

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Bioquímica Médica

LUISA ANDREA KETZER

“Transdução de energia e produção de calor pela Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático de músculos cardíaco e esquelético.”

Rio de Janeiro

- 2008 -

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Transdução de energia e produção de calor pela Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático de músculos cardíaco e esquelético.

Luísa Andrea Ketzer

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Química Biológica

Orientação: Leopoldo de Meis

Rio de Janeiro

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Ketzer, Luísa Andrea

Transdução de energia e produção de calor pela Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático de músculos cardíaco e esquelético/ Luísa Andrea Ketzer – Rio de Janeiro:UFRJ/IBqM, 2008.

ii, 123f

Orientador: Leopoldo de Meis

Tese (doutorado) – UFRJ/ IBqM/ Programa de Pós Graduação em Química Biológica, 2008.

Referências Bibliográficas: f: 108 – 121

1. Ca^{2+} -ATPase 2. Hormônios Tiroideanos 3. Exposição ao frio
4. Termogênese 5. Hidrólise de ATP 6. Músculo cardíaco 7. Músculo esquelético

Transdução de energia e produção de calor pela Ca²⁺-ATPase de retículo sarcoplasmático de músculos cardíaco e esquelético.

Luísa Andrea Ketzer

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, do Instituto de Bioquímica Médica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutor em Química biológica.

Banca examinadora:

Professora Carmen Cabanelas Pazos de Moura
Professora Adjunta/ IBCCF/ UFRJ

Professor Diogo Onofre Gomes de Souza
Professor Titular/ UFRGS

Professor Jose Roberto Meyer Fernandes
Professor Adjunto/ IBqM/ UFRJ

Suplente Interno/ Revisor

Professora Martha Meriwether Sorenson
Professora Adjunta/ IBqM/ UFRJ

Suplente Externo

Professor Marcelo Einicker Lamas
Professor Adjunto/ ICBBF/ UFRJ

Orientador:

Professor Leopoldo de Meis
Professor Titular/ IBqM/ UFRJ

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais Dilson e Silvia pelo apoio e incentivo contínuo ao estudo, apesar da grande distância física que nos separa. Devo-lhes tudo!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço pela oportunidade de conviver com o Leopoldo de Meis ao longo do meu doutorado. Obrigada pela orientação e dedicação. Tu és um ser humano ímpar, muito além de um cientista brilhante. Aprendi contigo a perceber Ciência em tudo, inclusive na natureza das artes, e que o conhecimento é a melhor forma de tornar um cidadão digno. Obrigada por me deixar participar do Projeto Jovens Talentosos e dos Cursos de Férias. Teu positivismo contagia e tu sempre estarás comigo!

AGRADECIMENTOS

- Ao meu pai Dilson, um exemplo de ser humano e professor que entusiasma e contagia os alunos com seu conhecimento multidisciplinar, apesar das dificuldades do ensino público brasileiro. Obrigada pelo amor e dedicação.
- À minha mãe Silvia, uma mulher batalhadora e de coração enorme, que sempre apoiou as minhas decisões. Obrigada pelo amor e incentivo.
- Ao meu irmão Felipe pelo carinho e preocupação. Tenho muito orgulho de ser sua irmã.
- Aos meus avôs Arno, Lori, Ida e Quito, sempre presentes na minha vida e no meu pensamento.
- À minha enorme família pelo apoio e incentivo apesar da minha ausência na maioria dos eventos familiares.
- Aos Professores João Batista e Marcelo Reis, pela minha formação, pelo exemplo de cientistas brilhantes e pelo incentivo a permanecer no Rio de Janeiro durante o doutorado.
- À Professora Denise Pires de Carvalho, pela amizade e dedicação. Obrigada pela disponibilidade e colaboração nos trabalhos.
- À Professora Vivian Rumjanek, pela amizade e companhia de tantas idas e vindas ao Fundão.
- À Professora Martha Sorenson, pelo acompanhamento e revisão desta tese e pelo exemplo de amor e dedicação à Ciência.
- Ao Professor Antônio Galina, pelas discussões científicas e amizade. Teu entusiasmo pela Ciência contagia à todos.
- Às minhas alunas de iniciação científica Fernanda Pereira Dysarz e Luana Calazans, pela participação nos experimentos e pela amizade. Aprendi muito com vocês!
- Aos colegas de bancada do Laboratório de Bioenergética que contribuíram para o desenvolvimento desta tese: Mariana, Anderson, Wagner, Luan, Reinaldo, José Henrique, Deisy e Pedro.
- À minha irmã paulista Cristina Zamarioli, pela amizade e convivência diária nos últimos cinco anos.
- À Ana Paula Arruda, minha amiga de tantos sambas e ciência. Estes quatro anos de doutorado não seriam os mesmos sem a tua presença!
- À minha amiga Ana Beatriz, pelo carinho e alegria em muitos momentos.

- Aos amigos artistas Diucênio, Luiz, Alexandro, Bruno, Marco Aurélio, pela amizade e pelo trabalho em deixar Natureza mais linda ainda.
- Ao Carlinhos e Vavá pela ajuda nos experimentos de calorimetria e preparação de reticulo sarcoplasmático e pela amizade.
- Ao Paulinho e Elizangela, pela disponibilidade e amizade.
- Aos amigos do Laboratório de Contração Muscular: Daniel, Cícero, Renato, Leandro pelos momentos alegres. Em especial, ao Daniel pelo otimismo e amizade, e pela colaboração no trabalho em andamento com a miosina.
- Aos amigos Renata e José Henrique pela companhia e amizade. E a tantos outros amigos que fiz no IBqM.
- Ao IBqM que tornou-se minha casa carioca e onde eu passo a maior parte do meu tempo.
- Aos amigos do INCA Ana Beatriz, Ticianá, Rita, Jamila, Renato, Fábio, Daniela e Ariane.
- Ao amigos: Janine, Liliam, Fernanda, Gisele, Luciana, Carolina, Mauro, Daniel.
- Ao CNPq pelo auxílio financeiro.
- Aos componentes da banca por aceitarem o convite de participar desta tese.
- À Cidade Maravilhosa, pelos momentos de grande alegria, seja nas trilhas ou nas rodas de sambas.

ABREVIATURAS

ADP	adenosina 5'-difosfato
AMPC	AMP cíclico
ATP	adenosina 5'-trifosfato
BAT	do inglês <i>brown adipose tissue</i> (tecido adiposo marrom)
Ca ²⁺ -ATPase	adenosina trifosfatase dependente de cálcio
D1	desiodase do tipo 1
D2	desiodase do tipo 2
D3	desiodase do tipo 3
K _{eq}	constante de equilíbrio
LDL	do inglês <i>low-density lipoproteins</i> (lipoproteína de baixa-densidade)
Na ⁺ -K ⁺ ATPase	adenosina trifosfatase dependente de sódio e potássio
NST	do inglês <i>non-shivering thermogenesis</i> (termogênese não induzida por tremor)
PDH	do inglês <i>pyruvate dehydrogenase</i> (piruvato desidrogenase)
PGC1 α	do inglês <i>peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator 1</i> , co-ativador 1 α do receptor ativado por proliferador do peroxissoma
Pi	fosfato inorgânico
PKA	proteína quinase dependente de AMPC
PLB	do inglês <i>phospholamban</i> , fosfolambam
PPi	pirofosfato inorgânico
RS	retículo sarcoplasmático
RXR	do inglês <i>retinoid x receptor</i> (receptor retinóico X)
Ser ¹⁶	serina 16
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase do retículo sarcoplasmático
SLN	sarcolipina

ST	do inglês <i>shivering thermogenesis</i> (termogênese induzida por tremor)
T3	3,5,3'-triodo L-tironina
T4	3,5,3',5'-tetra-iodotironina ou tiroxina
Thr ¹⁷	treonina 17
TR	hormônio tireoideano
TRE	do inglês <i>thyroid hormone response element</i> , elementos responsivos ao hormônio tireoideano
TRH	do inglês <i>thyrotropin-releasing hormone</i> , hormônio liberador de TSH
TR α	isoforma α do receptor de hormônio tireoideano
TR β	isoforma β do receptor de hormônio tireoideano
TSH	do inglês <i>thyroid-stimulating hormone</i> , hormônio estimulante da tireóide ou tireotrofina
UCP1	do inglês <i>uncoupling protein 1</i> (proteína desacopladora 1)
V _{max}	velocidade máxima
ΔG°	variação da energia livre padrão
ΔH	variação da energia entálpica
ΔS	variação de energia entrópica

ÍNDICE

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 – INTRODUÇÃO	01
1.1 – Transdução de energia celular	01
1.1.1 - Compostos de alta e baixa energia.....	03
1.1.2 – Sistemas regeneradores de ATP.....	07
1.2 – O tecido muscular estriado	08
1.2.1 - Músculo esquelético.....	09
1.2.2 - Músculo cardíaco.....	11
1.2.3 – O retículo sarcoplasmático.....	13
1.2.4 - Acoplamento excitação –contração muscular.....	14
1.2.5 – Termogênese muscular.....	16
1.3 – A Ca²⁺-ATPase do retículo sarcoplasmático	18
1.3.1 – A estrutura da Ca ²⁺ -ATPase.....	19
1.3.2 – O ciclo da Ca ²⁺ -ATPase.....	20
1.3.3 – As isoformas da Ca ²⁺ -ATPase.....	24
1.3.4 - Regulação da atividade da Ca ²⁺ -ATPase por fosfolambam e sarcolipina	26
1.4 – Hormônio tireoideano	28
1.4.1 – Papel na termogênese.....	31
1.4.2 – Papel na fisiologia cardiovascular.....	34
2 – OBJETIVOS	37
3 – RESULTADOS	39
Artigo 1: Modulação do músculo cardíaco de coelhos pelo hormônio tireoideano e exposição ao frio: papel da Ca ²⁺ -ATPase do retículo sarcoplasmático e respiração mitocondrial.....	39
Artigo 2: Termogênese no músculo esquelético em coelhos normais e hipotireóideos expostos ao frio: papel da Ca ²⁺ -ATPase de retículo sarcoplasmático.....	65

Artigo 3: Produção de calor pelo músculo esquelético de ratos e coelhos e utilização de glicose 6-fosfato como sistema regenerador de ATP pela Ca^{2+} -ATPase de coração de ratos e coelhos.....	94
4 – DISCUSSÃO	101
5 – CONCLUSÕES	107
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
7 – CURRICULUM VITAE	122

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Conversão de energia liberada durante a hidrólise de ATP.....	02
Figura 2 – Microscopia eletrônica de músculo esquelético e cardíaco.....	09
Figura 3 – Fibra muscular esquelética.....	14
Figura 4 - Interação entre vias de sinalização cardíaca.....	15
Figura 5 – Grandes domínios representados na seqüência primária de aminoácidos da Ca ²⁺ -ATPase do RS.....	20
Figura 6 – Representação em fita cristalográfica da estrutura da Ca ²⁺ -ATPase de RS.....	21
Figura 7 – Ciclo catalítico da Ca ²⁺ -ATPase na presença de gradiente de Ca ²⁺	22
Figura 8 – Representação esquemática da seqüência primária de Aminoácidos da fosfolambam e da sarcolipina.....	27
Figura 9 – Representação esquemática do transporte, metabolismo e ação dos hormônios tireoideanos na célula.....	29
Figura 10 – Representação esquemática da ação genômica do hormônio tireoideano.....	30

RESUMO

KETZER, Luísa Andrea. Transdução de energia e produção de calor pela Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático de músculos cardíaco e esquelético. Tese (Doutorado em Química Biológica) – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

A Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) é capaz de transportar Ca^{2+} do citoplasma para o lúmen do retículo sarcoplasmático usando a energia derivada da hidrólise de ATP. Durante o transporte, a SERCA é capaz de interconverter diferentes formas de energia. Neste trabalho, estudamos os efeitos do hormônio tireoideano e da exposição ao frio na taxa de produção de calor pela SERCA. Isso foi testado usando vesículas derivadas do retículo sarcoplasmático de músculos esquelético e cardíaco de coelhos. Além disso, comparamos a produção de calor pela SERCA em músculo esquelético de ratos e coelhos e a capacidade do músculo cardíaco em utilizar glicose 6-fosfato como sistema regenerador de ATP. Verificamos que o hipertireoidismo promoveu um aumento da expressão de SERCA 2a e da fosforilação de fosfolambam (PLB) no músculo cardíaco, levando a um aumento nas taxas de captação de Ca^{2+} e hidrólise de ATP. O consumo de oxigênio cardíaco foi significativamente aumentado nos animais hipertireóides. No hipotireoidismo, observamos uma inibição da SERCA 2 cardíaca promovida pelo aumento da expressão de PLB e redução da fosforilação de PLB. A exposição ao frio (4°C) por 72 horas levou a alterações semelhantes àsquelas observadas no hipertireoidismo. Os efeitos detectados em 72 horas de exposição ao frio foram revertidos quando a duração de exposição ao frio foi aumentada para 240 horas. O hormônio tireoideano e a exposição ao frio não foram capazes de alterar a quantidade de calor produzida pela SERCA 2a cardíaca durante a hidrólise de ATP. Um aumento da expressão de SERCA 1 e da taxa de produção de calor foi detectado em músculo esquelético vermelho de coelhos eutireóides e hipotireóides expostos a 4°C por 240 horas. A taxa de produção de calor pela SERCA 1 de rato foi maior do que a medida em coelhos. Portanto, além do tecido adiposo marrom, o músculo esquelético de ratos representa um importante sítio de produção de calor que pode ser mobilizado para o controle da termogênese. Finalmente, mostrou-se que o músculo cardíaco de ratos e coelhos é capaz de utilizar glicose 6-fosfato como sistema regenerador de ATP para transportar Ca^{2+} . Em conclusão, este trabalho mostra que a adaptação ao frio promoveu diferentes modificações na respiração e produção de calor nos músculos cardíaco e esquelético de coelhos.

ABSTRACT

The sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) is able to transport Ca^{2+} from the cytosol in to the sarcoplasmic reticulum lumen using the energy derived from ATP hydrolysis. During transport, SERCA is able to interconvert different forms of energy. In this work, we studied the effects of both, thyroid hormone and cold exposure on the rate of heat production by SERCA. This was tested using vesicles derived from the sarcoplasmic reticulum of rabbit cardiac and skeletal muscles. In addition, we compared the heat production by SERCA in rat and rabbit skeletal muscles and the cardiac ability to use glucose 6-phosphate as an ATP regenerating system. We verified that hyperthyroidism promoted an increase in SERCA expression and phospholamban (PLB) phosphorylation in cardiac muscle, leading to an enhancement of Ca^{2+} uptake and ATP hydrolysis rates. The cardiac oxygen consumption was significantly increased in hyperthyroid rabbits. In the hypothyroidism we observed an inhibition of cardiac SERCA 2 promoted by an increase of PLB expression and reduction of PLB phosphorylation. Cold exposure (4°C) for 72 hours led to alterations similar to those observed in hyperthyroidism. The effects detected after 72 h cold exposure were reverted when the duration of cold exposure was increased to 240 hours. The thyroid hormone and cold exposure were not able to change the amount of heat produced by cardiac SERCA during ATP hydrolysis. An increase of SERCA 1 expression and of the rate of heat production was detected in red skeletal muscle, in both euthyroid and hypothyroid rabbits exposed at 4°C for 240 h. The rate of heat production produced by rat SERCA 1 was higher than that measured in rabbits. Therefore, in addition to brown adipose tissue, rats skeletal muscle represent an important site of heat production which can be mobilized for thermogenesis control. Finally, it is shown that rat and rabbit cardiac muscles are able to use glucose 6-phosphate as an ATP regenerating system for Ca^{2+} transport. In conclusion, in this work it is shown that cold adaptation promoted different modifications of respiration and heat production in both cardiac and skeletal muscles.

1 – INTRODUÇÃO

1.1- Transdução de energia celular

Diferentes formas de energia são continuamente interconvertidas nas células, sendo o ATP (adenosina 5'-trifosfato) o principal transdutor de energia em sistemas biológicos. Na célula existem sistemas enzimáticos capazes de reconhecer o ATP em sítios específicos e permitir a interconversão da energia química, derivada da hidrólise de ATP, em trabalho (actomiosina) ou em outras formas de energia, como a energia osmótica (transporte ativo) ou a energia química (síntese de novas moléculas) (FIGURA 1). Usualmente, nestes processos, parte da energia liberada é dissipada no meio na forma de calor.

As ATPases desempenham um papel importante na transdução de energia por mediar o acoplamento entre o transporte iônico e a hidrólise de ATP. Existem quatro tipos principais de ATPases transportadoras, que são classificadas de acordo com a função, localização, estrutura e tipo de íon transportado.

Na maioria das células aeróbicas, as ATPases do tipo F (também chamadas de F_0F_1 ATPases) sintetizam ATP a partir de ADP e P_i em presença de Mg^{2+} , em resposta a um gradiente eletroquímico de prótons gerado pela cadeia transportadora de elétrons. As ATPases do tipo F localizam-se em mitocôndrias, cloroplastos e membrana plasmática de bactérias (NELSON, 1992).

As ATPases do tipo V são responsáveis pela regulação do pH citosólico e acidificação de compartimentos intracelulares pelo acoplamento da hidrólise do ATP ao transporte de prótons. Encontradas em vacúolos intracelulares e lisossomos de células eucarióticas e também na membrana plasmática de procariontes, estão

envolvidas em diversos processos vitais, incluindo endocitose, transporte ativo de metabólitos e liberação de neurotransmissores (FORGAC, 1998; NELSON e HARVEY, 1999).

As ATPases do tipo ABC, denominadas também de transportadores ABC, usualmente contêm quatro domínios ou subunidades, sendo dois domínios transmembrana e dois sítios de ligação de nucleotídeos. Os membros desta família de proteínas transportam diversos substratos pela membrana de células e organelas pelo acoplamento da hidrólise de ATP, sendo encontradas em bactérias, fungos e eucariontes. Em bactérias, os transportadores ABC são conhecidos por contribuir a resistência a múltiplas drogas e antibióticos, por extrair os fármacos utilizados no tratamento de doenças (DAVIDSON e MALONEY, 2007).

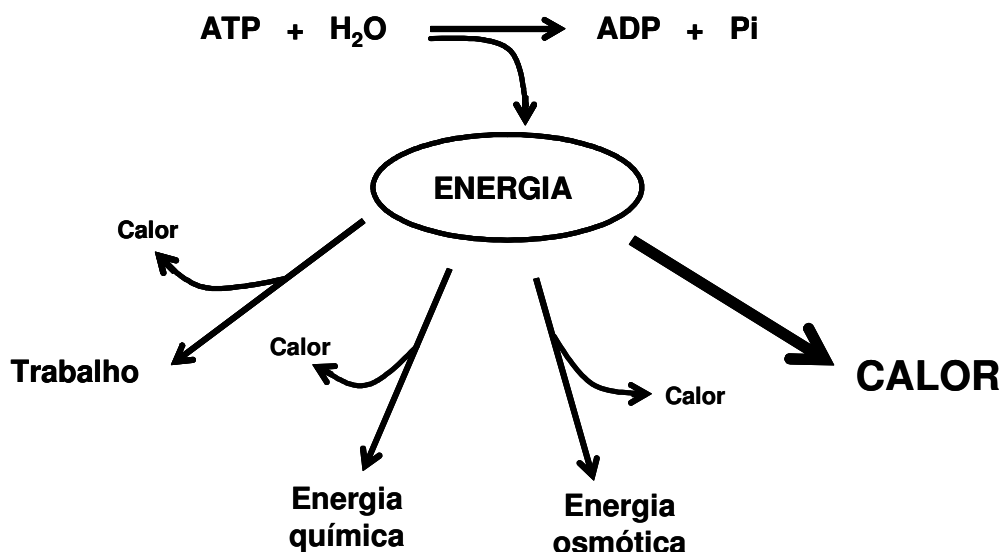


FIGURA 1 – Conversão de energia liberada durante a hidrólise de ATP (DE MEIS et al 2003).

As ATPases do tipo P estão associadas à membrana e são responsáveis pelo transporte de cátions inorgânicos, incluindo cálcio, sódio, potássio e cobre. A principal característica desta família de ATPases é a presença de um resíduo

aspartil no sítio catalítico, o qual é fosforilado por ATP durante a catálise (por isso o nome tipo-P). Os outros tipos ATPases transportadoras (F, V e ABC) não apresentam intermediários fosforilados durante o ciclo catalítico. Além desta característica, ATPases do tipo P são inibidas por orto-vanadato e apresentam dois estados conformacionais diferentes, E_1 e E_2 , durante o ciclo catalítico. As ATPases do tipo P mais abundantes são Ca^{2+} -ATPase, encontrada na membrana plasmática e no retículo endoplasmático, a Na^+/K^+ -ATPase, presente na membrana plasmática, e a H^+/K^+ -ATPase, localizada na mucosa gástrica e no epitélio renal (MØLLER et al., 1996; KÜHLBRANDT, 2004).

Nesta tese estudou-se os mecanismos de transdução de energia e produção de calor pela Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático de músculos cardíaco e esquelético.

1.1.1 – Compostos de alta e baixa energia

Embora as vias envolvidas na síntese e na hidrólise de ATP já sejam bem conhecidas, o mecanismo pelo qual a energia da hidrólise do ATP é transferida e utilizada pelas enzimas ainda não está totalmente esclarecido.

Até recentemente, acreditava-se que a energia liberada durante a hidrólise do ATP era proveniente da clivagem da ligação covalente entre o fosfato e a molécula de ATP. Esta hipótese foi proposta por Fritz Lipmann (LIPMANN, 1941), sendo amplamente aceita pela comunidade científica. Na época, as abordagens experimentais utilizadas para se determinar as energias de hidrólise dos compostos fosforilados foram distintas. Para fosfoésteres, media-se a concentração molar de produtos e reagentes após a reação atingir o equilíbrio e o valor da constante de

equilíbrio (K_{eq}) era aplicado na equação relacionada à variação de energia livre padrão de Gibbs (ΔG°):

$$\Delta G^\circ = -R T \ln K_{eq}$$

ΔG° representa a variação da quantidade de energia que capaz de realizar trabalho durante uma reação, onde as concentrações dos reagentes e produtos estão expressas em 1,0 mol/L à temperatura (25 °C) e pressão (1 atm) constantes. R é a constante dos gases (1,987 cal.K⁻¹.mol⁻¹) e T é a temperatura absoluta em graus Kelvin.

