R. A.; NUNES, M. T. Thyroid hormone stimulates myoglobin gene expression in rat cardiac muscle. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 226, n. 1-2, 2004.

GOULART DA SILVA, F. et al. Thyroid hormone induction of actin polymerization in somatotrophs of hypothyroid rats: potential repercussions in growth hormone synthesis and secretion. **Endocrinology**, v. 147, n. 12, p. 5777-5785, 2006.

GREENHAFF, P. L. The nutritional biochemistry of creatine. **J. Nutr. Biochem.**, v. 8, p. 610-618, 1997.

GUDBJARNASON, S. et al. Functional compartmentation of ATP and creatine phosphate in heart muscle. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 1, n. 3, p. 325-339, 1970.

GUERRERO-ONTIVEROS, M. L.; WALLIMANN, T. Creatine supplementation in health and disease. Effects of chronic creatine ingestion in vivo: down-regulation of the expression of creatine transporter isoforms in skeletal muscle. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 184, n. 1-2, p. 427-437, 1998.

GUIMBAL, C.; KILIMANN, M. W. A Na(+)-dependent creatine transporter in rabbit brain, muscle, heart, and kidney. cDNA cloning and functional expression. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 12, p. 8418-21, 1993.

HENRY, H. O. et al. Expression of splice variants of the creatine transporter in the rat brain, muscle, and kidney. **Cell Biol. Int.**, v. 25, p. 940, 2001.

HOFFMAN, S. J. et al. Rapid inhibition of thyroxine-induced bone resorption in the rat by an orally active vitronectin receptor antagonist. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 302, p. 205-211, 2002.

HOLLISS, D. G. et al. Reverse phase HPLC for rapid, comprehensive measurement of nucleotides and bases of the myocardial adenine pool. **Anal. Lett.**, v. 17, p. 2047-2065, 1984.

HORN, M. et al. Chronic phosphocreatine depletion by the creatine analogue beta-guanidinopropionate is associated with increased mortality and loss of ATP in rats after myocardial infarction. **Circulation**, v. 104, p. 1844-1849, 2001.

HORNER, W. H. Transamidation in the nephrectomized rat. **J. Biol. Chem.**, v. 234, p. 2386-2387, 1959.

HU, X.; LAZAR, M. A. Transcriptional repression by nuclear hormone receptors. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 11, n. 1, p. 6-10, 2000.

INGWALL, J. S.; WEISS, R. G. Is the failing heart energy starved? O using chemical energy to support cardiac function. **Circ. Res.**, v. 95, p. 135-145, 2004.

JACOBS, H. High activity of creatine kinase in mitochondria from muscle and brain and evidence for a separate mitochondrial isoenzyme of creatine kinase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 16, n. 6, p. 516-521, 1964.

KLEIN, I.; DANZI, S. Thyroid disease and the heart. **Circulation**, v. 116, n. 15, p. 1725-1735, 2007.

LANG, F. et al. Regulation of Channels by the Serum and Glucocorticoid-Inducible Kinase - Implications for Transport, Excitability and Cell Proliferation. **Cell. Physiol. Biochem.**, v. 13, p. 41-50, 2003.

LAW, R. M. et al. Functional regulation of gamma-aminobutyric acid transporters by direct tyrosine phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 23986–23991, 2000.

LEONARD, J. L. et al. Regulation of type II iodothyronine 5'-deiodinase by thyroid hormone. Inhibition of actin polymerization blocks enzyme inactivation in cAMP-stimulated glial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 265, n. 2, p. 940-6, 1990.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

MANIATIS, T. Et al. **Molecular Cloning: A Laboratorial Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

MUTTER, T. et al. Thyroxine regulation of monolysocardiolipin acyltransferase activity in rat heart. **Biochem. J.**, v. 346, p. 403-406, 2000.

NAKAE, I et al. Creatine depletion and altered fatty acid metabolism in diseased human hearts: clinical investigation using ¹H magnetic resonance spectroscopy and ¹²³I BMIPP myocardial scintigraphy. **Acta Radiol.**, v. 48, n. 4, p.436-443, 2007.

NAKAE, I. et al. Proton magnetic resonance spectroscopy can detect creatine depletion associated with the progression of heart failure in cardiomyopathy. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 42, p. 1587-1593, 2003.

NASH, S. R. et al. Cloning, pharmacological characterization, and genomic localization of the human creatine transporter. **Recept. Channels**, v. 2, n. 2, p. 165-174, 1994.

NEUBAUER, S. et al. Downregulation of the Na(+)-creatine cotransporter in failing human myocardium and in experimental heart failure. **Circulation**, v. 100, n. 18, p. 1847-1850, 1999.

NEUBAUER, S. Influence of left ventricular pressures and heart rate on myocardial high-energy phosphate metabolism. **Basic Res. Cardiol.**, v. 93, suppl. 1, p. 102-107, 1998.

ODOOM, J. E. et al. The regulation of total creatine content in a myoblast cell line. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 158, n. 2, p. 179-188, 1996.

OMEROVIC, E. et al. Growth hormone induces myocardial expression of creatine transporter and decreases plasma levels of IL-1beta in rats during early postinfarct cardiac remodeling. **Growth Horm. IGF Res.**, v. 13. n. 5. p. 239-245, 2003.