Entretanto, compostos de fosfato como o ATP, fosfocreatina e fosfoenolpiruvato, a medida de K_{eq} não se mostrava um método preciso, pois quando a reação alcançava o equilíbrio, a concentração destes compostos era muito pequena e difícil de determinar experimentalmente. O ΔG° de hidrólise do ATP poderia ser inferido indiretamente a partir do conhecimento do ΔG° de hidrólise de reações parciais conhecidas, como por exemplo:

	ΔG° (Kcal/mol)
glicose + ATP \leftrightarrow ADP + glicose 6-fosfato + H ⁺	-4,5
glicose 6-fosfato + H ₂ O \leftrightarrow glicose + Pi	-2,5
ATP + H ₂ O \leftrightarrow ADP + Pi + H ⁺	-7,0

Alternativamente, Lipmann estabeleceu que a contribuição da energia entrópica (ΔS) para o total de energia livre (ΔG) da reação era mínima. Assim, segundo a equação $\Delta H = \Delta G + T\Delta S$, a quantidade de energia livre de hidrólise era igual à quantidade de calor liberado (energia entálpica, ΔH).

Após determinar a quantidade de calor liberado durante a quebra de pontes covalentes de diversos compostos fosforilados, Lipmann classificou os compostos de alta e baixa energia. Segundo dados obtidos por calorimetria, a ruptura da ligação

de N-P da fosfocreatina, do enolpiruvato do fosfoenolpiruvato, das ligações fosfoanidro do ATP e do pirofosfato inorgânico (PPi) e da ligação do tipo acilfosfato do aspartilfosfato liberavam grandes quantidades de calor e foram classificadas como ligações fosfato de alta energia. Em água, a K_{eq} destes compostos é alta, com valores variando entre 10^6 e 10^9 M ($\Delta G^\circ = -8$ a -12 kcal/mol). Em contraste, fosfoésteres como glicose 6-fosfato e glicerol fosfato apresentam uma K_{eq} para a hidrólise variando entre 10 e 10^2 M, e valores de ΔG° de $-1,5$ e $-2,5$ kcal/mol (em água), respectivamente. Devido a estas características, glicose 6-fosfato e glicerol fosfato foram considerados compostos de fosfato de baixa energia.

O ambiente no qual o composto de fosfato se encontrava, se em solução ou ligado à superfície da enzima, foi totalmente desconsiderado de acordo com a proposta de Lipmann. Anos mais tarde, George e colaboradores (GEORGE et al, 1970) verificaram que a interação de reagentes e produtos com o solvente era essencial na determinação da K_{eq} e do ΔG de uma reação. Em soluções aquosas, moléculas de água se organizam ao redor do composto de fosfato, neutralizando a repulsão eletrostática e formando pontes entre diferentes átomos da molécula. A repulsão eletrostática e a ressonância de oposição neutralizariam os pontos de fraqueza gerados ao longo da molécula. Foi proposto então que a energia de hidrólise de um composto de fosfato é determinada pela diferença de energia de solvatação entre os reagentes e os produtos. A energia de solvatação corresponde à quantidade de energia necessária para remover moléculas de solvente que estão organizadas ao redor de uma substância em solução. Sendo assim, pequenas mudanças na organização da água ao redor dos reagentes e produtos podem significar grandes mudanças nos parâmetros termodinâmicos da reação. Desta

maneira, a contribuição da energia entrópica para a reação poderia superar a contribuição da energia entálpica.

Diversos grupos de pesquisa demonstraram a importância da energia de solvatação para a energia de hidrólise de diferentes compostos. Em meios totalmente aquosos e dependendo das condições usadas, o ΔG° medido para a hidrólise de PPI varia entre -3 e -6 kcal/mol (TABELA 1) (DE MEIS, 1984, 1989, 1993). As ligações acetil fosfato e N-P da fosfocreatina e da fosfoarginina são consideradas de alta energia em solução aquosa. Entretanto, na fase gasosa, apresentam um ΔH de hidrólise bastante positivo (TABELA 1), indicando que quando reagentes e produtos não estão solvatados, acetil fosfato e fosfocreatina são mais estáveis do que os produtos da hidrólise e podem ser classificados como compostos de baixa energia (HAYES et al, 1978). Portanto, a energia de solvatação de reagentes e produtos são fatores importantes na determinação da energia de hidrólise da creatina fosfato, do PPI e do acetil fosfato. Ewing e Van Wazer (1988) confirmaram essa observação quando calcularam a energia de hidrólise do PPI na fase gasosa. Contudo, a energia de solvatação não parece determinar a energia de hidrólise de todos os compostos de fosfato. De acordo com Hayes e colaboradores (1978), a energia de hidrólise de fosfoésteres como a glicose 6-fosfato é a mesma na água ou na fase gasosa, indicando que a interação de reagentes e produtos com o solvente não tem um papel determinante da K_{eq} de hidrólise de fosfoésteres.

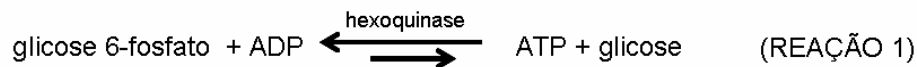
Além da energia de solvatação, observou-se que a K_{eq} para a hidrólise de PPI e ATP varia dependendo do pH e da concentração de cátions divalentes no meio. Essas mudanças são relacionadas principalmente a mudanças na entropia da reação (DE MEIS, 1993, 1989).

TABELA 1: Energia de hidrólise (ΔG° , kcal/mol) de diferentes compostos de fosfato em meio aquoso, na fase gasosa e em uma mistura de água com solventes orgânicos.

Composto	Meio aquoso	Fase gasosa	Solventes orgânicos
ATP	-7,0 à -9,0	-	+0,3
PPi	-3,0 à -6,0	-0,4 à -0,9	-1,0 à +2,0
Aspartil fosfato	-9,0 à -11,0	+5,0 à +32,0	+0,3 à +2,3
Fosfocreatina	-9,0 à -11,0	+9,0 à +212,0	-
Glicose 6-fosfato	-1,5 à -3,0	-1,5 à -2,5	-1,5 à -2,5

1.1.2 – Sistemas regeneradores de ATP

Segundo Lipmann, o ATP (ΔG° -7 à -9 kcal/mol) poderia ser regenerado a partir de compostos fosforilados de energia padrão livre maior do que o próprio ATP, como a fosfocreatina e fosfoenolpiruvato (ΔG° -10 e -12 kcal/mol, respectivamente). No entanto, alguns trabalhos demonstraram que enzimas envolvidas em processos de transdução de energia são capazes de utilizar o ATP gerado a partir de compostos de baixa energia como a glicose 6-fosfato na reação inversa da hexoquinase (REAÇÃO 1) (DE MEIS et al, 1992; MONTERO-LOMELI e DE MEIS, 1992; RAMOS et al, 1994).



Na reação inversa da hexoquinase, a concentração de ATP disponível no meio após a reação alcançar o equilíbrio é muito pequena, mas o suficiente para ser utilizada por enzimas transdutoras de energia com alta afinidade por ATP, como a Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático de músculo esquelético e cérebro (MONTERO-LOMELI e DE MEIS, 1992; RAMOS e DE MEIS, 1999). A capacidade da isoforma da Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático de músculo cardíaco em utilizar a glicose 6-fosfato/ hexoquinase para realizar trabalho será investigada nesta

tese. Outra enzima capaz de utilizar a energia derivada da hidrólise de glicose 6-fosfato é a F_1-F_0 ATPase, que forma e mantém um potencial de membrana em subpartículas mitocondriais de maneira semelhante ao observado utilizando concentrações milimolares de ATP (DE MEIS et al, 1992).

Além do sistema glicose 6-fosfato/hexoquinase, a Ca^{2+} -ATPase derivada de retículo sarcoplasmático de cérebro e de músculo esquelético pode utilizar o sistema frutose 1,6-bisfosfato/ fosfofrutoquinase como sistema regenerador de ATP (RAMOS e DE MEIS, 1999; DE MEIS, 2001).

1.2 – O tecido muscular estriado

O tecido muscular é composto por células alongadas capazes de se contrair na presença de ATP e cálcio, em resposta a um estímulo nervoso. As células desse tecido são de origem mesodérmica, sendo que a sua diferenciação se dá através da síntese de proteínas específicas com uma organização determinada, tais como os diferentes tipos de actinas, miosinas e proteínas motoras filamentosas.

O tecido muscular é classificado de acordo com suas características morfológicas e funcionais. Existem três tipos principais de tecidos musculares: tecido muscular (estriado) esquelético, tecido muscular (estriado) cardíaco e tecido muscular liso.

Os músculos estriados (FIGURA 2) são compostos por células alongadas, denominadas fibras musculares, que têm como característica um elevado grau de desenvolvimento de proteínas estruturais do citoesqueleto. Ao microscópio óptico, observa-se faixas transversais claras e escuras alternadas, o que confere o aspecto estriado. As faixas escuras são conhecidas como bandas A por serem anisotrópicas

à luz polarizada e são compostas por filamentos de miosina. Já as faixas claras são conhecidas como bandas I por serem isotrópicas à luz polarizada e são constituídas por filamentos de actina. Os filamentos de actina e miosina interdigitam-se e agrupam-se numa conformação hexagonal chamada miofibrila. No centro de cada banda I nota-se uma linha transversal escura, denominada linha Z. As miofibrilas são transversalmente subdivididas em unidades chamadas de sarcômero, que corresponde a região entre duas linhas Z sucessivas. (BENDALL, 1969; FRANZINI-ARMSTRONG E PEACHEY, 1981) Essa organização das miofibrilas é observada em músculos estriados esquelético e cardíaco.

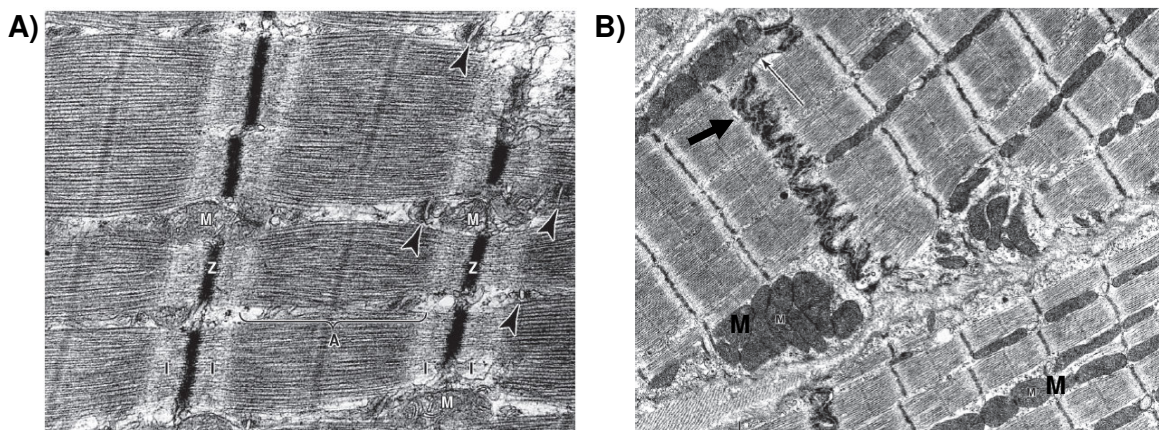


FIGURA 2 – A) Microscopia eletrônica de corte longitudinal de músculo esquelético de macaco. M – mitocôndrias; I – banda I (isotrópicas); A – banda A (anisotrópicas); Z – linha Z, Seta – tríade. Aumento de 40.000 x. B) Corte longitudinal de tecido muscular cardíaco. M – mitocôndrias. As setas indicam os desmossomos e o disco intercalar. Aumento de 18.000 x. (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2004)

1.2.1 – Músculo esquelético

O tecido muscular esquelético é formado por feixes de células muito longas (até 30 cm), cilíndricas, multinucleadas e contendo muitos filamentos. O diâmetro das fibras musculares estriadas esqueléticas varia de 10 a 100 μm . Estas fibras se

originam no embrião pela fusão de células alongadas, os mioblastos. Nas fibras musculares esqueléticas, os numerosos núcleos se localizam na periferia das fibras, próximo ao sarcolema (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2004).

O músculo esquelético apresenta uma marcante plasticidade, adaptando-se a uma variedade de estímulos externos (BOOTH e THOMASON, 1991; CHIBALIN et al, 2000; HAWLEY, 2002; FLÜCK e HOPPELER, 2003), incluindo treinamento físico vigoroso, disponibilidade de macronutrientes e estresse térmico. Esse fenômeno de plasticidade muscular é comum em todos os vertebrados (SCHIAFFINO E REGGIANI, 1996).

Em 1873, o anatomista Louis Antoine Ranvier observou que alguns músculos de coelhos apresentavam uma coloração mais avermelhada, de contração lenta e continuada, em comparação com outros músculos pálidos. Essa observação originou a clássica terminologia de fibras musculares brancas e vermelhas, que foi relacionada posteriormente ao conteúdo de mioglobina, uma proteína transportadora de oxigênio que contém ferro (NEEDHAM, 1926; ZIERATH e HAWLEY, 2004).

As fibras musculares esqueléticas de mamíferos adultos têm sido classificadas de acordo com a isoforma da cadeia pesada de miosina que expressam. O músculo esquelético de um mamífero adulto apresenta cinco isoformas da cadeia pesada de miosina, sendo duas de contração lenta (tipos I β e I α) e três de contração rápida (tipos IIa, IIb e IIc/x) (PETTE, D., 2002). As fibras do tipo I apresentam abundância de mioglobina, o que lhes confere a cor avermelhada. Elas possuem metabolismo essencialmente oxidativo e são adaptadas a atividades de longa duração. As fibras do tipo II são adaptadas a contrações rápidas e descontinuadas, e apresentam coloração esbranquiçada, seu metabolismo é principalmente glicolítico. A maioria dos músculos em um mamífero adulto apresenta

uma composição intermediária com quantidades equivalentes de fibras lentas e rápidas (STOCKDALE, 1997).

1.2.2 – Músculo cardíaco

O músculo cardíaco é constituído por células alongadas e ramificadas, com aproximadamente 15 µm de diâmetro por 85 - 100 µm de comprimento, que se conectam por meio de junções intercelulares complexas. Essas células apresentam estriações transversais semelhantes às do músculo esquelético (FIGURA 2), mas ao contrário das fibras esqueléticas que são multinucleadas, as fibras cardíacas possuem apenas um ou dois núcleos centralizados. Além disso, nota-se um grande número de mitocôndrias, que podem constituir cerca de 40 % do volume citoplasmático (TABELA 3). As fibras cardíacas são circundadas por uma delicada bainha de tecido conjuntivo que contém abundante rede de capilares sanguíneos.

TABELA 3 – Porcentagem do volume celular ocupado por componentes de células musculares cardíacas em camundongos. Adaptado de FORBES *et al.* (1985, 1990).

Componente	Ventrículo (%)	Átrio (%)
Miofibrilas	43,3	44,6
Mitocôndria	36,9	25,7
Retículo sarcoplasmático	7,0	12,2
Túbulos transversais	1,8	2,7
Núcleo	1,4	2,1

O coração é formado por duas bombas distintas: o coração direito e esquerdo. Cada uma dessas partes é formada por um átrio e um ventrículo. O átrio direito recebe sangue venoso (carregado de dióxido de carbono, CO₂) pelas veias cavas superior e inferior. Normalmente, 75% do sangue que chega ao átrio direito

flui diretamente para o ventrículo direito, mesmo antes que o átrio se contraia. O ventrículo direito, então, bombeia o sangue venoso, através da artéria pulmonar. A artéria pulmonar direciona o sangue para os pulmões, onde ocorrem as trocas gasosas, a esse evento dá-se o nome de “pequena circulação”. O átrio esquerdo recebe sangue arterial (sangue carregado de oxigênio, O_2) pela veia pulmonar, proveniente dos pulmões. Em seguida, o sangue oxigenado enche o ventrículo esquerdo, o qual bombeia para todos os órgãos e tecidos do corpo humano, por meio da artéria aorta, sendo chamada “grande circulação” (GUYTON e HALL, 2006).

Os eventos cardíacos que acontecem do início de um batimento até o começo do seguinte compõem o chamado ciclo cardíaco, que é regulado pelo potencial de ação gerado espontaneamente e de forma rítmica pelo nodo sinusal. O ciclo cardíaco divide-se em dois momentos: um período de relaxamento, ou diástole, durante a qual ocorre o enchimento do coração; e outro de contração, ou sístole, durante a qual ocorre o esvaziamento do coração (GUYTON e HALL, 2006).

Além dos músculos atrial e ventricular, o músculo cardíaco é composto por fibras musculares condutoras e excitatórias que possuem poucas fibrilas contráteis e são responsáveis pela descarga elétrica na forma de potenciais de ação que se espalham pelo coração, estabelecendo um sistema excitatório que controla o batimento cardíaco rítmico.

Outra diferença importante é a presença de discos intercalares que mantêm a coesão intercelular (FIGURA 2), conectando-se a fibras adjacentes e formando uma complexa rede tridimensional. Ao longo do disco, existem intervalos irregulares denominados junções de hiato (do inglês *gap junction*) que são altamente permeáveis, facilitando a difusão iônica. Essa característica permite a formação de

regiões de baixa resistência elétrica, proporcionando um rápido espalhamento do impulso excitatório de uma fibra para outra ao longo de todo o coração.

1.2.3 – O retículo sarcoplasmático

No músculo em repouso, a concentração de Ca^{2+} citosólica é mantida na faixa de nanomolar (entre 10^{-7} e 10^{-8} M). A contração muscular é iniciada quando essa concentração atinge valores maiores do que 10^{-7} M. O retículo sarcoplasmático (RS) tem um papel essencial na regulação da homeostase de Ca^{2+} , sendo responsável por armazenar e regular o fluxo desse íon. O RS é composto por uma complexa rede de cisternas membranares que envolve grupos de miofilamentos (FIGURA 3). As cisternas terminais do RS (fração pesada) estão localizadas próximas a invaginações do sarcolema, chamadas de túbulos transversos ou túbulos T. No músculo esquelético, o complexo formado de um túbulo T e duas expansões do RS é conhecido como tríade. As tríades não são freqüentes nos células cardíacas, pois os túbulos T geralmente associam-se apenas a uma expansão do retículo, formando a díade. Tais complexos estão envolvidos no acoplamento excitação-contração.

O RS é composto essencialmente por três tipos de proteínas: a Ca^{2+} -ATPase, a calsequestrina e os canais de rianodina. A Ca^{2+} -ATPase é capaz de utilizar a energia da hidrólise de ATP para remover o Ca^{2+} do citoplasma para o interior do RS e está expressa abundantemente ao longo da porção longitudinal do RS (fração leve). A calsequestrina é uma proteína que apresenta dezenas de sítios capazes de ligar Ca^{2+} dentro do compartimento reticular quando esse cátion alcança concentrações milimolares, atuando como agente quelante de Ca^{2+} (IKEMOTO et al, 1974; ENYEDI et al, 1993). Nas cisternas terminais do RS, encontram-se os

receptores de rianodina responsáveis pela liberação de cálcio induzida por cálcio (JORGENSEN et al, 1979).

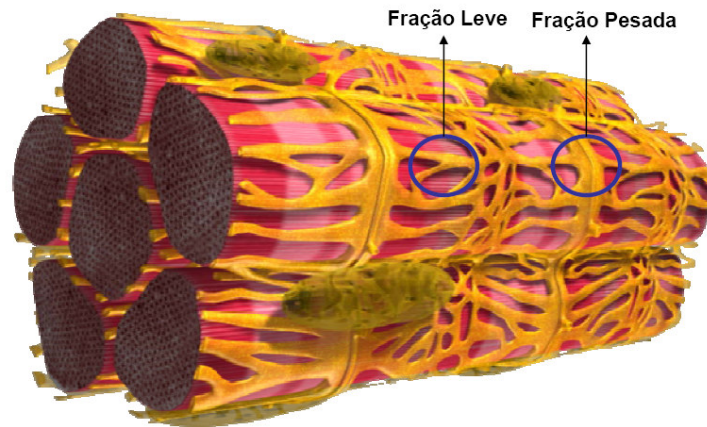


FIGURA 3 – Seção de fibra muscular esquelética. Em amarelo está representado o retículo sarcoplasmático. Circundado em azul observa-se a cisterna terminal (fração pesada) e a porção longitudinal (fração leve) do retículo sarcoplasmático. (Imagem produzida por Alexandre Machado, 2004).

1.2.4 – Acoplamento excitação-contração muscular

Durante o acoplamento excitação-contração no músculo, a despolarização da superfície do sarcolema e dos túbulos T causa a liberação de Ca^{2+} do RS. Isso leva a um aumento das concentrações de Ca^{2+} citoplasmático, que desencadeiam a contração muscular. A despolarização da membrana ativa os receptores de dihidropiridina (canais de cálcio do tipo L) que promovem a abertura dos canais de rianodina (FIGURA 4). Esse mecanismo de acoplamento é diferente nos músculos esquelético e cardíaco. No coração, a despolarização dos túbulos T promove o influxo de Ca^{2+} pelos receptores de dihidropiridina, o que ativa a liberação de cálcio dos canais de rianodina. Esse processo é denominado “liberação de cálcio induzida por cálcio” (do inglês “*calcium induced calcium release*”) (FABIATO, 1985; BEUCKELMANN e WIER, 1988; NABAUER et al, 1989). No músculo esquelético,

entretanto, o influxo de cálcio não é necessário para a ativação dos canais de rianodina e depende da interação física entre os receptores de dihidropiridina e canais de rianodina (SCHNEIDER e CHANDLER, 1973).

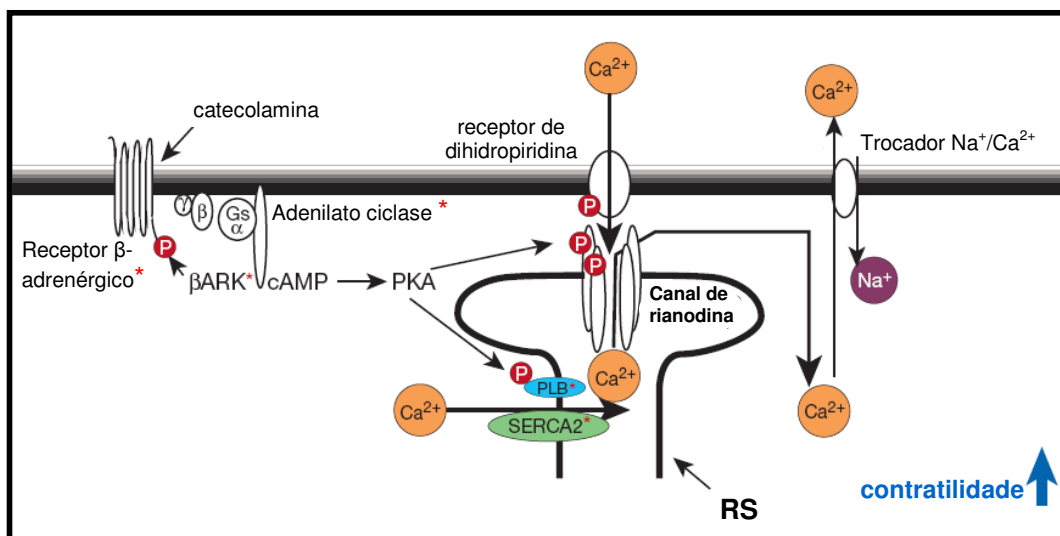


FIGURA 4 - Interação entre vias de sinalização cardíaca. A estimulação β-adrenérgica resulta no aumento da contratilidade e do relaxamento por fosforilar a fosfolambam (PLB, em azul), um inibidor da Ca^{2+} -ATPase do RS (SERCA 2a, em verde), o que aumenta a atividade da bomba de cálcio. A conseqüente liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) pelos canais de rianodina leva ao aumento da contratilidade. O Ca^{2+} é removido do citoplasma pela SERCA 2a e pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, levando ao relaxamento. (figura adaptada de CHIEN, 2000)

Pequenas projeções dos filamentos de miosina formam pontes cruzadas com os filamentos de actina. Essa interação permite que ocorra a contração muscular, onde os filamentos de actina deslizam em direção ao centro do sarcômero. O Ca^{2+} tem papel fundamental nesse processo por ligar-se à subunidade C da troponina e desencadear uma mudança conformacional na tropomiosina, aumentando a interação entre os filamentos de actina e miosina (ZOT e POTTER, 1987). A contração é interrompida pela remoção do Ca^{2+} do citoplasma. No coração, a Ca^{2+} -ATPase do RS contribui para a remoção de cerca de 70 a 90 % do conteúdo de Ca^{2+}

citoplasmático, sendo o restante atribuído à Ca^{2+} -ATPase do sarcolema e ao trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (BERS, 2002).

A contração cardíaca é regulada pelo sistema nervoso simpático, que interage com vias de sinalização que controlam a homeostase do Ca^{2+} . Quando a demanda aumenta, o coração pode responder ao estresse e aumentar o fluxo sanguíneo para tecidos periféricos em segundos. A adrenalina e outros β -agonistas iniciam uma importante sinalização intracelular por ligar-se a receptores β -adrenérgicos na membrana celular (FIGURA 4). Os receptores β -adrenérgicos estão acoplados a proteínas G, que promove a ativação da adenilato ciclase e, conseqüentemente, o aumento dos níveis intracelulares de AMP cíclico (AMPC) (LEVITZKI, 1988). A elevação da concentração de AMPC ativa a proteína quinase dependente de AMPC (PKA), que fosforila e altera a função de proteínas fundamentais para a função cardíaca. Uma destas proteínas é a fosfolambam (PLB), uma pequena proteína transmembrana que é reversivelmente fosforilada e está localizada na membrana do RS. A PLB regula a atividade da Ca^{2+} -ATPase do RS, dependendo do seu estado de fosforilação (MACLENNAN e KRANIAS, 2003).

1.2.5 – Termogênese muscular

Animais endotérmicos controlam a temperatura corporal utilizando mecanismos endógenos para produzir e dissipar calor. Esses mecanismos compõem a termogênese, que pode ser dividida em obrigatória ou adaptativa (JANSKÝ, 1973). A termogênese obrigatória ou basal ocorre em condições metabólicas basais, quando um organismo está em repouso. A termogênese

adaptativa surge em resposta à dieta e a fatores ambientais, como por exemplo, variações de temperatura (LOWELL e SPIEGELMAN, 2000).

O músculo esquelético é um importante sítio de produção de calor para a manutenção da temperatura corporal (JANSKÝ, 1973; ZURLO et al, 1990; DUCHAMP e BARRÉ, 1993). A resposta adaptativa mais evidente no músculo é o tremor (ST do inglês *shivering thermogenesis*), que ocorre quando um organismo é exposto a baixas temperaturas. O tremor consiste em ciclos de contração e relaxamento não sincronizados que não resultam em trabalho muscular efetivo, onde a maior parte (cerca de 75 %) da energia liberada é dissipada na forma de calor (JANSKÝ, 1973; BLOCK, 1994; HOHTOLA, 2002). O tremor é uma manifestação imediata e tende a desaparecer com a exposição prolongada ao frio. Nesta situação, outros mecanismos que não dependem da atividade contrátil passam a contribuir para o controle da temperatura corporal. Esse fenômeno é chamado de termogênese muscular sem tremor (NST do inglês *non-shivering thermogenesis*).

A NST é atribuída comumente à ativação da proteína desacopladora mitocondrial (UCP1 do inglês *uncoupling protein 1*), que dissipa o gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna (NICHOLLS e LOCKE, 1984). Essa proteína é expressa no tecido adiposo marrom (BAT do inglês *brown adipose tissue*) presente em mamíferos de pequeno porte e recém-nascidos. Camundongos que não expressam a UCP1 são intolerantes ao frio, indicando a importância dessa proteína na termogênese adaptativa (ENERBÄCK et al., 1997).

As aves e mamíferos de grande porte, incluindo seres humanos adultos, não apresentam BAT bem desenvolvido e o músculo esquelético, que corresponde a cerca de 40 % do peso corporal, contribui significativamente para a termogênese adaptativa. Entretanto, os mecanismos moleculares responsáveis pela NST no

músculo esquelético não estão completamente esclarecidos. Apesar do músculo esquelético expressar UCP 3, o papel dessa isoforma na termogênese muscular é controverso (GONG et al., 2000; SIMONYAN et al., 2001; MILLS et al., 2003). Sugere-se que a atividade ATPásica muscular tenha uma contribuição importante na termogênese por dissipar parte da energia da hidrólise de ATP na forma de calor (BLOCK, 1994; SILVA, 2006). A Na^+/K^+ e a Ca^{2+} -ATPase são enzimas responsáveis por manter o gradiente iônico às custas da hidrólise de ATP e representam de 10 a 20 % do metabolismo muscular em repouso. Durante a contração muscular, a contribuição da Ca^{2+} -ATPase na taxa metabólica aumenta para 24 % no músculo vermelho e para 58 % no músculo branco (CLAUSEN et al, 1991; JANKÝ, 1995). Nesta tese, pretende-se comparar a contribuição da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático de músculo esquelético branco de ratos e de coelhos na termogênese muscular. Uma diferença marcante entre ratos e coelhos é a ausência de BAT em coelhos adultos, sendo o músculo esquelético o principal sítio termogênico neste animal.

1.3 - A Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático

A Ca^{2+} -ATPase do RS é uma família de enzimas ligadas à membrana que é capaz de interconverter diferentes formas de energia durante a hidrólise de ATP. Os primeiros relatos de que vesículas de RS eram capazes de acumular altas concentrações de Ca^{2+} foram feitos por Hasselbach e Makinose (HASSELBACH e MAKINOSE, 1961, 1962). Essa descoberta foi facilitada pela adição de oxalato na mistura de reação (HASSELBACH e MAKINOSE, 1963). Oxalato é capaz de se difundir através da membrana das vesículas de RS e formar precipitados de oxalato

de cálcio no seu interior, diminuindo a concentração de Ca^{2+} livre e aumentando a capacidade de acumular Ca^{2+} . O acoplamento entre a hidrólise de ATP e a translocação de Ca^{2+} obedece a uma estequiometria de 2:1 ($\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$) (HASSELBACH e MAKINOSE, 1963).

O complexo Mg^{2+} -ATP é essencial para o transporte de Ca^{2+} realizado pela Ca^{2+} -ATPase (YAMAMOTO e TONOMURA, 1967; VIANNA, 1975). Existem duas atividades ATPásicas distintas em vesículas de RS. Na ausência de Ca^{2+} , é possível medir uma atividade ATPásica dependente apenas de Mg^{2+} . A atividade ATPásica decorrente do transporte de Ca^{2+} é calculada pela subtração das atividades ATPásicas total (presença de Ca^{2+} e Mg^{2+}) e dependente de magnésio (presença de Mg^{2+} apenas) (HASSELBACH E MAKINOSE, 1961).

1.3.1 - A estrutura da Ca^{2+} -ATPase

A Ca^{2+} -ATPase é uma proteína integral de membrana (110 kDa) formada por uma cadeia polipeptídica única enovelada em quatro grandes domínios: um domínio transmembrana (M), composto de 10 hélices transmembranas, e três domínios citosólicos. Dois desses domínios, o domínio A e o domínio P (envolvido na fosforilação) são conectados ao domínio M. O terceiro domínio é onde se liga o nucleotídeo (N), sendo conectado ao domínio P (FIGURA 5). O domínio transmembrana M contém os dois sítios de cálcio (MACLENNAN, 1970; MEISSNER e FLEISCHER, 1971; MACLENNAN et al., 1985; WUYTACK et al, 2002).

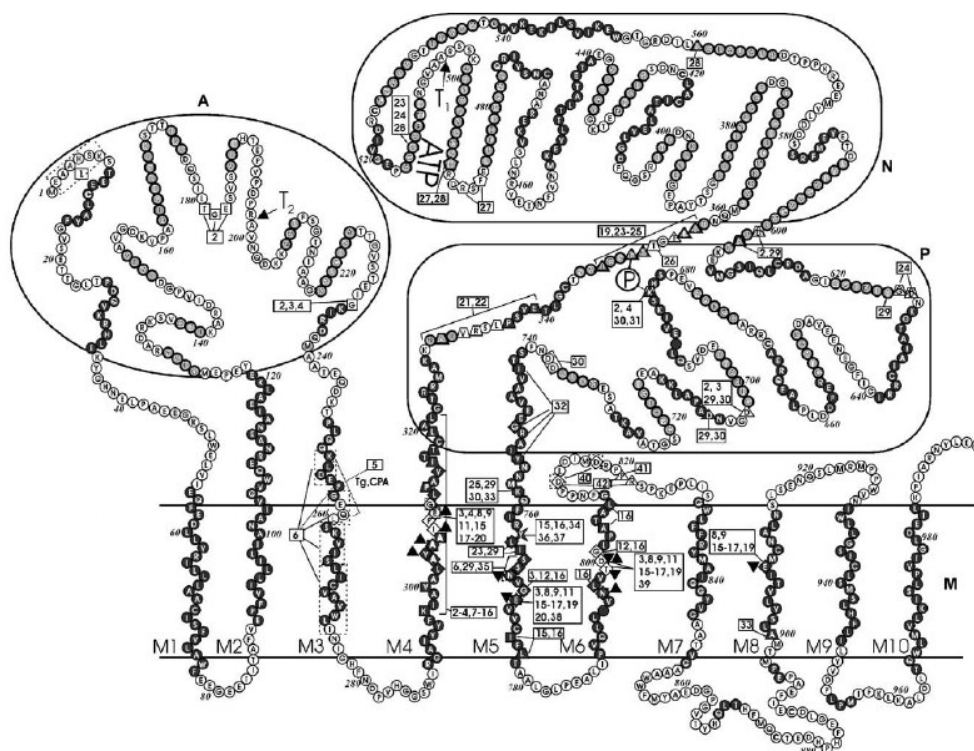


FIGURA 5 – Grandes domínios representados na seqüência primária de aminoácidos da Ca^{2+} -ATPase do RS (WUYTACK et al, 2002).

1.3.2 – O ciclo da Ca^{2+} -ATPase

Durante o processo de catálise, a enzima oscila entre dois estados conformacionais denominados E_1 e E_2 (FIGURA 6). No estado E_1 , os sítios de alta afinidade por Ca^{2+} encontram-se voltados para o citosol (reação 1, FIGURA 7). Neste momento, dois íons Ca^{2+} se ligam de forma cooperativa, ainda na ausência de ATP (INESI et al, 1980; FORGE et al, 1993). A forma E_1 é mais estável e permite a ligação do ATP à enzima com alta afinidade (reação 2, FIGURA 7). Após a formação de uma fosfoenzima de alta energia ($2\text{Ca}:E_1\sim\text{P}$), ocorre uma mudança conformacional e a translocação de dois íons Ca^{2+} para o interior do RS. A ligação acil fosfato da fosfoenzima se converte em uma ligação de baixa energia (reação 3, FIGURA 7). Devido a uma redução da afinidade da enzima por Ca^{2+} , o íon é liberado no lúmen do retículo (reação 4, FIGURA 7). Nas etapas seguintes, ocorre a hidrólise

da fosfoenzima e formação do estado conformacional E_2 , o que permite o início de novos ciclos de catálise.

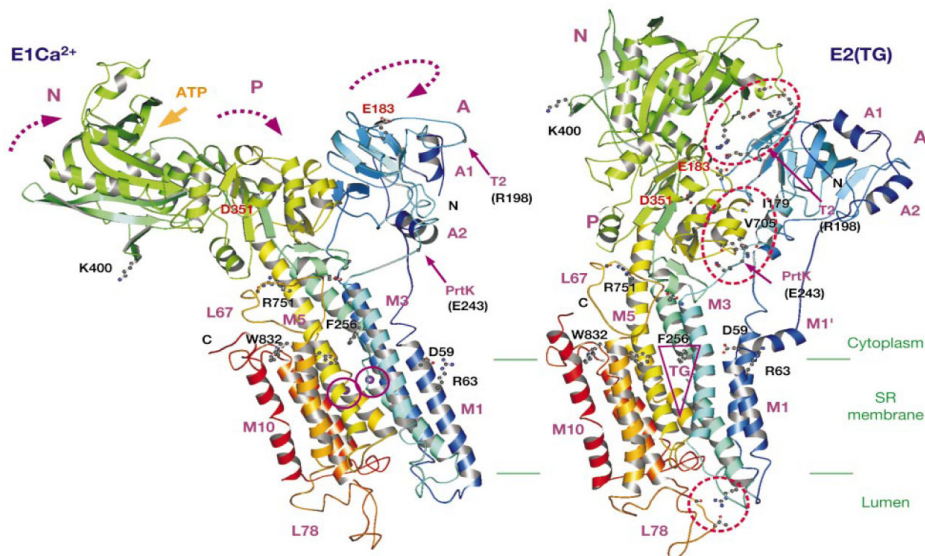


FIGURA 6 – Representação em fita cristalográfica da estrutura da Ca^{2+} -ATPase de RS. Na esquerda a enzima está no estado E_1 e a ligação de dois íons de cálcio está representado pelos círculos rosas. As setas rosas (tracejadas) indicam a direção do movimento do domínio citoplasmático durante a mudança de E_1Ca^{2+} para E_2TG . Na direita a enzima está no estado E_2 , na ausência de cálcio e ligado à tapsigargina (TG). Os círculos vermelhos (tracejados) indicam pontes de hidrogênio extras em E_2TG . (TOYOSHIMA e NOMURA, 2000).

Uma característica importante deste ciclo catalítico é o mecanismo de transdução de energia. Durante o ciclo catalítico ocorre uma grande mudança na constante de equilíbrio da hidrólise (K_{eq}) do resíduo acil fosfato da fosfoenzima, e o trabalho (transporte de Ca^{2+}), estaria ligado a essa mudança de K_{eq} , e não à hidrólise do composto fosforilado (DE MEIS, 1989, 1993). Esta mudança de energia da fosfoenzima (reação 4, FIGURA 7) está relacionada a uma mudança na atividade da água no microambiente catalítico (DE MEIS et al., 1980). A energia de hidrólise de diferentes compostos fosfoanídros, como pirofosfato, ATP e acetil fosfato, parece ser determinada pela diferença de energia de solvatação entre os reagentes e produtos (GEORGE et al., 1970; HAYES et al., 1978; DE MEIS et al., 1980, 1985;

DE MEIS, 1984, 1989, 1993; ROMERO e DE MEIS, 1989). Desta maneira, uma mudança na atividade da água no sítio catalítico da enzima levaria a uma mudança na energia de solvatação da fosfoenzima e a uma mudança na energia de hidrólise.

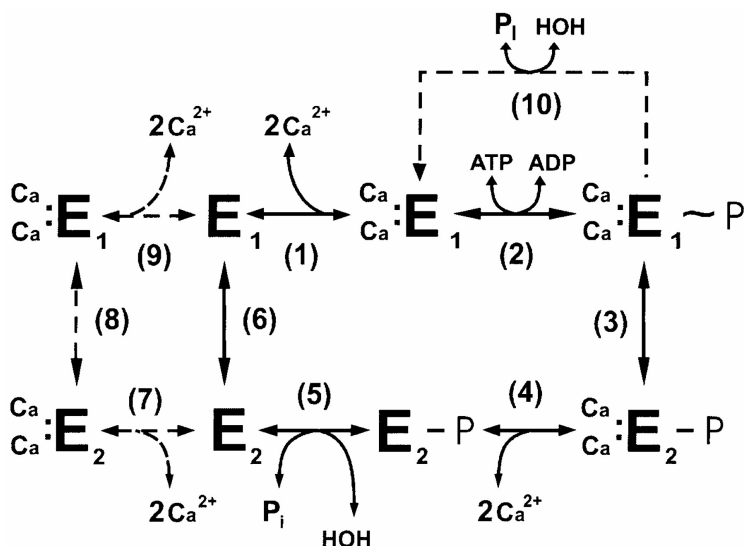


FIGURA 7 – Ciclo catalítico da Ca^{2+} -ATPase na presença de gradiente de Ca^{2+} . Representação das diversas etapas de transporte de cálcio para o interior do retículo sarcoplasmático (reações 1 à 6). O efluxo de Ca^{2+} desacoplado da síntese de ATP ocorre nas etapas 7 à 9 (DE MEIS et al., 1996). A atividade ATPásica desacoplada do transporte de Ca^{2+} é representada pela reação 10 (YU e INESI, 1995; FORTEA et al., 2000; DE MEIS, 2001).

O ciclo catalítico da Ca^{2+} -ATPase pode ser revertido após a formação de um gradiente de Ca^{2+} através da membrana do RS, culminando na síntese de ATP (MAKINOSE e HASSELBACH, 1971; TANFORD, 1984; INESI, 1985; FASSOLD e HASSELBACH, 1988; DE MEIS, 2000). A reversão do ciclo é iniciada pela fosforilação da forma E_2 da enzima por P_i (reação 5, FIGURA 7). Na ausência de Ca^{2+} no lado externo das vesículas e na presença de ADP, P_i e Mg^{2+} , foi observada a liberação de Ca^{2+} associada à síntese de ATP (BARLOGIE et al., 1971; MAKINOSE e HASSELBACH, 1971; MAKINOSE 1971, 1972). Para cada dois íons de Ca^{2+} liberados, uma molécula de ATP é sintetizada. A síntese de ATP ocorre

apenas na presença de concentrações de Ca^{2+} livre suficientes para saturar os sítios de baixa afinidade.

Recentemente, foram caracterizadas duas ramificações no ciclo catalítico da Ca^{2+} -ATPase. Uma delas corresponde à saída de Ca^{2+} dissociada da síntese de ATP, representada pelas reações 7, 8 e 9 da figura 7 (HASSELBACH et al., 1972). Nesta situação, a Ca^{2+} -ATPase funciona como um “canal” de Ca^{2+} , onde o íon “vaza” passivamente pela própria enzima, sem que ocorra a síntese de ATP (DE MEIS e INESI, 1992). Em 1995, Yu e Inesi descreveram a outra ramificação do ciclo catalítico, caracterizada pela atividade ATPásica desacoplada do transporte de Ca^{2+} (YU e INESI, 1995). Observou-se que o aumento de Ca^{2+} no lúmen do RS gerava a diminuição da relação de dois íons de Ca^{2+} para cada molécula de ATP hidrolisada. Desta maneira, o intermediário $2\text{Ca}:E_1\sim\text{P}$ poderia ser hidrolisado sem que houvesse o transporte de Ca^{2+} (reação 10, FIGURA 7).

Como descrito acima, a Ca^{2+} -ATPase é uma enzima capaz de interconverter diferentes formas de energia. Durante a catálise a energia química derivada da hidrólise da molécula de ATP é usada para a formação de um gradiente osmótico. No sentido reverso, a energia osmótica acumulada pode ser usada para sintetizar ATP. Energias química e osmótica não são as únicas formas envolvidas neste processo. Durante o transporte de cálcio, parte da energia química é convertida em trabalho e parte é dissipada sob forma de calor. Entretanto, essa produção de calor pode ser modulada pela Ca^{2+} -ATPase e depende do gradiente de cálcio. Na presença de gradiente, entre - 20 e - 24 kcal por mol de ATP hidrolisado (ΔH^{cal} , ΔH calorimétrico) são medidas. Com adição de A23187, um ionóforo de Ca^{2+} , o gradiente é desfeito e o calor produzido reduz para - 10 a - 12 kcal/mol de ATP hidrolisado (DE MEIS et al, 1997; DE MEIS, 1998, 2001; MITIDIERI e DE MEIS,

1999). Esta diferença no ΔH^{cal} correlaciona-se com a hidrólise de ATP desacoplada do transporte de cálcio (reação 10, FIGURA 6) (DE MEIS, 2001).

1.3.3 – As isoformas da Ca^{2+} -ATPase

A Ca^{2+} -ATPase apresenta diferentes isoformas, denominadas SERCA (do inglês *sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase*), que são expressas em diferentes tecidos. As isoformas são codificadas por três genes distintos (SERCA 1, SERCA 2 e SERCA 3), que podem sofrer processamento alternativo. A SERCA 1 apresenta um grau de homologia de 84 % com SERCA 2a e de 75 % com SERCA 3, enquanto SERCA 2a e SERCA 3 apresentam homologia de 77% entre si (MACLENNAN et al., 1985; BURK et al., 1989; LYTTON et al., 1992; MACLENNAN et al., 1992). A isoforma SERCA 1 é encontrada exclusivamente no músculo esquelético branco, de contração rápida (MACLENNAN et al., 1985). O gene da SERCA 2 origina as isoformas SERCA 2a, expressa nos músculos cardíaco e esquelético vermelho (contração lenta), e SERCA 2b, expressa amplamente em tecidos não musculares como plaquetas, cerebelo e tecidos linfóides (BURK et al., 1989; WUYTACK et al., 1994; WU et al., 1995). As isoformas SERCA 2a e 2b diferem-se apenas na região carboxi-terminal onde os quatro últimos resíduos de aminoácidos da SERCA 2a são substituídos por uma cauda de 49 aminoácidos na SERCA 2b. Essa seqüência de aminoácidos é hidrofóbica e pode constituir a décima primeira região intermembrana da SERCA 2b (LYTTON e MACLENNAN, 1988; CAMPBELL et al., 1992). A SERCA 3 é expressa em tecidos não musculares como plaquetas e tecidos linfóides (BURK et al., 1989; WUYTACK et al., 1994; WU et al., 1995).