OP' T EIJNDE, B. et al. Effect of creatine supplementation on creatine and glycogen content in rat skeletal muscle. **Acta. Physiol. Scand.**, v. 171, n. 2 p. 169–173, 2001.

PARADIES, G. et al. Decreased cytochrome oxidase activity and changes in phospholipids in heart mitochondria from hypothyroid rats. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 307, p. 91-95, 1993.

PERSKY, A. M. et al. Pharmacokinetics of the dietary supplement creatine. **Clin. Pharmacokinet.**, v. 42, n. 6, p. 557-574, 2003.

PLOW, E. F. et al., Ligand binding to integrins, **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 21785–21788, 2000.

POLIKAR, R. et al. The thyroid and the heart. **Circulation**, v. 87, p. 1435-1441, 1993.

PORTMAN, M. A. et al. Thyroid hormone coordinates respiratory control maturation and adenine nucleotide translocator expression in heart in vivo. **Circulation**, v. 102, p. 1323-1329, 2000.

QIAN, Y. et al. Protein kinase C activation regulates human serotonin transporters in HEK-293 cells via altered cell surface expression. **J. Neurosci.**, v. 17, p. 45–57, 1997.

QIN, J. et al. Integrin bidirectional signaling: a molecular view. **PLoS Biol.**, v. 2, n. 6, p. 169, 2004.

QUEIROZ, M. S. et al. Thyroid hormone regulation of cardiac bioenergetics: role of intracellular creatine. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 283, n. 6, p. 2527-2533, 2002.

ROBINSON, D. M.; LOISELLE, D. S. Effect of creatine manipulation on fast-twitch skeletal muscle of the mouse. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 29, p. 1105–1111, 2002.

RODOLICO, C. et al. Myopathy as the persistently isolated symptomatology of primary autoimmune hypothyroidism. **Thyroid**, v. 8, p. 1033-1038, 1998.

RODONDI, N. et al. Subclinical thyroid dysfunction, cardiac function, and the risk of heart failure: The Cardiovascular Health study. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 52, n. 14, p. 1152-1159, 2008.

SALTARELLI, M. D. et al. Expression of the rat brain creatine transporter in situ and in transfected HeLa cells. **Dev. Neurosci.**, v. 18, n. 5-6, p. 524-534, 1996.

SCHLATTNER, U. et al. Divergent enzyme kinetics and structural properties of the two human mitochondrial creatine kinase isoenzymes. **Biol. Chem.**, v. 381, p. 1063–1070, 2000.

SCHLATTNER, U.; WALLIMANN, T. Octamers of mitochondrial creatine kinase isoenzymes differ in stability and membrane binding. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 23, p. 17314-17320, 2000.

SEPPET, E. K. et al. Hormone regulation of cardiac energy metabolism. I. creatine transport across cell membranes of euthyroid and hyperthyroid rat heart. **Biochem. Med.**, v. 34, p. 267-279, 1985.

SEPPET, E. K. et al. Hormone regulation of cardiac energy metabolism. III. Effect of thyroid state on distribution of creatine kinase isoenzymes and creatine-controlled respiration in cardiac muscle. **J. Appl. Cardiol.**, v. 6, p. 301-311, 1991.

SHOJAIEFARD, M. et al. Stimulation of the creatine transporter SLC6A8 by the protein kinase mTOR . **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 341, n. 4, p. 945-949, 2006.

SHOJAIEFARD, M. et al. Stimulation of the creatine transporter SLC6A8 by the protein kinases SGK1 and SGK3. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 334, p. 742-746, 2005.

SNOW, R. J.; MURPHY, R. M. Creatine and the creatine transporter: a review. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 224, n. 1-2, p. 169-181, 2001.

SORA, I. et al. The cloning and expression of a human creatine transporter. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 204, n. 1, p. 419-27, 1994.

STERLING, K.; BRENNER, M. A. Thyroid hormone action: effect of triiodothyronine on mitochondrial adenine nucleotide translocase in vivo and in vitro. **Metabolism**, v. 44, n. 2, p. 193-199, 1995.

TIAN, R.; INGWALL, J. S. The molecular energetics of the failing heart from animal models – small animal models. **Heart Failure Rev.**, v. 4, p. 235-253, 1999.

VAN PILSUM, J. F. et al. A bioassay for thyroxine based on rat kidney transaminase activities. **Endocrinology.**, v. 87, p. 1237-1244, 1970.

WALLIMANN, T. et al. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. **Biochem. J.**, v. 281, p. 21-40, 1992.

WALSH, B. et al. The role of phosphorylcreatine and creatine in the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle. **J. Physiol.**, v. 537, p. 971-978, 2001.

WILLIAMS, M. H. et al. **Creatina**. São Paulo: Manole, 2000.

WYSS, M.; KADDURAH-DAOUK, R. Creatine and creatinine metabolism. **Physiol. Rev.**, v. 80, n. 3, p. 1107-1213, 2000.

WYSS, M.; WALLIMANN, T. Creatine metabolism and the consequences of creatine depletion in muscle. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 133-134, p. 51-66, 1994.

YEN, P. M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action, **Physiol. Rev.**, v. 81, p. 1097–1142, 2002.

ZHANG, J.; BACHE, R. J. The molecular energetics of the failing heart from animal models – large animal models. **Heart Failure Rev.**, v. 4, p. 255-267, 1999.