A expressão das isoformas de SERCA em células COS-1 (células renais de macaco) permitiu estudar as diferenças cinéticas entre as isoformas. Todas as isoformas de Ca^{2+} -ATPase expressas em células COS-1 são igualmente sensíveis a tapsigargina (LYTTON et al., 1992). Entretanto, a SERCA 2b apresenta uma taxa de *turnover* menor que as outras isoformas. Alguns trabalhos mostram que as isoformas SERCA 1, SERCA 2a e SERCA 2b apresentam afinidade semelhante ao Ca^{2+} (CAMPBELL et al., 1992; LYTTON et al., 1992). Outro grupo propõe que a SERCA 2b tem uma afinidade ao Ca^{2+} duas vezes maior do que a SERCA 2a (VERBOOMEN et al., 1992, 1994).

As isoformas de SERCA diferem-se também pela quantidade de calor produzida por mol de ATP hidrolisado (ΔH^{cal}). Vesículas de RS derivadas de plaquetas e músculo esquelético vermelho, que expressam SERCA 2, apresentam um ΔH^{cal} entre -11 e -14 kcal/mol. Já em vesículas de RS derivadas de músculo esquelético branco, que expressam somente SERCA 1, o ΔH^{cal} é duas vezes maior, variando de -20 a -25 kcal/mol ATP hidrolisado. Essa diferença pode ser explicada pela alta atividade desacoplada do transporte de Ca^{2+} observada para SERCA1. Como descrito anteriormente, a ausência de gradiente de cálcio é capaz de abolir essa atividade desacoplada da SERCA. A adição de A23187 reduz o ΔH^{cal} de vesículas de músculo branco para cerca de - 8 kcal/mol, enquanto que uma modesta diminuição no ΔH^{cal} é observada em vesículas de RS derivadas de músculo vermelho (REIS et al., 2002). Desta maneira, sugere-se que os mecanismos de modulação da dissipação de calor sejam mais efetivos do músculo branco em comparação com o músculo vermelho.

1.3.4 – Regulação da atividade da Ca^{2+} -ATPase por fosfolambam e sarcolipina

As isoformas de SERCA expressas no músculo são reguladas por duas proteínas homólogas: fosfolambam (PLB, do inglês *phospholamban*) (TADA e KADOMA, 1989; SIMMERMAN e JONES, 1998) e sarcolipina (SLN) (ODERMATT et al., 1997, 1998; HELLSTERN et al., 2001). Ambas as proteínas estão presentes na membrana do retículo sarcoplasmático e podem interagir com a SERCA, inibindo sua atividade por reduzir a afinidade aparente por Ca^{2+} (MACLENNAN et al., 2003).

PLB é uma proteína composta por 52 aminoácidos que pode ocorrer na forma monomérica (forma ativa) ou pentamérica (forma inativa) (CORNEA et al., 1997). Estruturalmente, a PLB apresenta três domínios: dois citosólicos (Ia e Ib) e um transmembrana (II) (FIGURA 8). O domínio Ia contém os resíduos serina 16 (Ser^{16}) e treonina 17 (Thr^{17}), que são fosforilados por proteína quinase dependente de AMP cíclico ou por proteína quinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina, respectivamente (MACLENNAN e KRANIAS, 2003). A fosforilação do resíduo Ser^{16} da PLB pode ocorrer independentemente da fosforilação de Thr^{17} in vivo (KRANIAS, 1985) e sugere-se que seja um pré-requisito para a fosforilação de Thr^{17} durante a estimulação β -adrenérgica (CHU et al., 2000). Na forma desfosforilada, PLB interage com SERCA e reduz a afinidade aparente por Ca^{2+} . James et al. (1989) demonstraram que o resíduo lisina 3 (Lys^3) presente no domínio Ia da PLB interage com os resíduos lisina 397 e 400 (Lys^{397} e Lys^{400}) do domínio citosólico da SERCA 2a (JAMES et al., 1989). Essa interação ocorre no estado conformacional E_2 da SERCA e é desfeita pelo aumento na concentração de Ca^{2+} ou pela fosforilação da PLB (CANTILINA et al., 1993, MACLENNAN e KRANIAS, 2003).

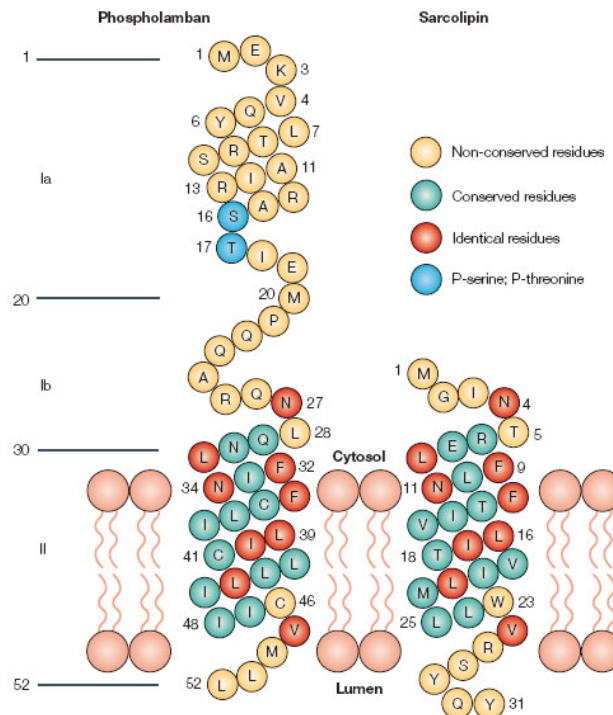


FIGURA 8 – Representação esquemática da seqüência primária de aminoácidos da fosfolambam (PLB, esquerda) e da sarcoplipina (SLN, direita). Os aminoácidos estão indicados como: não conservados (amarelo), conservados (verde), idênticos entre PLB e SLN (vermelho) e fosforilados (azul; Ser¹⁶ e Thr¹⁷ da PLB). (MACLENNAN e KRANIAS, 2003)

A sarcoplipina (SLN) é uma proteína composta por 31 aminoácidos que apresenta uma seqüência transmembrana semelhante à PLB (FIGURA 8), mas difere-se na porção C terminal por ser mais hidrofílica que a PLB. A SLN regula a SERCA por reduzir a afinidade por Ca²⁺ e a V_{max}, sendo capaz de aumentar o efeito inibitório da PLB na SERCA (ASAHI et al, 2002). Estudos *in vitro* mostraram que a SLN liga-se diretamente na PLB e previne a sua polimerização, resultando no aumento da forma ativa da PLB (monomérica) (ASAHI et al, 2002).

Em coelhos, PLB é expressa predominantemente nos músculos cardíaco e esquelético vermelho, onde regula a atividade da SERCA 2a, enquanto que no músculo esquelético branco a SLN é o principal regulador da SERCA 1 (ODERMATT et al., 1998). Entretanto, a expressão dessas proteínas pode variar entre as espécies. Em pequenos roedores, como camundongos e ratos, o músculo

esquelético (vermelho e branco) não expressa quantidades significativas de SLN ou PLB (TUPLING et al., 2002; VANGHELUWE et al., 2005). Vangheluwe et al. (2005) mostraram que SLN e PLB estão co-expressas em átrios de camundongos e ratos, enquanto que SLN está ausente em átrios de coelhos e porcos. A expressão de SLN atrial parece ser significativa apenas em pequenos mamíferos (VANGHELUWE et al., 2005). A relevância fisiológica da diversidade de expressão de SLN e PLB entre os animais não é completamente entendida.

1.4 – Hormônios tireoideanos

Os hormônios tireoideanos são reguladores importantes do metabolismo e desenvolvimento de diferentes órgãos. A glândula tireóide está presente em todos os vertebrados e é responsável por sintetizar e liberar 3,5,3'-triiodo L-tironina (T3) e tiroxina (T4). T4 é o principal hormônio secretado pela tireóide e uma desiodação local em tecidos periféricos produz T3, o hormônio tireoideano biologicamente ativo (YEN, 2001; SILVA, 2005). A maioria do T3 e T4 circulante encontra-se associado a proteínas carreadoras, principalmente a proteína ligadora de T4 e, em menor grau, a transtiretina e albumina. Os hormônios tireoideanos podem ser liberados rapidamente dessas proteínas, o que facilita a sua entrada na célula através de transportadores específicos (HENNEMANN et al., 2001; JANSEN et al., 2005). Três desiodases (D1, D2 e D3) estão envolvidas na desiodação do hormônio tireoideano (FIGURA 9). D1 está localizada predominantemente na glândula tireóide, fígado e rins e é responsável pela ativação ou inativação de T4. D2 é encontrada no cérebro, glândula pituitária e tireóide e gera a forma ativa do hormônio tireoideano T3 via desiodação de T4. D3 é expressa no cérebro, na placenta e no útero, sendo

importante para o desenvolvimento fetal e para a produção de T3 reverso (rT3) (FIGURA 9) (BIANCO e KIM, 2006).

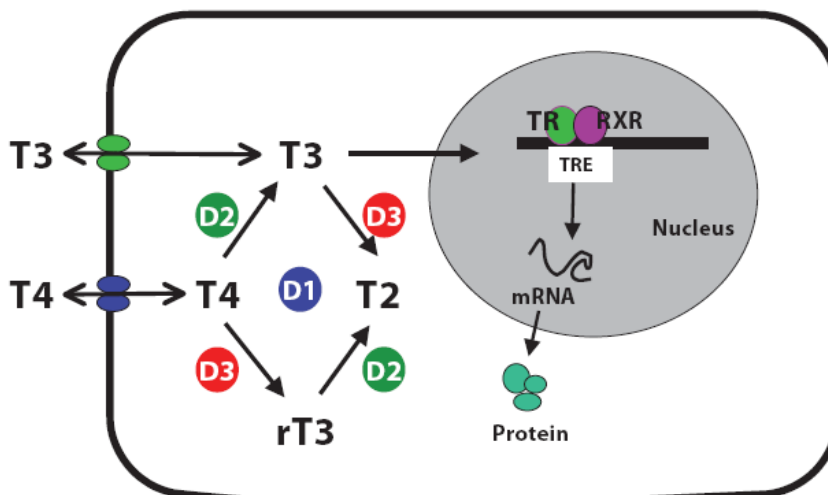


FIGURA 9 – Representação esquemática do transporte, metabolismo e ação dos hormônios tireoideanos na célula (BOELAERT e FRANKLYN, 2005).

A produção dos hormônios tireoideanos é controlada pela tireotrofina plasmática (TSH, do inglês *thyroid-stimulating hormone*) sintetizada pela glândula pituitária anterior em resposta ao hormônio liberador de TSH (TRH, do inglês *thyrotropin-releasing hormone*), que é secretado pelo hipotálamo. O aumento da concentração de T3 e T4 livres inibe a produção e liberação de TSH e TRH e contribui, dessa maneira, para manter os níveis de hormônios circulantes dentro da normalidade (BOELAERT e FRANKLYN, 2005).

T3 exerce suas ações celulares por ligar-se a receptores nucleares de hormônio tireoideano (TR, do inglês *thyroid hormone nuclear receptors*) (BRENT, 1994; KAHALY e DILLMANN, 2005). Esses receptores nucleares estão associados a elementos responsivos ao hormônio tireoideano (TRE, do inglês *thyroid hormone response element*), que correspondem a seqüências específicas do DNA. Os TRs

pertencem à superfamília dos receptores de esteróides e podem ligar-se aos TREs tanto na ausência como na presença do ligante. TRs ligam-se aos TREs como homodímero ou como heterodímero formado com o receptor retinóico X (RXR, do inglês *retinoid x receptor*) (LAZAR e CHIN, 1990). Na ausência de T3, TRs associam-se a proteínas co-repressoras que atuam reprimindo a transcrição de genes alvo. Após a ligação do hormônio tireoideano ao TR, a proteína co-repressora é deslocada e uma proteína ativadora é recrutada, induzindo a maquinaria de transcrição gênica (FIGURA 10) (WU e KOENIG, 2000).

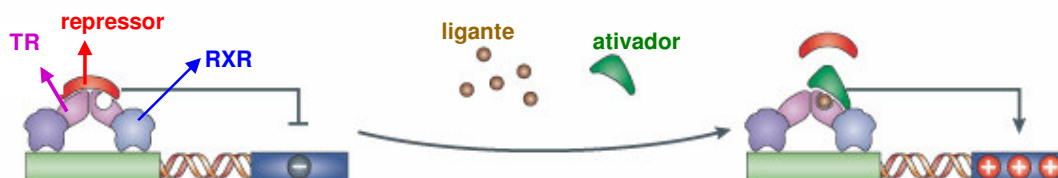


FIGURA 10 – Representação esquemática da ação genômica do hormônio tireoideano. Na ausência do ligante (marrom), o heterodímero TR-RXR (rosa e azul) associa-se a proteínas co-repressoras (vermelho) que ativamente reprimem a transcrição de genes alvo (esquerda). Após a ligação do hormônio, TR-RXR recruta co-ativadores (verde) que induzem a transcrição de genes alvo (direita) (Figura adaptada de KING-JONES e THUMMEL, 2005).

Os efeitos fisiológicos do T3 são mediados de acordo com o subtipo de receptor expresso no tecido. Existem dois genes que codificam receptores de hormônio tireoideano (TR α e TR β), que podem sofrer processamento alternativo e originar diferentes isoformas (HARVEY e WILLIAMS, 2000). As isoformas diferem-se em sua região amino terminal, responsável pela interação com fatores de transcrição (HADZIC et al., 1995; ZHANG e LAZAR, 2000). TR α_1 é a principal isoforma expressa no coração, enquanto que TR β_1 predomina no fígado e no cérebro adulto. TR β_2 é expressa principalmente na glândula pituitária e no hipotálamo (FALCONE et al., 1992; ZHANG e LAZAR, 2000).

Os hormônios tireoideanos podem exercer os efeitos biológicos por ação não genômica, independente da síntese protéica (DAVIS e DAVIS, 2002). Sugere-se que os mecanismos não genômicos sejam importantes para a proliferação e mobilidade de células endoteliais e de algumas células tumorais por regular a dinâmica de remodelamento do citoesqueleto (DAVIS et al., 2008). Outros efeitos diretos mediados por T3 incluem mudanças em canais iônicos de membrana, no translocador de nucleotídeo mitocondrial, e em vias de sinalização intracelular no coração (DAVIS e DAVIS, 2002; HIORI et al., 2006).

O excesso ou deficiência do hormônio tireoideano provoca síndromes denominadas hiper- e hipotireoidismo, respectivamente. O hipotireoidismo é a deficiência hormonal patológica mais comum na população e apresenta diversos sintomas clínicos, incluindo bradicardia, enfraquecimento muscular, intolerância ao frio, fadiga, depressão, infertilidade e alterações no ciclo menstrual (ROBERTS e LADENSON, 2004; DEVDHAR et al., 2007). Os sintomas característicos do hipertireoidismo são taquicardia, fibrilação atrial, ansiedade, agitação e perda de peso (COOPER, 2003; NAYAK e HODAK, 2007).

1.4.1 – Papel dos hormônios tireoideanos na termogênese

Os hormônios tireoideanos aumentam a taxa metabólica basal, estimulando a termogênese obrigatória, e são considerados essenciais para a termogênese adaptativa (SILVA, 2006). Animais hipo- e hipertireóides apresentam intolerância ao frio e calor, respectivamente, evidenciando o papel dos hormônios tireoideanos na homeostase da temperatura corporal (SILVA, 2003). Além disso, pequenos roedores hipotireóides desenvolvem hipotermia profunda quando expostos ao frio,

sendo rapidamente revertida após 24 - 48 horas de injeções de baixas doses de T4 suficientes para normalizar o estado eutireóideo no BAT (BIANCO e SILVA, 1987). Animais que não expressam a desidase 2 (D2) ou os receptores do hormônio tireoideano também são intolerantes às baixas temperaturas (CHRISTOFFOLETE et al., 2004; GOLOZOUBOVA et al., 2004).

Os mecanismos que aumentam a termogênese obrigatória envolvem o aumento do consumo de ATP e a redução da eficiência termodinâmica para a síntese de ATP. O aumento da hidrólise de ATP para manter o gradiente iônico contribui para o aumento da produção de calor. Direta ou indiretamente, os hormônios tireoideanos estimulam a entrada de Na⁺ nas células e a extrusão de K⁺, forçando a Na⁺-K⁺-ATPase a manter o gradiente entre esses dois íons às custas da hidrólise de ATP (HABER e LOEB, 1986; ISMAIL-BEIGI et al., 1986). Além disso, a expressão da Na⁺-K⁺-ATPase é regulada positivamente pelos hormônios tireoideanos (ISMAIL-BEIGI, 1992). Entretanto, sugere-se que a contribuição da atividade dessa enzima no gasto energético dependente de hormônio tireoideano seja muito pequena no estado eutireóideo (EDELMAN e ISMAIL-BEIGI, 1974). Outra enzima regulada positivamente pelo hormônio tireoideano é a SERCA. Diversos trabalhos mostraram que o hipertireoidismo promove o aumento da expressão da SERCA 1 em músculo vermelho (solear) (SIMONIDES e VAN HARDEVELD, 1989; ARAI et al., 1991; SAYEN et al., 1992). Associado ao aumento de expressão de SERCA 1 em músculo vermelho, observou-se um aumento da atividade ATPásica desacoplada e da produção de calor pela SERCA (ARRUDA et al., 2003). Estima-se que 40 – 50 % da mudança da taxa metabólica muscular observada na transição do estado hipotireóideo para o eutireóideo seja devido à homeostase de cálcio promovida pelo RS (CLAUSEN et al., 1991). Portanto, a atividade da SERCA pode

ser considerada um importante mecanismo para a regulação da termogênese corporal. Grande parte dos trabalhos que investigam os mecanismos moleculares da termogênese adaptativa é realizada em roedores de pequeno porte que possuem BAT, como ratos e camundongos. Nesta tese, pretende-se investigar o papel dos hormônios tireoideanos na termogênese muscular de coelhos expostos ao frio.

T3 é considerado o principal regulador da biogênese mitocondrial (MUTVEI et al., 1989), modulando a expressão de diversos genes nucleares e mitocondriais (WRUTNIAK-CABELLO et al., 2001; HARPER e SEIFERT, 2008). Os hormônios tireoideanos podem influenciar diretamente a transcrição de genes que codificam enzimas da fosforilação oxidativa através da ligação a receptores de hormônio tireoideano presentes na mitocôndria (SEKERIS, 1990; ENRIQUEZ et al., 1999; WRUTNIAK-CABELLO et al., 2000). PGC1 α , UCPs, citocromo oxidase e ATP sintase são exemplos de proteínas reguladas positivamente pelo hormônio tireoideano (SILVA, 2006). No BAT de pequenos roedores, a ação sinérgica dos hormônios tireoideanos e do sistema nervoso simpático afeta a expressão e atividade da UCP1, promovendo a fosforilação oxidativa desacoplada e a produção de calor. A termogênese do BAT é um processo termoregulatório importante em neonatos, animais hibernantes e em pequenos mamíferos, como ratos e camundongos (HIMMS-HAGEN, 1989, 1995; CANNON e NEDERGAARD, 2004). Já no músculo esquelético, o aumento de T3 induz o aumento da UCP3, promovendo o desacoplamento mitocondrial (GONG et al., 1997; MORENO et al., 1997; DE LANGE et al., 2007).

1.4.2 – Papel dos hormônios tireoideanos na fisiologia cardiovascular

Os fibroblastos são as células predominantes no coração, embora não participem da contração muscular. Os cardiomiócitos representam somente um terço das células cardíacas e contêm mais de 60 % das proteínas existentes no coração devido ao seu tamanho (DILLMANN, 2002). Além disso, os cardiomiócitos apresentam alta expressão de receptores nucleares de hormônios tireoideanos, principalmente TR α (GLOSS et al., 2001). Entretanto, a conversão de T4 para T3 em cardiomiócitos de roedores é insignificante em decorrência da baixa expressão de D1 e D2 (PACHUCKI, 2001). Por essa razão, a maioria do T3 deriva da captação direta do sangue.

Os efeitos do hormônio tireoideano no cardiomiócito estão intimamente associados com a função cardíaca via regulação da expressão de genes regulatórios e estruturais. O hipertireoidismo está associado a um aumento da contração cardíaca, aumentando a velocidade de relaxamento diastólico e a frequência cardíaca (KLEIN e OJAMAA, 2001). Em muitos casos, a sensibilidade ao sistema β -adrenérgico pode estar aumentada no estado hipertireóideo (POLIKAR et al., 1993), possivelmente devido ao aumento da expressão de receptores β -adrenérgicos (BAHOOUTH, 1991). As alterações na contração cardíaca são decorrentes de mudanças de expressão de proteínas envolvidas na homeostase de cálcio e de proteínas que compõem os miofilamentos. A estequiometria entre SERCA2 e fosfolambam é um fator importante para a regulação da contração e do relaxamento cardíaco. O aumento de SERCA e a diminuição de fosfolambam no coração hipertireóideo resultam em um aumento da atividade da captação de cálcio, já que a SERCA está menos inibida pela fosfolambam (ARAI et al., 1991; HARTONG

et al., 1994; KIMURA et al., 1994; KISS et al., 1994; REED et al., 2000). Além disso, a expressão da sarcolipina está reduzida no átrio de camundongos hipertireóides (MINAMISAWA et al., 2006). T3 aumenta a expressão dos canais de rianodina (JIANG et al., 2000) e regula negativamente a expressão da cadeia pesada da β -miosina (HADDAD et al., 2003; KLEIN e DANZI, 2007). O hipertireoidismo em humanos e em modelos experimentais leva a uma hipertrofia cardíaca, resultante do aumento do trabalho imposto no coração pelo aumento da carga hemodinâmica (KLEIN e HONG, 1986; BIONDI et al., 2000).

O hipotireoidismo induz o aumento da expressão da D2 no músculo cardíaco (WAGNER et al., 2003). A hipertrofia ventricular patológica está caracterizada por mudanças na expressão de proteínas contráteis semelhante ao observado no hipotireoidismo: diminuição da expressão de SERCA 2a e da isoforma α da cadeia pesada da miosina e aumento da expressão da isoforma β da cadeia pesada da miosina e fosfolambam (ITO et al., 2001; KLEIN e OJAMAA, 2001; WASSEN et al., 2002). Estes efeitos podem estar relacionados a uma diminuição da expressão de receptores de hormônios tireoideanos no coração (KINUGAWA et al., 2001) ou a um aumento da expressão de D3 que converte T4 e T3 para o hormônio inativo T3 reverso (WASSEN et al., 2002)

Além de alterações na função contrátil, os hormônios tireoideanos afetam o metabolismo cardíaco pela modulação da expressão de proteínas envolvidas na glicólise (MYNATT et al., 1994; SUGDEN et al., 2000; KLEIN e DANZI, 2007; PORTMAN, 2008). A suplementação crônica de hormônio tireoideano diminui a atividade do complexo piruvato desidrogenase (PDH, do inglês *pyruvate dehydrogenase*) por aumentar a expressão de PDH quinase, que fosforila e inativa PDH (PRIESTMAN et al., 1997; SUGDEN et al., 2000). O hipotireoidismo sistêmico

reduz a atividade da carnitina palmitoil transferase 1 muscular, principal reguladora da oxidação de ácidos graxos (MYNATT et al., 1994). Pacientes hipotireóides apresentam hipercolesterolemia e um aumento dos níveis de lipoproteínas de baixa-densidade (LDL, do inglês *low-density lipoproteins*) (DUNTAS, 2002). Alterações dos níveis dos hormônios tireoideanos provocam mudanças no metabolismo cardíaco por diversos mecanismos, acentuando os danos na função cardíaca gerados por modificações das propriedades contráteis. Entretanto, os efeitos dos hormônios tireoideanos na termogênese cardíaca ainda não são completamente esclarecidos.

2 – OBJETIVOS

O objetivo geral desta tese foi avaliar os mecanismos envolvidos no processo de interconversão de energia pela Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático de músculos cardíaco e esquelético de coelhos e ratos. Estudou-se o papel do hormônio tireoideano e o efeito da exposição ao frio na atividade termogênica da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático de músculos cardíaco e esquelético de coelhos. Para entender as diferenças termogênicas entre ratos e coelhos, comparou-se a contribuição da Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático de músculo esquelético desses animais na produção de calor. Além disso, investigou-se a capacidade da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático de músculos cardíaco de ratos e coelhos em utilizar glicose 6-fosfato como sistema regenerador de ATP.

Os resultados desta tese serão divididos de acordo com os artigos abaixo:

- 1) **Artigo 1:** Modulação do músculo cardíaco de coelhos pelo hormônio tireoideano e exposição ao frio: papel da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático e respiração mitocondrial. (KETZER et al., 2008. Submetido à revista *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*).
- 2) **Artigo 2:** Termogênese no músculo esquelético em coelhos normais e hipotireóideos expostos ao frio: papel da Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático. (ARRUDA e KETZER et al., 2008. Aceito para publicação na revista *Endocrinology*, com *minor revisions*).

3) Artigo 3:

A) Produção de calor pela Ca^{2+} -ATPase de músculo esquelético branco de ratos e coelhos.

B) Utilização da glicose 6-fosfato como sistema regenerador de ATP pela Ca^{2+} -ATPase do músculo cardíaco de ratos e coelhos.

(Ketzer e de Meis, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 369:265–269, 2008)

3 – RESULTADOS

ARTIGO 1: Modulação do músculo cardíaco de coelhos pelo hormônio tireoideano e exposição ao frio: papel da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático e respiração mitocondrial.

Luisa A Ketzer, Ana Paula Arruda, Denise P Carvalho e Leopoldo de Meis.

Artigo submetido à revista *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 2008.

O papel dos hormônios tireoideanos na atividade termogênica da Ca^{2+} -ATPásica de retículo sarcoplasmático foi recentemente descrito em músculos esqueléticos branco e vermelho de coelhos (ARRUDA et al., 2003). Entretanto, diferente do músculo esquelético, o coração expressa somente a isoforma 2 da Ca^{2+} -ATPase (SERCA 2a), que é regulada pela proteína fosfolambam (PLB). Nesse trabalho, investigou-se a atividade termogênica da SERCA 2a de coração de coelhos eu, hipo e hipertireóideos. Além disso, estudou-se o efeito da exposição ao frio (4°C por 72 ou 240 horas) de coelhos eutireóideos na atividade da SERCA 2 de músculo cardíaco. Associado a esses resultados, avaliou-se as alterações na respiração mitocondrial cardíaca de coelhos em resposta ao estado tireóideo e à exposição ao frio.

Os principais resultados deste trabalho foram:

- 1) O hipertireoidismo promove o aumento da expressão de SERCA 2 e o aumento da fosforilação do resíduo de Ser¹⁶ da PLB. Entretanto, o conteúdo de PLB total não é alterado. Como resultado do aumento da razão SERCA 2/ PLB, observa-se um aumento da captação de cálcio e da

taxa de hidrólise de ATP no coração desses coelhos. A velocidade de consumo de oxigênio está aumentada em decorrência da elevação do número de mitocôndrias, já que a atividade citrato sintase é maior. A citrato sintase é uma enzima usualmente utilizada como indicador de número de mitocôndrias.

- 2) A expressão de PLB está aumentada no coração de coelhos hipotireóides, porém a PLB encontra-se mais desfosforilada. A expressão de SERCA 2a não sofre alteração neste tecido. Conseqüentemente, a atividade da SERCA está mais inibida pela PLB. Pode-se confirmar essa inibição pela redução da captação de Ca^{2+} , atividade ATPásica e produção de calor. No coração hipotireóideo, observa-se uma diminuição significativa do consumo de oxigênio associada a uma redução da atividade da citrato sintase (biogênese mitocondrial).
- 3) A exposição ao frio (4°C) de coelhos eutireóides por 72 horas promove um aumento da expressão de SERCA 2 e PLB fosforilada (Ser¹⁶) no músculo cardíaco, semelhante ao observado no hipertireoidismo. Em contraste, ocorre uma redução do conteúdo total de PLB. As alterações de expressão verificadas levam ao aumento da atividade da SERCA nesses animais, visto pelo aumento significativo da captação de Ca^{2+} e taxa de hidrólise de ATP. A velocidade de consumo de oxigênio aumenta significativamente em células permeabilizadas do coração de coelhos aclimatados a 4°C por 72 horas. Curiosamente, as alterações observadas na expressão de proteínas, nos parâmetros cinéticos da SERCA e na respiração mitocondrial são revertidas após 240 horas de exposição ao

frio, sugerindo uma adaptação do músculo cardíaco destes animais à baixa temperatura.

- 4) Os hormônios tireoideanos e a exposição ao frio não promovem um aumento da produção de calor por mol de ATP hidrolisado (ΔH^{cal}).

TITLE: MODULATION OF RABBIT CARDIAC BIOENERGETICS BY THYROID HORMONE AND COLD EXPOSURE: ROLE OF SARCOPLASMIC RETICULUM Ca^{2+} -ATPase AND MITOCHONDRIAL RESPIRATION.

Abbreviated title: Cardiac bioenergetics, thyroid hormone and cold exposure.

Authors: Luisa A Ketzer, Ana Paula Arruda, Denise P Carvalho[#] and Leopoldo de Meis

Affiliations: From the Instituto de Bioquímica Médica and [#]Instituto de Biofísica Carlos Chagas F^o, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, RJ, 21941-590, Brasil.

Corresponding author:

Correspondence to Leopoldo de Meis, Tel.: +55 21 2270 1635, fax +55 21 2270 8647, e-mail: demeis@bioqmed.ufrj.br

Key words: thyroid hormone, cold exposure, heart, Ca^{2+} -ATPase, phospholamban, oxygen consumption

Grants: This work was supported by grants from PRONEX - Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). LAK is recipient of fellowship from CNPq. APA is recipient of fellowship from FAPERJ.

Abstract

Changes in thyroid hormones (TH) promote alterations in biochemical and physiological functioning of heart. These alterations are related within proteins responsible for calcium homeostasis and contraction. In addition, it is well documented that thermoregulation in homeotherms is dependent of TH. However, little is known about the role of thyroid hormone in rabbit cardiac muscle thermogenesis. In this report, we investigated heat production by cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in hypo- and hyperthyroid rabbits. We also studied the cold exposure of euthyroid rabbits and measured the mitochondrial respiration of permeabilized cardiac cells. Hyperthyroidism and short-term cold exposure (72 hours) increased calcium uptake, ATPase activity and oxygen consumption in heart. In contrast, hypothyroid rabbits exhibit a decrease in calcium cycling and mitochondrial respiration. These changes were associated with alterations in SERCA2a/PLB ratio, PLB(Ser¹⁶) phosphorylation and mitochondrial density. Interestingly, in euthyroid animals exposed to 4°C for 240 hours were normal kinetic parameters of SERCA and mitochondria, suggested an adaptation to low temperature. The calorimetric enthalpy (ΔH^{cal}) of SERCA 2a, calculated by dividing the amount of heat released by the amount of ATP hydrolyzed, was not modulated by TH or cold exposure. In addition, the ΔH^{cal} of heart was several fold lower than that measured in skeletal muscles. In conclusion, these data show that mitochondrial oxidative phosphorylation and SERCA function are essential to sustained contractile function in response to cold exposure and changes in thyroid state.

Introduction

Thyroid hormone (TH) significantly affects the cardiovascular system, producing profound changes in cardiac contractility, cardiac output, blood pressure, and myocardial oxygen consumption (5, 21). The mechanisms underlying these changes include direct gene transcriptional regulation by thyroid hormone, affecting the excitation-contraction coupling through alterations in cytosolic Ca^{2+} cycling (23, 42, 46) and myofilaments expression (16, 17, 27). Furthermore, TH mediates energetic metabolism changes in myocardium (40) and interacts with the sympathetic nervous system (SNS) by altering adrenergic receptor function and/or density (3, 30, 44).

The sarcoplasmic reticulum (SR) plays a central role in the contraction and relaxation coupling of the myocardium. The SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA) transports Ca^{2+} inside the SR lumen using ATP hydrolysis as energy source (10, 18, 20). Three distinct genes encode SERCA isoforms, but the physiological significance of this isoform diversity is not clear. Cardiac muscle express only the SERCA 2a protein, white muscles express SERCA1 and red muscles express both SERCA 1 and SERCA 2a and. The SERCA 2b and SERCA 3 genes are expressed in non-muscular tissues such as blood platelets and lymphoid tissue (30, 31, 32).

The thyroid hormone 3,5,3'-triiodo L-thyronine (T3) regulates the expression and the function of SERCA proteins, and these effects vary depending on the muscle type (1, 2, 43, 45). In the heart, SERCA 2a expression is modulate by T3 levels, and this effect is accompanied by alterations in phospholamban (PLB) content, a protein that inhibits SERCA activity through direct protein-protein interaction (1, 34, 35, 42). Recently, it has been demonstrated that SERCA 1 is able to hydrolyze ATP uncoupled from Ca^{2+} transport, corresponding to a pathway through which the enzyme converts most of the energy derived from ATP hydrolysis into heat (12). This uncoupled activity is positively regulated by thyroid hormone in skeletal muscle (2, 41), and is responsible for changes in muscular thermogenesis (11). Contrasting with the role of T3 in skeletal muscle, little is known about the role of thyroid hormone in cardiac muscle thermogenesis.

Chronic exposure to low temperature is associated with high incidence of hypertension and related cardiovascular diseases, including cardiac hypertrophy (15, 47, 49). Acute cold exposure leads to (i) increased heart rate; (ii) systolic and diastolic blood pressures, and (iii) enhanced cardiovascular responsiveness to β -adrenergic stimulation (4, 15). Previous studies have shown that cold exposure activates the SNS (37) and increase circulating thyroid hormones (36). There are several reports dealing with the effect of cold exposure on rats. However, as far as know, the effect of cold exposure in rabbits has not been studied. One of the main differences between rat and rabbits is the presence of brown adipose tissue (BAT) in rats. It is well documented that thermoregulation of rats depends substantially on the BAT function. As far as we know, there are scant or no evidence of BAT in rabbits. Therefore, it could be expected that the effect of cold exposure and thermoregulation in rats and rabbits could be different. In this report, we investigated the heat production by heart Ca^{2+} -ATPase

in hypo- and hyperthyroid rabbits. We also studied the cold acclimatization of euthyroid rabbits and measured the oxidative metabolism of permeabilized cardiac cells.

Materials and Methods

Hyperthyroidism, hypothyroidism and cold acclimation: Adult male New Zealand white rabbits were divided into different groups: euthyroid, hypothyroid, and hyperthyroid rabbits kept at room temperature (25-28°C) and euthyroid animals exposed to 4°C for either 72 hours or 240 hours. Hypothyroid state was induced by oral administration of propylthiouracil (0.08%), in drinking water for 21 days (6). Hyperthyroidism was induced by injection of T₄ (100 µg/ kg body weight), subcutaneously, for 10 days (1, 2). Blood was obtained at the day of sacrifice by cardiac puncture and serum T₄ and T₃ levels were determined by specific radioimmunoassays kit using ¹²⁵I as tracer (2). During all the experiments, the animals were treated in accordance with the published rules for animal laboratorial care and the protocol has been approved by the Institutional Committee for the Use of Animals for Research (CAUAP).

Gel electrophoresis and Western blot. Protein samples were resolved on polyacrylamide gels: 7.5 % for SERCA2 protein, 10 % for (Ser¹⁶) phosphorylated phospholamban and 13 % for total phospholamban, according to Laemmli (28). Electrotransfer of proteins from the gel to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes were performed for 20 min at 250 mA per gel in 25 mM Tris, 192 mM glycine and 10% methanol using a Mini Trans-Blot cell from Bio-Rad. Membranes were blocked with 3% non-fat dry milk in Tris-buffered saline with 0.1% Tween-20 for 1h at room temperature. Membranes were then washed and incubated for 1h with anti-SERCA2, anti-PLB or anti-phospho(Ser¹⁶)-PLB monoclonal antibodies at room temperature. The membranes were washed and incubated with anti-mouse secondary antibody. The immunoblots were revealed using an ECL detection kit from Amersham-Pharmacia Biotech, UK. Monoclonal antibody SERCA 2 (clone IID8) was obtained from Affinity Bioreagents Inc. (Brazil) and monoclonal antibodies PLB and phospho(Ser¹⁶)-PLB were obtained from Upstate Biotechnology.

Sarcoplasmic reticulum vesicles (SRV). Vesicles derived from the longitudinal sarcoplasmic reticulum of rabbit cardiac muscle were prepared as previously described (13) and stored at -70°C .

Ca²⁺ uptake. This parameter was measured by the filtration method (8). For ⁴⁵Ca uptake, trace amounts of ⁴⁵Ca were included in the assay medium. The reaction was arrested by filtering samples of the assay medium through Millipore filters. After filtration, the filters were washed five times with 5 ml of 3 mM La(NO₃)₃ and the radioactivity remaining on the filters was counted using a liquid scintillation counter.

ATPase activity. ATP hydrolysis was estimated by measuring the Pi released using a colorimetric method (14). The reaction was arrested with trichloroacetic acid (final concentration 5% w/v). Two different ATPase activities can be distinguished in sarcoplasmic reticulum vesicles (10, 18, 20). The magnesium-dependent activity (Mg²⁺-ATPase) requires only Mg²⁺ for its activation and is measured in the presence of 10 mM EGTA to remove contaminant Ca²⁺ from the medium. The Ca²⁺-dependent ATPase activity (Ca²⁺-ATPase), which is correlated with Ca²⁺ transport, is determined by subtracting the Mg²⁺-ATPase from the activity measured in the presence of both Mg²⁺ and Ca²⁺. In the figures and tables the values of SERCA ATPase activity corresponds to the Ca²⁺-ATPase.

Heat of reaction. This was measured using an OMEGA Isothermal Titration Calorimeter from Microcal, Inc. (Northampton, MA). The calorimeter cell (1.5 ml) was filled with reaction medium, and the reference cell was filled with Milli-Q water. After equilibration at 35 °C, the reaction was started by injecting vesicles into the sample cell and heat change was recorded for 30 min. The volume of vesicle suspension injected into the reaction cell varied between 0.03 and 0.05 ml. Heat change measured during the initial 2 min after vesicle injection was discarded in order to avoid artifacts such as heat derived from the dilution of the vesicle suspension and binding of ions to the Ca²⁺-ATPase. The duration of these events is less than one minute. Calorimetric enthalpy (ΔH^{cal}) is calculated by dividing the amount of heat released by the amount of ATP hydrolyzed at the same time (12). The units used were moles for substrate hydrolyzed and kcal for heat released. Negative values indicate that the reaction is exothermic. In a typical experiment the assay media was divided into three samples, which were used for the simultaneous measurement of Ca²⁺ uptake, ATP hydrolysis and heat

release. These different measurements were started simultaneously with vesicles to a final concentration of 50 μg protein/ml.

Oxygen consumption and citrate synthase activity. For oxygen consumption measurements, a small piece (1-2 mg) left ventricular muscle was placed into a Petri dish on ice with 1 ml of relaxing solution containing Ca^{2+} /EGTA buffer (10 mM), free calcium (0.1 μM), imidazole (20 mM), K^+ 2-(4-morpholino) ethanesulfonic acid (MES; 50 mM), dithiothreitol (DTT; 0.5 mM), MgCl_2 (6.56 mM), ATP (5.77 mM), phosphocreatine (15 mM), pH 7.1, and individual fiber bundles were separated with a sharp forceps. The fiber bundles were permeabilized for 30 min in 3 ml of ice-cold relaxing solution containing saponin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). The fibers were washed with a medium (MitoMed2; Oroboros, Innsbruck, Austria) containing: Na_2EDTA (0,5 mM), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (5 mM), KH_2PO_4 (10 mM), Mannitol (110 mM), KCl (60 mM), Tris (60 mM) two times for 10 minutes. The muscle bundles were then immediately transferred into a respirometer (Oxygraph-2k; Oroboros) containing an air-saturated respiration medium at 25°C. We choose 25°C since in this temperature the amount of oxygen available in the assay medium is greater than at 37°C. The respiration medium (MiR05; Oroboros, Innsbruck, Austria) composition contained sucrose (110 mM), potassium lactobionate (60 mM), EGTA (0.5 mM), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3 mM), taurine (20 mM), KH_2PO_4 (10 mM), HEPES (20 mM), bovine serum albumin (2 mg/ml), pH 7.1. The maximal respiratory rate was measured in a mixture containing succinate (10 mM), pyruvate + malate (5 mM) and ADP (2 mM). The Oxygraph-2k is a two-chamber titration-injection respirometer with a limit of oxygen flux detection of 1 $\text{pmol s}^{-1} \text{ml}^{-1}$ (7). Citrate synthase activity was determined spectrophotometrically, as described previously (19).

Statistical Analysis. All results were analyzed by unpaired t-test.

Results

Body weight, heart weight and hormone levels.

Serum levels of T4 and T3 were significantly elevated in hyperthyroid rabbits ($p < 0.001$) and decreased in hypothyroid rabbits (Table 1). Compared with the euthyroid rabbits, the normalized heart weight (heart weight / body weight) was significantly increased in hyperthyroid rabbits ($p < 0.001$;

Table 1). This modification was due to both a decrease in body weight (final body weight 2.62 ± 0.10 kg (n=17) in euthyroid and 2.11 ± 0.09 kg (n=9) in hyperthyroid animals; $p < 0.02$) and an increase in heart weight (5.53 ± 0.22 mg (n=15) in euthyroid and 6.17 ± 0.40 mg (n=11) in hyperthyroid animals). These values indicate that hyperthyroid rabbits tend to develop a cardiac hypertrophy. In hypothyroid rabbits the final body weight did not change significantly but the heart weight decreased from 5.53 ± 0.22 (n=15) mg in euthyroid to 4.61 ± 0.16 mg (n=4) in hypothyroid rabbits ($p < 0.001$). Therefore, different from hyperthyroid rabbits, the decrease of normalized heart weight in hypothyroid animals ($p < 0.01$, Table 1), was mainly due to a reduction of the cardiac weight.

There was no change of heart weight in euthyroid rabbits exposed to 4 °C for 72 or 240 hours. In spite of the heart weight, the serum T3 level was significantly increased in short-term cold exposure (72 hours) when compared to euthyroid rabbits kept at room temperature. The serum T3 level returned to the normal level when the low temperature exposure was raised from 72 to 240 hours. These data suggest that short-term cold exposure rapidly stimulates the thyroid gland, increasing serum T3 levels. Stimulation would then be abolished when the rabbit adapted at 4° C.

Western-blot analysis of SERCA2, PLB and phospho(Ser¹⁶)-PLB.

The relative levels of SERCA2, PLB and phospho(Ser¹⁶)-PLB proteins were determined by quantitative immunoblotting using monoclonal antibodies. The ratio of SERCA2/PLB protein is an important determinant of calcium cycling kinetics in the cardiac myocyte (22, 26). In addition, Ser¹⁶ phosphorylation of PLB by cAMP-dependent protein kinase (PKA) relieves the inhibition of SERCA2 and is considered to be the primary mechanism by which β -adrenergic agonists exert positive inotropic actions on the heart (26). Hyperthyroidism induced an increase in SERCA2 expression (2.1 folds) and the phosphorylation levels of PLB (1.3 folds), but had no effect in total PLB protein expression (Figure 1). We observed that in rabbits there is a decrease in SERCA2a-to-PLB ratio in hypothyroidism, which was mainly due to the increase in PLB protein levels (1.44 folds) and was not accompanied by a decrease in SERCA2 levels. Furthermore, the phosphorylated PLB level was decreased in hypothyroid hearts (Figure 1E).

We now show that a short term cold exposure of euthyroid rabbits mimics the effect noted in hyperthyroidism. A comparison between euthyroid rabbits kept at room temperature and rabbits kept at 4°C during 72 hours revealed a significant change in the pattern of protein expression. In rabbits kept at 4°C for 72 h there was a ~25% increase of SERCA 2 expression (Fig. 1B), and a ~40% decrease of PLB expression (Fig. 1D). From the PLB available in the cell, the fraction phosphorylated in rabbits heart kept at 4°C for 72 h was ~75 % higher than that found in rabbits kept at room temperature (Fig. 1F). Interestingly, all the modifications were abolished when the duration of cold exposure was raised from 72 to 240 h (Figure 1B, D and F). These data suggest that short-term cold exposure increases Ser¹⁶ phosphorylation of PLB, probably due to an increased thyroid function (Table 1) which would account for increased SERCA2 expression and decreased in PLB content. What surprised us was that all these effects are reversible after long-term cold exposure (240 hours), as if in rabbits, cold exposure would simulate a temporary hyperthyroidism.

Kinetic parameters of SERCA: Ca²⁺ uptake, ATP hydrolysis and heat production.

Taffet et al. (1992) reported that the K_m for ATP of rat cardiac muscle SR was 6-10 higher for Mg²⁺-ATPase activity than for Ca²⁺-ATPase activity (500 μM vs 50 μM, respectively). For this reason, we tested ATP-regenerating system, composed by ATP (50 μM), phosphoenolpyruvate (2 mM) and pyruvate kinase (10 U/ml), in the assay medium to reduce ATP availability. Using this system, a higher proportion of the total ATPase activity corresponded to Ca²⁺-ATPase activity (72.4 ± 1.3 %, Fig. 2B) than with 1 mM ATP (36.8 ± 2.3 %, Fig. 2A) in rabbit cardiac SR. Thus, all kinetic parameters of SERCA were measured using the ATP-regenerating system.

Hyperthyroidism for 10 days and cold exposure for 72 hours caused similar effects in Ca²⁺ uptake, increasing both the initial rate of Ca²⁺ uptake and the amount of Ca²⁺ accumulated by SERCA vesicles isolated from rabbit cardiac muscle (Figure 3 and Table 2). The enhancement in Ca²⁺ uptake was probably due to the increased SERCA2a-to-PLB ratio and PLB phosphorylation in these animals. However, no significant alterations were observed in heat released by SERCA, suggesting that this enzyme activity is more coupled to calcium transport. Rabbits acclimated to 4°C for a longer period (240 hours) had the same SERCA kinetic parameters as those from control room acclimated rabbits,

suggesting an adaptation to low temperature. Although SERCA2 protein level remained unchanged, the SERCA2a-to-PLB ratio was significantly reduced in the hypothyroid animals compared with the control group, leading to reduction in the amount of Ca^{2+} accumulated (Figure 3A), the rate of Ca^{2+} -dependent ATPase activity (Figure 4A) and heat production (Figure 5A) by SERCA2.

Heat generation plays a key role in the regulation of metabolism and energetic balance of the cell. The ΔH calorimetric (ΔH^{cal}) is determined by dividing the rate of heat production by the rate of ATP hydrolysis; the negative value indicates that the reaction is exothermic (2). It was shown that the ΔH^{cal} of SRV derived from rabbit white muscle, which express only Ca^{2+} -ATPase isoform 1, is higher (ΔH^{cal} -20 to -22 kcal/mol) than of SRV derived from rabbit red muscle (ΔH^{cal} -10 to -12 kcal/mol), which express both SERCA 1 and 2a isoforms (10, 11, 41). In this paper, we have shown for the first time that SRV isolated from cardiac muscle exhibited a ΔH^{cal} several folds lower (ΔH^{cal} -4 to -5.5 kcal/mol) than that observed in others muscles (Table 2). Cardiac muscle expresses only SERCA 2 isoform, a unique characteristic of the heart. Furthermore, neither thyroid hormone nor cold exposure was able to modulate the amount of heat released during the hydrolysis of each ATP molecule (ΔH^{cal}) (Table 2).

Oxygen consumption and citrate synthase activity.

Oxygen consumption was measured in permeabilized left ventricular muscle fibers (Fig 7A and B). Cardiac muscles derived from hyperthyroid rabbits consumed more O_2 than control cardiac muscle. A similar result was observed in hearts of euthyroid rabbits acclimated at 4°C for 72 hours, in which a significant increase of mitochondrial O_2 consumption occurred (1.44 fold). This not was observed in the hearts from animals subjected to long-term cold exposure. In contrast, hypothyroidism promoted a significant decrease (26 %) of mitochondrial respiration (Fig 7A and B).

Citrate synthase is an enzyme of the Krebs cycle commonly used as a marker of mitochondrial density (19). In order to verify whether the alterations in oxygen consumption described above were correlated with changes in mitochondria biogenesis, we measured citrate synthase activity. As shown in figure 7, the increase of citrate synthase activity was associated with the enhancement of mitochondrial respiration found in hyperthyroidism and in short-term cold exposure. In

hypothyroidism a decrease of citrate synthase activity was observed. Therefore, a direct relationship between mitochondrial O₂ consumption and mitochondrial density occurred in the heart. Cold exposure for 10 days did not promote any change in citrate synthase activity in cardiac muscle.

Discussion

The cardiovascular alterations that occur in various thyroid states are well recognized. The mechanisms for these changes include alterations in cardiac metabolism and protein expression in the contractile apparatus and sarcoplasmic reticulum. The present study shown new findings related to cardiac bioenergetics: 1) ΔH^{cal} of SERCA 2a not is modulated by thyroid hormone and cold exposure and is several folds lower than those skeletal muscles and 2) heart is able to adapt for long-term cold exposure, restoring calcium homeostasis and mitochondrial function.

Cardiac hypertrophy that occurs during hyperthyroidism (Table 1) is primarily the result of increased work imposed on the heart through enhancement of hemodynamic performance (24). Previous studies have shown that chronic cold exposure (≥ 4 weeks) promoted significant increase of heart weight, accompanied by elevations of systolic, diastolic and mean blood pressures (15, 50). Our results showed that acclimation at 4°C for 72 or 240 hours was not enough to promote cardiac hypertrophy (Table 1). By contrast, hypothyroidism caused cardiac atrophy and leads to impaired cardiac function, as previously reported (29).

The stoichiometry of SERCA2a:PLB is an important determinant of calcium cycling kinetics in heart (22, 26). PLB is a transmembrane protein that interacts and inhibits SERCA by lowering its apparent Ca²⁺-affinity. Inhibitory interactions are disrupted by phosphorylation at distinct sites by different protein kinases: in residues Ser¹⁶ or Thr¹⁷ by cAMP-dependent or Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase, respectively. Phosphorylation of Ser¹⁶ in PLB can occur independently of Thr¹⁷ in vivo and may be a prerequisite for Thr¹⁷ phosphorylation during β -agonist stimulation (9). Here we showed that short-term cold exposure (72 hours) enhanced the ratio of SERCA2a:PLB in a manner similar to observed in hyperthyroid animals. Furthermore, both animals exhibit high level of Ser¹⁶ phosphorylated PLB, causing a significant increase in SERCA 2 pumping activity (Figure 3). These

effects were associated with increase serum T3 levels (Table 1). Interestingly, Mirit et al. (1999) described opposite effects in cardiac muscle of rats acclimated to heat (34°C) for 4 weeks, showed decrease in SERCA2a:PLB ratio and serum levels of T3 and T4.

It is well documented that effect of T3 on SERCA expression and function varies depending on the muscle type (1, 2, 43, 45). In addition, high T3 levels promote an increase in uncoupled ATPase activity in white (0.8 folds) and red (4 folds) muscles. This uncoupled activity was attributed to SERCA1 isoform and contribute to muscular thermogenesis (2). In cardiac muscle, which express only SERCA2 isoform, changes in thyroid state not were accompanied with alterations in uncoupled ATPase activities, as observed by similar values of ΔH^{cal} between groups (Table 2). As expected, cardiac muscle not contributed to increase of heat production in response to environmental changes and thyroid state.

Kojima et al. (1994) suggested that intracellular calcium plays a regulatory role in the link between cardiac mechanics and energy production. The increased cardiac performance is associated with an increased calcium load within myocyte, increasing force generation (25). Ours data showed that the increase calcium cycling in hyperthyroid and short-term cold-exposed hearts was related to enhancement of mitochondrial function and biogenesis. This relationship is associated with stimulation of thyroid gland, augmenting cardiac output. Thyroid hormones regulate transcription of a number of nuclear and mitochondrial-encoded respiratory genes (38).

In summary, this paper showed important contribution for understood of cardiac bioenergetics: heat production was not affected by thyroid hormone, since calorimetric enthalpy (ΔH^{cal}) not varied between groups. However, mitochondrial oxidative phosphorylation and SERCA function was essential to sustained contractile function in response to the cold exposure and changes in thyroid state.

Acknowledgments

We are grateful to Valdecir A. Suzano and Antônio Carlos Miranda for technical assistance. This work was supported by grants from Programa de Nucleos de Excelencia (PRONEX), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e

Tecnológico (CNPq) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

References

1. **Arai M, Otsu K, MacLennan DH, Alpert NR, Periasamy M.** Effect of thyroid hormone on the expression of mRNA encoding sarcoplasmic reticulum proteins. *Circ Res* 69:266-276, 1991.
2. **Arruda AP, da-Silva WS, Carvalho DP, de Meis L.** Hyperthyroidism increases the uncoupled ATPase activity and heat production by the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Biochem J* 375:753-760, 2003.
3. **Bahouth SW, Cui X, Beauchamp MJ, Park EA.** Thyroid hormone induces beta1-adrenergic receptor gene transcription through a direct repeat separated by five nucleotides. *J Mol Cell Cardiol* 29:3223-3237, 1997.
4. **Barney CC, Katovich MJ, Fregly MJ, Tyler PE.** Changes in beta-adrenergic responsiveness of rats during chronic cold exposure. *J Appl Physiol* 49:923-929, 1980.
5. **Biondi B, Palmieri EA, Lombardi G, Fazio S.** Effects of thyroid hormone on cardiac function: the relative importance of heart rate, loading conditions, and myocardial contractility in the regulation of cardiac performance in human hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 968-974, 2002.
6. **Boerth SR, Artman, M** Thyroid hormone regulates Na^{+} - Ca^{2+} exchanger expression during postnatal maturation and in adult rabbit ventricular myocardium. *Cardiovasc Res* 31:E145-E152, 1996.
7. **Boushel R, Gnaiger E, Schjerling P, Skovbro M, Kraunsøe R, Dela F** Patients with type 2 diabetes have normal mitochondrial function in skeletal muscle. *Diabetologia* 50:790-796, 2007.
8. **Chiesi M, Inesi G** The use of quench reagents for resolution of single transport cycles in sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*; 254:10370-10377, 1979.
9. **Chu G, Lester JW, Young KB, Luo W, Zhai J, Kranias EG.** A single site (Ser^{16}) phosphorylation in phospholamban is sufficient in mediating its maximal cardiac responses to beta –agonists. *J Biol Chem*; 275:38938-38943, 2000.
10. **de Meis L, Vianna AL.** Energy interconversion by the Ca^{2+} -dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 48:275-292, 1979.
11. **de Meis L.** Role of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase on heat production and thermogenesis. *Biosci Rep* 21:113-137, 2001.
12. **de Meis L.** Uncoupled ATPase activity and heat production by the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase Regulation by ADP. *J Biol Chem* 276:25078-25087, 2001.
13. **Eletr S, Inesi G.** Phase changes in the lipid moieties of sarcoplasmic reticulum membranes induced by temperature and protein conformational changes. *Biochim Biophys Acta* 290:178-185, 1972.
14. **Fiske CH, Subbarow Y.** The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 66: 375 – 400, 1925.
15. **Fregly MJ, Kikta DC, Threutte RM, Torres JL, Barney CC.** Development of hypertension in rats during chronic exposure to cold. *J Appl Physiol* 66: 741–749, 1989.
16. **Gustafson TA, Bahl JJ, Markham BE, Roeske WR, Morkin E** Hormonal regulation of myosin heavy chain and alpha-actin gene expression in cultured fetal rat heart myocytes. *J Biol Chem* 262:13316-13322, 1987.
17. **Haddad F, Bodell PW, Qin AX, Giger JM, Baldwin KM.** Role of antisense RNA in coordinating cardiac myosin heavy chain gene switching. *J Biol Chem* 278:37132-37138, 2003.
18. **Hasselbach W, Makinose M.** On the mechanism of calcium transport across the membrane of the sarcoplasmic reticulum. *Biochem Z* 339:94-111, 1963.

19. **Hutter E, Renner K, Pfister G, Stöckl P, Jansen-Dürr P, Gnaiger E.** Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts. *Biochem J* 380:919-928, 2004.
20. **Inesi G.** Mechanism of calcium transport. *Annu Rev Physiol* 47:573-601, 1985.
21. **Kahaly GJ, Dillmann WH** Thyroid hormone action in the heart. *Endocr Rev* 26:704-728, 2005.
22. **Kirchberger MA, Tada M, Repke DI, Katz AM.** Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase stimulation of calcium uptake by canine cardiac microsomes. *J Mol Cell Cardiol* 4:673-680, 1972.
23. **Kiss E, Jakab G, Kranias EG, Edes I** Thyroid hormone-induced alterations in phospholamban protein expression Regulatory effects on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transport and myocardial relaxation. *Circ Res* 75:245-251, 1994.
24. **Klein I, Hong C.** Effects of thyroid hormone on cardiac size and myosin content of the heterotopically transplanted rat heart. *J Clin Invest* 77:1694-1698, 1986.
25. **Kojima S, Wu ST, Parmley WW, Wikman-Coffelt J.** Relationship between intracellular calcium and oxygen consumption: effects of perfusion pressure, extracellular calcium, dobutamine, and nifedipine. *Am Heart J* 127:386-391, 1994.
26. **Koss KL, Kranias EG.** Phospholamban: a prominent regulator of myocardial contractility. *Circ Res* 79:1059-1063, 1996.
27. **Ladenson PW, Sherman SI, Baughman KL, Ray PE, Feldman AM.** Reversible alterations in myocardial gene expression in a young man with dilated cardiomyopathy and hypothyroidism. *Proc Natl Acad Sci USA*; 89:5251-5255, 1992.
28. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 1970.
29. **Liu Y, Redetzke RA, Said S, Pottala JV, de Escobar GM, Gerdes AM.** Serum thyroid hormone levels may not accurately reflect thyroid tissue levels and cardiac function in mild hypothyroidism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294:H2137-H2143, 2008.
30. **Lytton J, MacLennan DH.** Molecular cloning of cDNAs from human kidney coding for two alternatively spliced products of the cardiac Ca^{2+} -ATPase gene. *J Biol Chem* 263:15024-15031, 1988.
31. **Lytton J, Westlin M, Burk SE, Shull GE, MacLennan DH.** Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J Biol Chem* 267:14483-14489, 1992.
32. **MacLennan DH, Brandl CJ, Korczak B, Green NM.** Amino-acid sequence of a Ca^{2+} + Mg^{2+} -dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature*; 316:696-700, 1985.
33. **Mirit E, Palmon A, Hasin Y, Horowitz M.** Heat acclimation induces changes in cardiac mechanical performance: the role of thyroid hormone. *Am J Physiol* 276:R550-R558, 1999.
34. **Nagai R, Zarain-Herzberg A, Brandl CJ, Fujii J, Tada M, MacLennan DH, Alpert NR, Periasamy M.** Regulation of myocardial Ca^{2+} -ATPase and phospholamban mRNA expression in response to pressure overload and thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86:2966-2970, 1989.
35. **Ojamaa K, Kenessey A, Klein I.** Thyroid hormone regulation of phospholamban phosphorylation in the rat heart. *Endocrinology* 141:2139-2144, 2000.
36. **O'Malley BP, Cook N, Richardson A, Barnett DB, Rosenthal FD.** Circulating catecholamine, thyrotrophin, thyroid hormone and prolactin responses of normal subjects to acute cold exposure. *Clin Endocrinol (Oxf)* 21:285-291, 1984.
37. **Papanek PE, Wood CE, Fregly MJ.** Role of the sympathetic nervous system in cold-induced hypertension in rats. *J Appl Physiol* 71: 300-306, 1991.
38. **Pillar TM, Seitz HJ.** Thyroid hormone and gene expression in the regulation of mitochondrial respiratory function. *Eur J Endocrinol* 136:231-239, 1997.
39. **Polikar R, Burger AG, Scherrer U, Nicod P.** The thyroid and the heart. *Circulation* 87:1435-1441, 1993.

40. **Portman MA.** Thyroid hormone regulation of heart metabolism. *Thyroid* 18:217-225, 2008.
41. **Reis M, Farage M, de Meis L.** Thermogenesis and energy expenditure: control of heat production by the Ca^{2+} -ATPase of fast and slow muscle. *Mol Membr Biol* 19:301-310, 2002.
42. **Rohrer D, Dillmann WH.** Thyroid hormone markedly increases the mRNA coding for sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in the rat heart. *J Biol Chem* 263:6941-6944, 1988.
43. **Sayen MR, Rohrer DK, Dillmann WH.** Thyroid hormone response of slow and fast sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase mRNA in striated muscle. *Mol Cell Endocrinol*; 87:87-93, 1992.
44. **Silva JE, Bianco SD.** Thyroid-adrenergic interactions: physiological and clinical implications. *Thyroid* 18:157-165, 2008.
45. **Simonides WS, van Hardeveld C.** The effect of hypothyroidism on sarcoplasmic reticulum in fast-twitch muscle of the rat. *Biochim Biophys Acta*; 844:129-141, 1985.
46. **Suko J.** Alterations of Ca^{2+} uptake and Ca^{2+} activated ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum in hyper- and hypothyroidism. *Biochim Biophys Acta* 252:324-327, 1971.
47. **Sun Z, Cade R, Zhang Z, Alouidor J, Van H.** Angiotensinogen gene knockout delays and attenuates cold-induced hypertension. *Hypertension* 41: 322–327, 2003.
48. **Taffet GE, Tate CA.** The MgATPase activity of rat cardiac sarcoplasmic reticulum is a function of the calcium ATPase protein. *Arch Biochem Biophys* 299:287-294, 1992.
49. **Wang X, Cade R, Sun Z.** Human eNOS gene delivery attenuates cold-induced elevation of blood pressure in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H1161–H1168, 2005.
50. **Waugh D** Effects of continuous exposure to cold on organ weights, blood and urine chemistry of rabbits. *Am J Physiol* 168:698-703, 1952.

Legends of the figures:

Figure 1 - SERCA2 (A, B), phospholamban (C, D) and phospho(Ser¹⁶)-phospholamban (E, F) expressions in cardiac muscle. Immunodetection was obtained with SERCA2, PLB and phospho(Ser¹⁶)-PLB specific monoclonal antibodies. The approximate molecular mass of the proteins (in kDa) is indicated. The amount of protein used was 10 μg of SRV in SERCA2 and PLB, and 5 μg of homogenate in phospho(Ser¹⁶)-PLB. (A, C and E) Proteins obtained from euthyroid, hypothyroid and hyperthyroid animals in room temperature (25°C). (B, D and F) Proteins obtained from euthyroid rabbits exposed to 25°C and acclimated at 4°C for 72 hours or 240 hours. The densitometric values represent arbitrary units (AU) and mean \pm SE of 5 to 8 experiments * $p < 0.05$ (vs control and hypert); ** $p < 0.05$ (vs control, 240 h at 4°C); # $p < 0.001$ (vs control, hypot and 240 h at 4°C).

Figure 2 – Total (●), magnesium (○) and calcium (X) dependent ATPases activities by vesicles derived from cardiac muscle in presence of 1 mM ATP (A) or 50 μM ATP, 2 mM phosphoenolpyruvate and 10 U/ml pyruvate kinase (B). The assay medium was 50 mM Mops/Tris buffer (pH 7.0), 4 mM MgCl_2 , 0.05 mM CaCl_2 , 0.05 mM EGTA, 5 mM oxalate, 100 mM KCl, and 5 mM NaN_3 . The Mg^{2+} -dependent activity was measured in the presence of 10 mM EGTA to remove contaminant Ca^{2+} from the medium. The Ca^{2+} -dependent ATPase activity was determined by subtracting the Mg^{2+} -dependent activity from the activity measured in the presence of both Mg^{2+} and Ca^{2+} . The reaction was performed at 35°C and was started by the addition of vesicles (50 μg protein/ml). The figure represents mean \pm SE of 8 to 12 experiments.

Figure 3 – Calcium uptake by vesicles derived from cardiac muscle The assay medium was 50 mM Mops/Tris buffer (pH 7.0), 4 mM MgCl_2 , 0.05 mM CaCl_2 , 0.05 mM EGTA, 5 mM oxalate, 100 mM KCl, and 5 mM NaN_3 . The reaction was performed at 35°C and was started by the addition of vesicles (50 μg protein/ml). The calculated free Ca^{2+} concentration in the medium was 2 μM . In A, euthyroid (●), hyperthyroid (▲) and hypothyroid (▼) rabbits exposed to room temperature (25°C). In

B, control rabbits exposed to 25°C (●), or acclimated at 4°C for 72 hours (X) or 240 hours (Δ). The figure represents mean ± SE of 10 to 16 experiments. # p < 0.05; * p < 0.02; & p < 0.001 (vs control).

Figure 4 – Ca²⁺-ATPase activity by vesicles derived from cardiac muscle. The assay medium was 50 mM Mops/Tris buffer (pH 7.0), 4 mM MgCl₂, 0.05 mM CaCl₂, 0.05 mM EGTA, 5 mM oxalate, 100 mM KCl, and 5 mM NaN₃. The reaction was performed at 35°C and was started by the addition of vesicles (50 μg protein/ml). The calculated free Ca²⁺ concentration in the medium was 2 μM. In A, euthyroid (●), hyperthyroid (▲) and hypothyroid (▼) rabbits exposed to room temperature (25°C). In B, control rabbits exposed to 25°C (●), or acclimated at 4°C for 72 hours (X) or 240 hours (Δ). The figure represents mean ± SE of 6 to 12 experiments. * p < 0.05; ** p < 0.001 (vs control).

Figure 5 - Heat released by vesicles derived from cardiac muscle. The assay medium was 50 mM Mops/Tris buffer (pH 7.0), 4 mM MgCl₂, 0.05 mM CaCl₂, 0.05 mM EGTA, 5 mM oxalate, 100 mM KCl, and 5 mM NaN₃. The reaction was performed at 35°C and was started by the addition of vesicles (50 μg protein/ml). The calculated free Ca²⁺ concentration in the medium was 2 μM. In A, euthyroid (●), hyperthyroid (▲) and hypothyroid (▼) rabbits exposed to 25°C. In B, euthyroid rabbits exposed to 25°C (●), or acclimated at 4°C for 72 hours (X) or 240 hours (Δ). The figure represents mean ± SE of 6 to 12 experiments. * p < 0.02 (vs control).

Figure 6 - Effect of thyroid hormone and cold exposure on oxidative metabolism in cardiac muscles. (A and B) O₂ flux in permeabilized cardiac muscle fiber derived from rabbit left ventricular. The muscle was permeabilized with saponin (5 μg/ml) and the oxygen consumption was measured in a high resolution oxygraph (Oxygraph-2k; Oroboros). The reaction medium was composed of sucrose (110 mM), K-MES (60 mM), EGTA (05 mM) MgCl₂ (3 mM), taurine (20 mM), KH₂PO₄ (10 mM), HEPES (20 mM) and bovine serum albumin (2 mg/ml). The respiration was measured in the presence of succinate (10 mM), malate + piruvate (5 mM) and ADP (2 mM) at pH 7.1, a 25°C. (C and D) Citrate synthase activity was measured in total homogenates from rabbit left ventricular. In A and C, the cardiac muscle was derived from normal, hypothyroid (hypot) or hyperthyroid (hypert) rabbits kept to room temperature (25°C). In B and D, the cardiac muscle was derived from euthyroid rabbits exposed to room temperature (25°C) and acclimated at 4°C for 72 hours or 240 hours. Data are means ± SEM of 4 to 6 experiments. * p < 0.05 (vs control), ** p < 0.001 (vs control).

TABLE 1

Heart weight to body weight ratio, serum total T3 and T4 in normal (control), hypothyroid (hypot) or hyperthyroid (hypert) rabbits kept to room temperature, and normal rabbits acclimated at 4°C for 72 hours or 240 hours.

Rabbits	Heart weight (g)/ body weight (kg)	T3 levels (ng/dl)	T4 levels (µg/dl)
Euthyroid at 25 °C	2.08 ± 0.11 (15)	218.0 ± 1.7 (4)	3.34 ± 0.17 (4)
Hypothyroid at 25 °C	1.72 ± 0.01 (4)*	< 10 (3)	< 0.3 (3)
Hyperthyroid at 25°C	3.27 ± 0.22 (5)**	804.3 ± 13.6 (3)**	21.30 ± 1.55 (3)**
Euthyroid at 4 °C for 72 h	1.84 ± 0.06 (5)	265.7 ± 1.9 (3)**	4.31 ± 0.53 (3)
Euthyroid at 4 °C for 240 h	2.23 ± 0.12 (5)	210.7 ± 42.2 (3)	3.25 ± 0.37 (3)

Values are means ± S.E. from *n* animals, * *p* < 0.01 (vs control) and ** *p* < 0.001 (vs control)

TABLE 2

Ca²⁺ - uptake, ATPase activity, heat released and ΔH^{cal} from cardiac muscle.

	Euthyroid at 25°C	Hypothyroid at 25°C	Hyperthyroid at 25°C	Euthyroid at 4°C for 72 h	Euthyroid at 4°C for 240 h
Ca²⁺ uptake					
Initial velocity (nmol/ mg . min ⁻¹)	7.13 ± 0.55 (31)	5.28 ± 0.79 (14)*	12.48 ± 1.88 (16)*	11.15 ± 0.83 (14)**	6.62 ± 0.77 (10)
Steady state (nmol/ mg)	51.65 ± 2.47 (31)	31.75 ± 3.85 (14)**	79.26 ± 7.91 (16)**	100.39 ± 7.89 (14)**	57.74 ± 6.82 (10)
Ca²⁺ - ATPase (μmol Pi/ mg . min⁻¹)	0.08 ± 0.01 (37)	0.05 ± 0.01 (12)*	0.11 ± 0.01 (14)*	0.12 ± 0.01 (11)*	0.11 ± 0.01 (9)*
Heat released (mcal/ mg . min⁻¹)	0.42 ± 0.06 (28)	0.21 ± 0.05 (6)*	0.57 ± 0.09 (6)	0.53 ± 0.04 (8)	0.55 ± 0.04 (5)
ΔH^{cal} (mcal/mol ATP)	-5.26 ± 0.50 (28)	-4.23 ± 0.41 (6)	-5.04 ± 0.32 (6)	-5.22 ± 0.47 (8)	-5.48 ± 0.68 (5)

Assay medium and experimental conditions were as described in Fig. 3. Values are mean ± SE. The numbers of experiments are in parenthesis. (*) p < 0.05 (vs control) and (**) p < 0.001 (vs control)

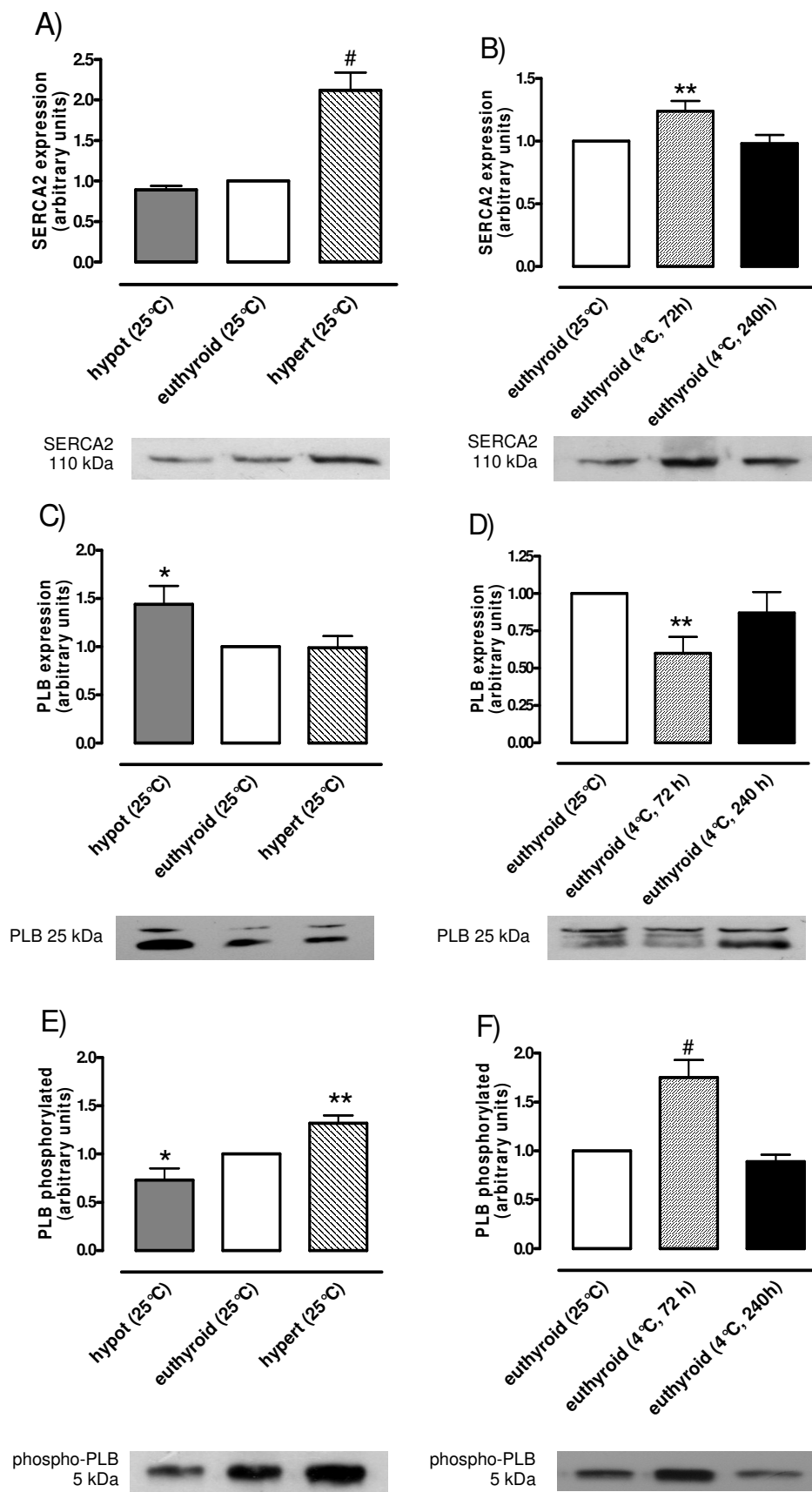


FIGURE 1

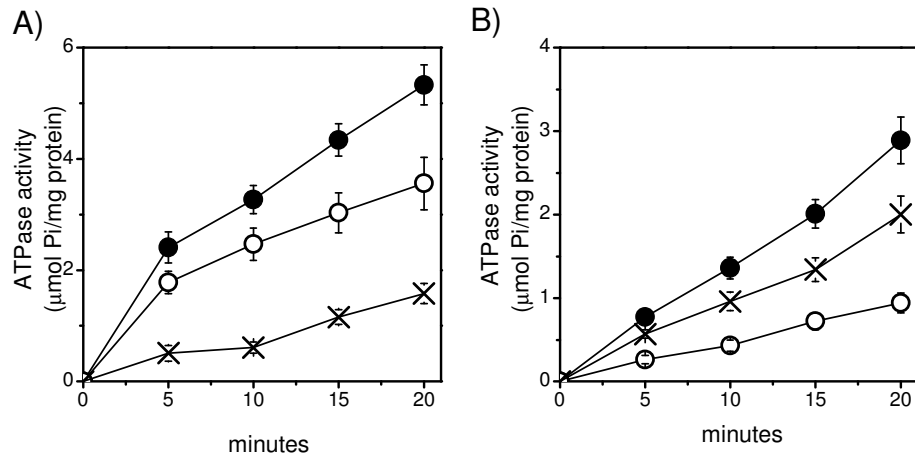


FIGURE 2

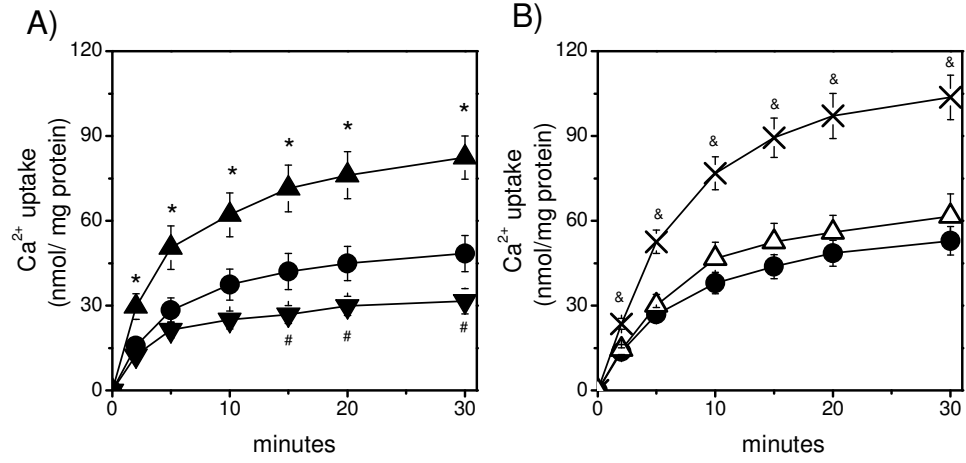


FIGURE 3

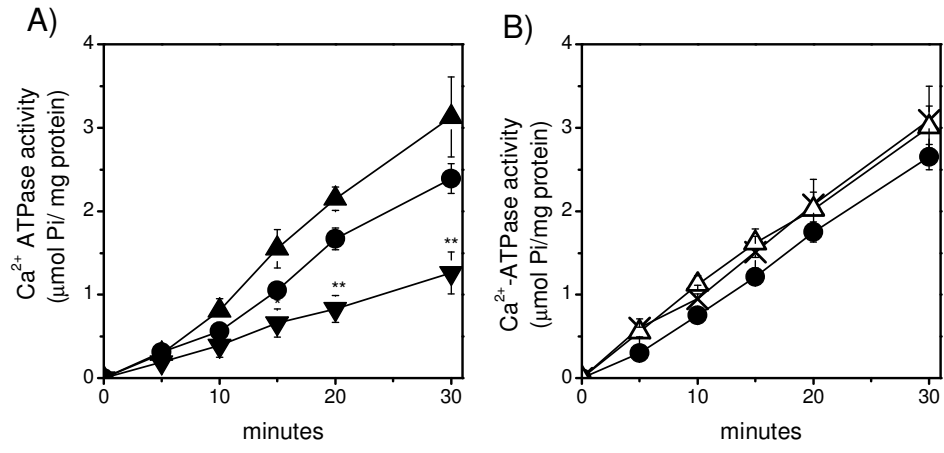


FIGURE 4

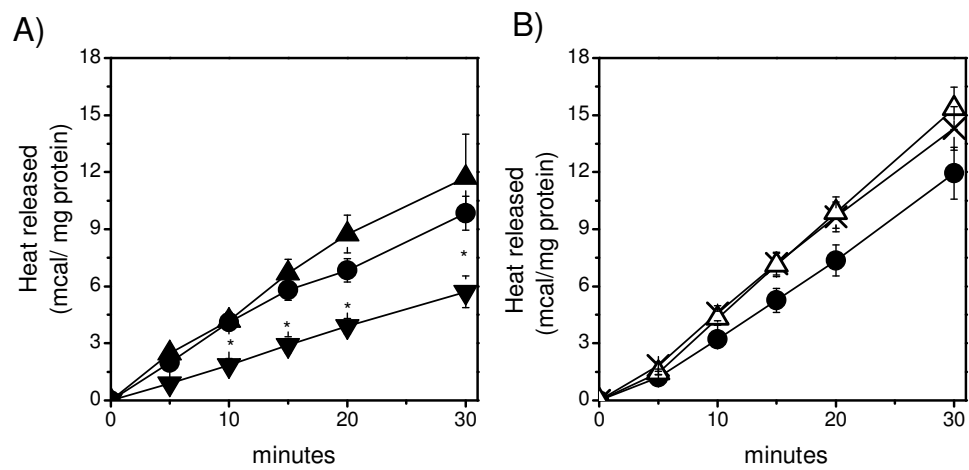


FIGURE 5

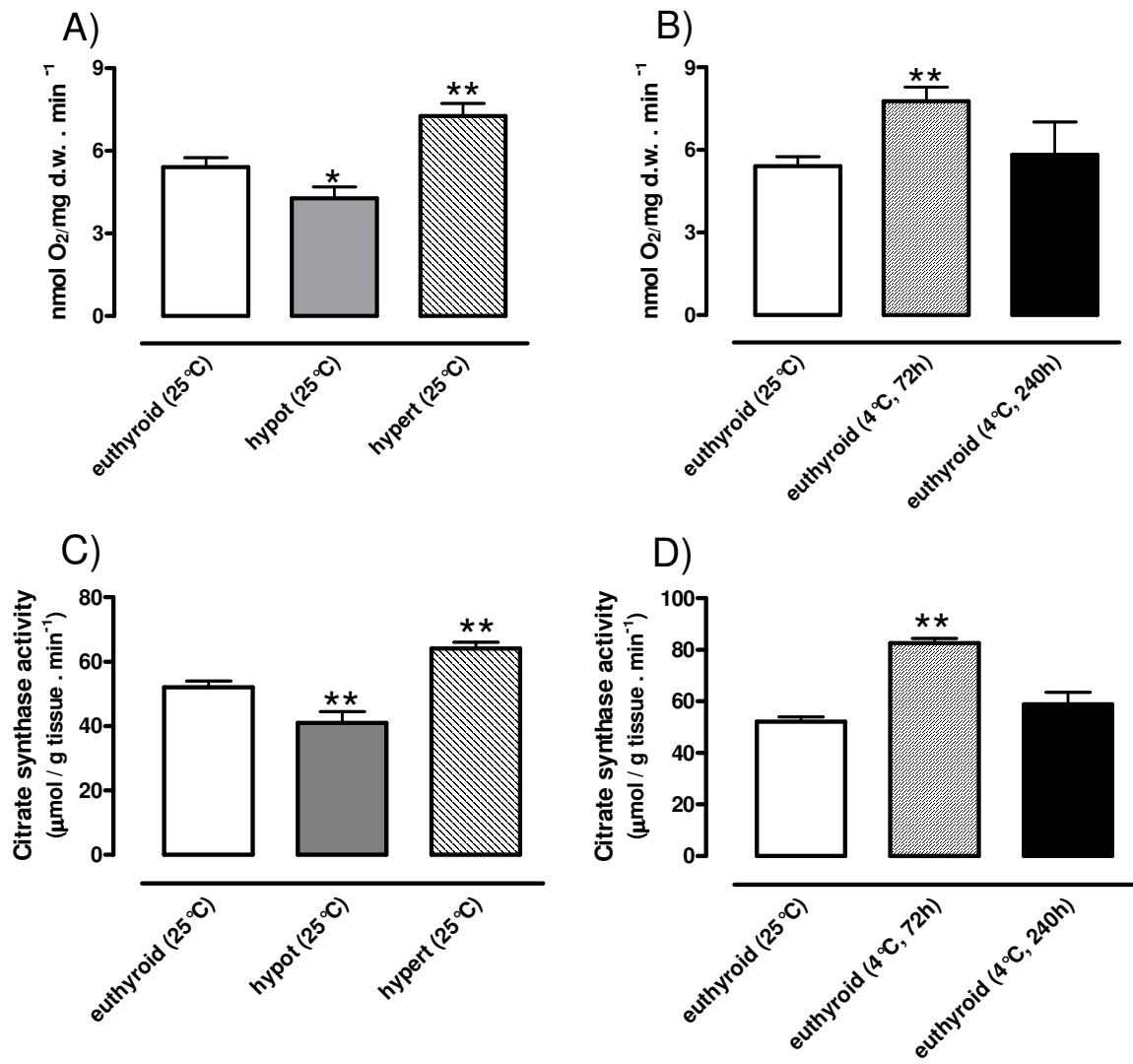


FIGURE 6

ARTIGO 2: Termogênese no músculo esquelético em coelhos normais e hipotireóideos expostos ao frio: papel da Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático.

Ana Paula Arruda, Luisa Andrea Ketzer, Mariana Nigro, Antonio Galina, Denise P Carvalho e Leopoldo de Meis.

Artigo aceito para publicação na revista *Endocrinology* (2008), com poucas revisões.

Os mecanismos de termogênese em pequenos roedores, como ratos e camundongos, são diferentes daqueles encontrados em animais de grande porte, como coelhos, aves e humanos adultos. O tecido adiposo marrom (BAT) é o principal sítio termogênico em ratos, animais hibernantes e neonatos. Entretanto, em mamíferos de grande porte o BAT é pouco desenvolvido, sendo o músculo esquelético considerado o principal contribuinte para a produção de calor nestes animais.

O papel dos hormônios tireoideanos na homeostase da temperatura corporal é bastante estudado em ratos e camundongos. Sabe-se que ratos hipotireóideos apresentam severa hipotermia quando expostos a baixa temperatura. Entretanto, existem poucos estudos sobre a termogênese de mamíferos de maior porte desprovidos de BAT, como o coelho. Neste artigo, os efeitos da exposição ao frio (4°C por 10 dias) sobre a termogênese do músculo esquelético de coelhos eutireóideos e hipotireóideos foram investigados.

Os principais resultados desse artigo foram:

- 1) A exposição de coelhos eutireóideos ao frio (4°C por 10 dias) promove um aumento da expressão de SERCA 1 no músculo vermelho e, conseqüentemente, um aumento significativo da captação de cálcio, atividade ATPásica e produção de calor pela SERCA. Observa-se um aumento da velocidade de consumo de oxigênio em músculo esquelético branco sem aumento do número de mitocôndrias nestes animais.
- 2) Em temperatura ambiente, coelhos hipotireóideos apresentam redução da expressão e atividade da SERCA 1 no músculo vermelho em comparação com coelhos eutireóideos. O consumo de oxigênio está significativamente reduzido nos músculos esqueléticos branco e vermelho de coelhos hipotireóideos.
- 3) Semelhante aos eutireóideos, os coelhos hipotireóideos mantêm a temperatura corporal constante durante o período de aclimação ao frio.
- 4) A exposição ao frio promove um aumento da velocidade de consumo de oxigênio de músculos esqueléticos branco e vermelho de coelhos hipotireóideos. Este aumento está associado ao aumento da atividade da citrato sintase. Além disso, observa-se um aumento da expressão e atividade da SERCA de músculo vermelho de coelhos hipotireóideos a 4°C.

View Final Author Letter

Close Window

MS Title:	Cold tolerance in hypothyroid rabbits: role of skeletal muscle mitochondria and Ca²⁺ ATPase (SERCA 1) heat production
MS Number:	EN-08-0564 Version 2
MS Type:	Original Article
Section:	Thyroid - TRH -TSH

Author Letter:

RE: Manuscript # EN-08-0564 Version 2, "Cold tolerance in hypothyroid rabbits: role of skeletal muscle mitochondria and Ca²⁺ ATPase (SERCA 1) heat production", Endocrinology

Dear Leopoldo:

The Editor and reviewers have completed examination of your above-cited revised manuscript. We are pleased to inform you that it is potentially acceptable for publication in Endocrinology, pending revisions. There are some criticisms which warrant your attention. In order to expedite the publication of your paper, we recommend that you return your revised manuscript within 15 days of the receipt of this letter. The critiques are enclosed to assist you in the preparation of a fully acceptable manuscript. Please include a cover letter with your revision which indicates point-by-point descriptions of how you addressed each criticism. Re-review can be facilitated by cutting-and-pasting each criticism, and below it indicating precisely where in the text modifications were made to address the criticism.

We look forward to the prompt return of your appropriately re-revised manuscript. Thank you for giving us the opportunity to review your work.

Sincerely,

Antonio C. Bianco, MD, PhD
Editor

Full title: Cold tolerance in hypothyroid rabbits: role of skeletal muscle mitochondria and Ca²⁺ ATPase (SERCA 1) heat production.

Abbreviated title: Skeletal Muscle Thermogenesis in Cold Exposure Acclimated Rabbits

Authors: Ana Paula Arruda*, Luisa A Ketzer*, Mariana Nigro, Antonio Galina, Denise P Carvalho# and Leopoldo de Meis

Affiliations: From the Instituto de Bioquímica Médica and #Instituto de Biofísica Carlos Chagas Fº, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, RJ, 21941-590, Brasil.

***APA and LAK contributed equally to this work.**

Corresponding author:

Correspondence to Leopoldo de Meis, Tel.: +55 21 2270 1635, fax +55 21 2270 8647, e-mail: demeis@bioqmed.ufrj.br

Key words: mitochondria, oxygen consumption, cold, Ca²⁺-ATPase, thermogenesis, thyroid hormone, rabbit

Grants: This work was supported by grants from PRONEX - Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). APA is recipient of fellowship from FAPERJ. LAK and MN are recipient of fellowship from CNPq.

The authors have nothing to disclose

Abstract

It is known that brown adipose tissue (BAT) is involved in rats and mice thermoregulation. Heat produced by BAT depends on the concerted action of thyroid hormones and catecholamine. Little is known about cold-induced thermogenesis in mammals that have little or no BAT, such as rabbits. In these animals thermogenesis occur primarily in skeletal muscle. In this work we studied the effects of cold acclimation (4°C for 10 days) in normal and hypothyroid rabbits. It is known that hypothyroid rats die after a few hours of cold exposure. We now show that different from rats, hypothyroid rabbits sustained their body temperature and survive after 10 days cold exposure. When compared to rabbits kept at room temperature, the muscles of cold exposed rabbits showed a dark red color characteristic of oxidative muscle fibers. According to this pattern, we observed that in both normal and hypothyroid rabbits, cold exposure promotes an increase in oxygen consumption by skeletal muscle mitochondria. Moreover, in red muscle, cold acclimation promotes an increase in the expression and activity of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase isoform 1 (SERCA 1) expression, one of the muscle enzymes involved in heat production. We conclude that rabbit's cold tolerance is probably related to an increase in both muscle oxidative metabolism and SERCA heat production and that these changes are not completely dependent of thyroid hormone.

Introduction

Homeothermic animals control their body temperature within a narrow range independently of the environment temperature. Shivering corresponds to an acute thermogenic response observed when animals are suddenly exposed to cold. Thereafter, in prolonged cold acclimation, shivering is progressively replaced by other mechanisms of heat production that are defined as non-shivering thermogenesis (1, 2). In mammals, thyroid hormones play a major role in the modulation of oxygen consumption and thermogenesis under basal conditions and during cold exposure (1, 3).

Brown adipose tissue (BAT) is an important site of non-shivering thermogenesis in small rodents and newborn humans (4, 5). Heat production in BAT is regulated by the uncoupling protein 1 (UCP1), a protein inserted in the mitochondria inner membrane. Enhancement of BAT heat production

is triggered by adrenergic stimulation of the brown adipocyte leading to: (a) activation of lipolysis and the release of fatty acids that increase UCP1 H^+ permeability and heat production; (b) increase in UCP1 and type 2 deiodinase (D2) expressions. D2 converts thyroid hormone T4 into T3 that, in turn, amplifies BAT responsiveness to catecholamines and the adrenergic effect on UCP1 expression (3-7). The role of T3 in the overall process of heat production was established by the finding that hypothyroid rats do not survive to cold exposure, which parallels impaired BAT recruitment and UCP1 activation (8-10).

Although being highly active in small mammals, BAT does not seem to be a major thermogenic organ in birds and adult larger mammals, including humans, ruminants and rabbits (11-15). In these animals, skeletal muscles are the major source of heat (15-21), although the molecular mechanisms underlying muscle thermogenesis are not well understood. Heat production by oxidative metabolism seems to be important, since chicken (18-19) and rats (22) exposed to cold present an increase in mitochondria biogenesis and a transition from glycolytic to oxidative muscle fiber. Another important mechanism seems to be related to reactions involving ATP turnover, such as the maintenance of Ca^{2+} gradient mediated by the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA).

SERCA is an enzyme able to pump Ca^{2+} from the cytosol into the sarcoplasmic reticulum lumen using the energy derived from ATP hydrolysis (23, 24). SERCA 1 isoform, which is mainly found in white skeletal muscle and BAT, is also able to hydrolyze ATP through two different catalytic routes: one coupled and the other uncoupled from Ca^{2+} transport (23, 25-27). Experimental data indicate that in the coupled reaction, part of the energy derived from ATP cleavage is used to pump Ca^{2+} and part is released as heat. On the other hand, all the energy derived from ATP hydrolysis is converted into heat in the uncoupled ATPase reaction. Thus, although the total amount of energy released during ATP hydrolysis is always the same, the amount of energy that is converted into heat or is used to transport calcium is modulated by SERCA 1. As a result, SERCA 1 corresponds to a possible thermogenic device in skeletal muscle and BAT (23, 25-27). The expression and thermogenic function of SERCA 1 are positively regulated by thyroid hormones (27-32). In red muscle, SERCA 1 expression is up-regulated in hyperthyroidism and it is down regulated in hypothyroidism (29-32),

leading to changes in red muscle thermogenesis accordingly (27, 31). Moreover, a 30–50% increase in SERCA1 expression was indeed found in cold-acclimated ducks (33).

In this work, we examined the effects of cold acclimation on skeletal muscles of adult normal and hypothyroid rabbits, a mammal that does not use BAT as the main source of heat production.

Material and methods

Cold acclimation and hypothyroidism: We have studied the effects of cold acclimation on normal and hypothyroid adult male New Zealand white rabbits divided into four groups: normal and hypothyroid animals kept at room temperature (25–28°C) or maintained at 4°C for 10 days. Hypothyroid state was induced by the administration of propylthiouracyl to adult rabbits (0.08% w/v) in drinking water for 21 days. Hypothyroidism was confirmed by measurements of serum T4 and T3. The rabbits had free access to water and food. The amount of food intake and body weight mass has been evaluated. Blood was obtained at the day of sacrifice by cardiac puncture and the serum T4 and T3 levels were determined by chemoluminescence immunoassay (Bayer ACS:180, CH-Zürich) (34). During all the experiments, the rabbits were treated in accordance with the published rules for animal laboratorial care and the protocol has been approved by the Institutional Committee for the Use of Animals for Research (CAUAP).

Oxygen consumption and citrate synthase activity. For oxygen consumption measurements, a small piece (1–2 mg) of red (soleus) or white (gastrocnemius) skeletal muscle was placed into a Petri dish on ice with 1 ml of relaxing solution containing Ca^{2+} /EGTA buffer (10 mM), free calcium (0.1 μM), imidazole (20 mM), K^+ 2-(4-morpholino) ethanesulfonic acid (MES; 50 mM), dithiothreitol (DTT; 0.5 mM), MgCl_2 (6.56 mM), ATP (5.77 mM), phosphocreatine (15 mM), pH 7.1, and individual fiber bundles were separated with a sharp forceps. The fiber bundles were permeabilized for 30 min in 3 ml of ice-cold relaxing solution containing saponin (50 $\mu\text{g/ml}$). The fibers were washed with a medium (MitoMed2; Oroboros, Innsbruck, Austria) containing: Na_2EDTA (0.5 mM), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (5 mM),

KH_2PO_4 (10 mM), Mannitol (110 mM), KCl (60 mM), Tris (60 mM) two times for 10 minutes. The muscle bundles were then immediately transferred into a respirometer (Oxygraph-2k; Oroboros) containing an air-saturated respiration medium at 25°C. We choose 25°C since in this temperature the amount of oxygen available in the assay medium is greater than at 37°C. The respiration medium (MiR05; Oroboros, Innsbruck, Austria) composition contained sucrose (110 mM), potassium lactobionate (60 mM), EGTA (0.5 mM), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3 mM), taurine (20 mM), KH_2PO_4 (10 mM), HEPES (20 mM), bovine serum albumin (2 mg/ml), pH 7.1. The maximal respiratory rate was measured in a mixture containing succinate (10 mM), pyruvate + malate (5 mM) and ADP (2 mM). The Oxygraph-2k is a two-chamber titration-injection respirometer with a limit of oxygen flux detection of $1 \text{ pmol s}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ (35). Citrate synthase activity was determined spectrophotometrically, as described previously (36).

Sarcoplasmic reticulum (SR) vesicles derived from rabbit muscle. White and red muscles were dissected from rabbit hind limb. Vesicles derived from the longitudinal sarcoplasmic reticulum (light fraction) of the two types of muscle were prepared as previously described (31, 37) and stored in liquid nitrogen. Prior to use, vesicles were diluted in a medium containing 50 mM MOPS/Tris buffer, 100 mM KCl, 10 mM P_i and 10 μM CaCl_2 .

Gel electrophoresis and Western blot. Protein samples were resolved on polyacrylamide gels: 7.5% for SERCA proteins, according to Laemmli (38). Electrotransfer of proteins from the gel to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes were performed for 20 min at 250 mA per gel in 25 mM Tris, 192 mM glycine and 10% methanol using a Mini Trans-Blot cell from Bio-Rad. Membranes were blocked with 3% non-fat dry milk in Tris-buffered saline with 0.1% Tween-20 for 1h at room temperature. Membranes were then washed and incubated for 1h with anti-SERCA 1 or anti SERCA-2 monoclonal antibodies at room temperature. The membranes were washed and incubated with anti-mouse secondary antibody. The immunoblots were revealed using an ECL detection kit from Amersham-Pharmacia Biotech, UK. Monoclonal antibodies for SERCA 1 (clone IIH11) and SERCA 2 (clone IID8) were obtained from Affinity Bioreagents Inc. (Brazil).

Ca²⁺ uptake. This parameter was measured by the filtration method (39). For ⁴⁵Ca uptake, trace amounts of ⁴⁵Ca were included in the assay medium. The reaction was arrested by filtering samples of the assay medium through Millipore filters. After filtration, the filters were washed five times with 5 ml of 3 mM La(NO₃)₃ and the radioactivity remaining on the filters was counted using a liquid scintillation counter.

ATPase activity. This was assayed by measuring the release of ³²P_i from [γ -³²P]ATP. The reaction was arrested with trichloroacetic acid (final concentration 5% w/v). The [γ -³²P] ATP not hydrolyzed during the reaction was extracted with activated charcoal as previously described (40). Two different ATPase activities can be distinguished in sarcoplasmic reticulum vesicles (41, 42). The Mg²⁺-dependent activity requires only Mg²⁺ for its activation and is measured in the presence of 2 mM EGTA to remove contaminant Ca²⁺ from the medium. The Ca²⁺-dependent ATPase activity, which is correlated with Ca²⁺ transport, is determined by subtracting the Mg²⁺-dependent activity from the activity measured in the presence of both Mg²⁺ and Ca²⁺. In the figures and tables the values of SERCA ATPase activity corresponds to the Ca²⁺-dependent ATPase activity.

Heat of reaction. This was measured using an OMEGA Isothermal Titration Calorimeter from Microcal, Inc. (Northampton, MA). The calorimeter sample cell (1.5 ml) was filled with reaction medium, and the reference cell was filled with Milli-Q water. After equilibration at 35° C, the reaction was started by injecting vesicles into the sample cell and heat change was recorded for 30 min. The volume of vesicle suspension injected into the reaction cell varied between 0.02 and 0.03 ml. Heat change measured during the initial 2 min after vesicle injection was discarded in order to avoid artifacts such as heat derived from the dilution of the vesicle suspension and binding of ions to the Ca²⁺-ATPase. The duration of these events is less than one minute. Calorimetric enthalpy (ΔH^{cal}) is calculated by dividing the amount of heat released by the amount of ATP hydrolyzed at the same time. The units used are mol for substrate hydrolyzed and kcal for heat released. Negative values indicate that the reaction is exothermic (26, 31). In a typical experiment the assay media was divided into three samples, which were used for the simultaneous measurement of Ca²⁺ uptake, ATP hydrolysis and heat

release. These different measurements were started simultaneously with vesicles to a final concentration varying between 5 and 10 μg protein/ml. NaN_3 (5 mM), an inhibitor of mitochondrial ATP synthase, was added to the assay medium in order to avoid interference from possible contamination of the sarcoplasmic reticulum vesicles with this enzyme.

Statistical Analyses. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman-Keuls multiple comparison test, except when the student t test was used, as stated in the legend.

Results

Survival of normal and hypothyroid rabbits during cold exposure. Normal rabbits were able to sustain their body temperature constant during 10 days of cold exposure (4°C) (Fig 1). It was previously shown that hypothyroid rats, whose main source of heat production is BAT, do not survive when suddenly exposed to a low temperature (4°C) (8). We now show that different from rats, hypothyroid rabbits are able to maintain their body temperature and to survive for a long period of time when suddenly exposed at 4°C (Fig 1). The same occurs at short-term cold exposure (24-72h).

Food intake and body weight in normal and hypothyroid rabbits exposed to cold. Cold-exposed normal rabbits had a slight increase of cumulative food consumption (Fig 2A, $p < 0.06$) and a significant decrease of body weight gain (Fig 2B). As a result, the ratio between body weight gain and food intake decreased significantly in cold exposed rabbits (Fig 2C). A similar profile was observed in hypothyroid rabbits (Figure 2C), but the major difference in this case is that hypothyroid rabbits exposed to cold eat significantly more food when compared to hypothyroid animals kept at room temperature (Fig 2A). Note that the values of both food intake and body weight gain were lower in hypothyroid than those of normal rabbits, but the ratio between body weight gain and food intake in hypothyroid rabbits was practically the same as that of normal rabbits. These data indicate that at 4°C

the fraction of the energy derived from food that was converted into heat increased at the expenses of body mass accumulation, in both normal and hypothyroid rabbits.

Serum T4 and T3 of normal and hypothyroid rabbits exposed to cold. In normal rabbits, cold exposure induced a significant decrease in serum T4 levels while T3 remained similar to the rabbits kept at room temperature (Table1). As a result, the T3/T4 ratio was increased during cold exposure. This result indicates that in cold exposed normal rabbits T4 is consumed to generate T3, suggesting an activation of deiodinases in rabbit tissues. As expected, in hypothyroid rabbits serum T4 and T3 were below the limit of detection and this profile did not change during cold exposure (Table 1).

Oxidative metabolism of normal and hypothyroid rabbits exposed to cold. A curious finding was that at 4°C, most of the rabbit muscles had a dark red color when compared with control animals. This was observed both in normal (Fig 3A) and hypothyroid rabbits (data not shown). A similar phenomenon was previously observed in chickens (18, 19). We therefore measured the oxygen consumption rate of permeabilized gastrocnemius (white) and soleus (red) muscles (Fig 3B and C). As expected, in all conditions tested, white muscle consumed less O₂ than red muscle (compare Fig 3B and C). In normal rabbits, cold acclimation promoted a significant increase (1.55 fold) of mitochondrial O₂ consumption in white muscle (Fig 3B). This was not observed in red fibers (Fig 3C). In previous report it was shown that in rats, hypothyroidism promotes a decrease of muscle mitochondrial respiration (43). We observed a similar decrease in hypothyroid rabbits both in white (37%) and red muscle (32%) (Fig 3B and C). We now show that hypothyroid rabbits exposed to cold presented a significant increase of mitochondrial respiration which was more pronounced in white (2.28 fold) than in red muscles (1.28 fold) (Fig 3B and C).

In order to verify whether the increased oxygen consumption described in Fig 4 was a consequence of an enhancement of mitochondria biogenesis, we measured citrate synthase activity, an enzyme of the Krebs cycle used as an indicator of mitochondria density (36). In normal rabbits, cold exposure for 10 days did not promote any change in citrate synthase activity in both white and red muscles (Fig 3D and E). This finding indicates that the enhancement of O₂ consumption in white

muscle from normal rabbits was due to an increase in the respiration rate and not to an increase of mitochondrial density. In hypothyroid rabbits at room temperature there was a decrease in citrate synthase activity in both white and red muscles, which was partially reverted when the hypothyroid animals were exposed to 4°C. Therefore, different from normal rabbits, cold exposure of hypothyroid rabbits seems to promote an increase of muscle mitochondria biogenesis (Fig 3D and E), which follows increased muscle oxygen consumption.

SERCA expression in normal and hypothyroid rabbits exposed to cold.

Heat released during ATP hydrolysis by SERCA plays an important role on muscle thermogenesis, as previously reported (23, 26, 27, 31). The amount of heat produced during ATP hydrolysis varies depending on the SERCA isoform available in the tissue (27, 31). The following experiments were addressed to determine if SERCA isoforms expression changes during cold acclimation in normal and hypothyroid rabbits. Red muscles express both SERCA 1 and SERCA 2 isoforms and cold exposure of normal rabbits promoted a significant increase in SERCA 1 expression (1.5 fold) while the SERCA 2 content remained unchanged (Fig 4A and B). As we have previously shown (31, 32), in red muscle of hypothyroid rabbits there was a significant decrease in SERCA 1 content ($p < 0.05$), without a significant change of the SERCA 2 level (Fig. 4A and B). The decrease in SERCA 1 expression observed in red muscle derived from hypothyroid rabbits was reverted during cold exposure and the difference between normal and hypothyroid rabbits was no longer statistically significant (Fig 4A and B). White muscles express only SERCA 1 and its level did not vary during cold adaptation of either normal or hypothyroid rabbits (Fig 5).

SERCA function in normal and hypothyroid rabbits exposed to cold. The ATPase activity and Ca^{2+} accumulation rate of SERCA 1 isoform is several times faster than that of the SERCA 2 isoform (44). In addition, part of the ATP hydrolyzed by the SERCA 1 isoform is not coupled to Ca^{2+} transport and as a result all the energy derived from ATP hydrolysis is converted into heat. The main finding leading to this conclusion is that the amount of heat released during the hydrolysis of each ATP molecule by SERCA 1 is higher (ΔH^{cal} -20 to -22 kcal / mol) than that released during ATP

cleavage by SERCA 2 (ΔH^{cal} -10 to -12 kcal / mol) (27, 31) an isoform that only hydrolyzes ATP coupled with Ca^{2+} transport. The ΔH^{cal} is determined dividing the rate of heat production by the rate of ATP hydrolysis and the negative value indicates that the reaction is exothermic (26,27,31). We verified here that red muscles of normal rabbits exposed to cold presented a 30% increase of both the amount of Ca^{2+} accumulated (Fig 6A) and the rate of Ca^{2+} -dependent ATPase activity (Fig 6B). Interestingly, cold acclimation promoted a two fold increase in the amount of heat released during ATP hydrolysis in red muscle (Fig 6C). Thus, the increment in heat production promoted by cold acclimation was higher than the increase in the rate of ATP hydrolysis in the same muscle. Consequently, in red muscles derived from animals exposed to cold the amount of heat released per mol of ATP cleaved rose from -13.20 ± 2.10 kcal/mol to -23.90 ± 2.17 kcal/mol (Table 2), possibly due to the enhancement of SERCA 1 expression.

In rabbits kept at room temperature, hypothyroidism promoted a simultaneous decrease of Ca^{2+} uptake, ATPase activity and the amount of heat release. These decreases are in tandem with the decrease of SERCA 1 expression detected in hypothyroid red muscles. The decrease in the SERCA activity noted in hypothyroidism was partially reverted when the rabbits were kept at 4°C (Table 2 and Fig 6). Note that although the levels of Ca^{2+} uptake, ATP hydrolysis and heat production of red muscles derived from hypothyroid animals exposed to cold increased compared to hypothyroid animals kept at room temperature, these values were similar to those found in control animals kept at the room temperature but not as high as the values detected in normal animals exposed to cold. Hypothyroidism does not impair the increase in Ca^{2+} uptake, ATP hydrolysis and heat production promoted by rabbit cold exposure, although at room temperature these parameters were significantly diminished.

In white muscle vesicles the Ca^{2+} uptake, ATPase activity and heat production did not vary significantly neither in hypothyroidism nor during cold adaptation (Table 3). It is in accordance with the Western blot analysis that shows unchanged SERCA 1 content in every condition tested.

Discussion

This study provides the following new findings: (i) different from rats, thyroid hormone is not essential for the survival of rabbits at 4°C for 10 days; (ii) cold tolerance noted in both normal and hypothyroid rabbits are related to increased muscle mitochondria oxygen consumption and to the enhancement of heat production by SERCA 1 in rabbits red muscles.

Thyroid hormones play a key role in thermogenesis under basal conditions, which is supported by evidences showing that hypothyroidism leads to about 50% decrease in basal metabolic rate and oxygen consumption in skeletal muscle fibers (3, 43). These findings were confirmed in this work. During cold exposure, thyroid hormone is also essential for maintenance of body temperature in rats and mice, since both hypothyroid (8) and thyroid hormone receptor knockout mice die when suddenly exposed to cold (45). An intriguing finding, however, is that hypothyroid rats can acquire cold tolerance if they are acclimated to cold before hypothyroidism is induced (46). One of the mechanisms responsible for rat adaptation and survival in a cold environment is the increase of oxygen consumption by muscle mitochondria (43). In this work, we observed that different from rats, hypothyroid rabbits survive during cold exposure, what is probably related to the increased muscle oxygen consumption and also to the changes in heat production by SERCA. It is noteworthy that hypothyroid rabbits do not need to be adapted for short periods at progressively lower temperatures before cold acclimation.

Increased muscle oxidative metabolism during acute and chronic cold exposure is a phenomenon already described in chicken skeletal muscle (18, 19). In these animals, the acquisition of cold tolerance is associated with morphological, histological and gene expression changes consistent with an increase in the slow-twitch oxidative muscle fibers abundance (18, 19). One key protein involved in this process is the PGC1 α , a cold-induced transcriptional co-activator that drives the transition from glycolytic to oxidative fibers and also induces mitochondria biogenesis (18, 19, 47). Here, we verified that cold exposure induces an enhancement in oxygen consumption in white muscle derived from cold exposed normal rabbits, which parallels the change in muscle appearance from white to red colored muscle. The increase in oxygen consumption was also detected in white and red muscles derived from hypothyroid animals. The increase in respiration promoted by cold in white muscle derived from normal animals was not related to an increase in mitochondria number but rather

to an increase of the respiration rate of the pre existent muscle mitochondria. On the other hand, the induction of mitochondria respiration observed in red and white skeletal muscle derived from hypothyroid rabbits seems to be related to an increase in mitochondria density, since the citrate synthase activity is significantly elevated. In fact, the induction of mitochondria oxygen consumption by cold exposure is higher in hypothyroidism than in normal conditions compared with their counterparts. The skeletal muscle uncoupling protein 3 (UCP3) might also be involved in the increased oxygen consumption observed since there are evidences that during cold exposure UCP3 expression increases in rat skeletal muscle (48). However, the role of UCP 3 on thermogenesis has not been clearly demonstrated. For example, UCP3 knockout mice did not show any thermogenic alteration (49). In addition, UCP3-deficient mice respond to T3 as well as wild type controls (50). Another mechanism that could contribute to increased muscle oxidative metabolism and heat production is the glycerol-3-phosphate shuttle (G3P), which is implicated in the transfer of reducing equivalents to mitochondria and rapid ATP generation. Evidence that this mechanism seems to be important for thermogenesis is that mice with targeted disruption of the mGPD gene have a mild reduction in energy turnover and become hypothermic when cold acclimated (51).

In addition to the effects on muscle oxidative metabolism, we observed that cold acclimation induces an increase in heat production by Ca^{2+} ATPase (SERCA) in red skeletal muscle of both normal and hypothyroid rabbits. SERCA 1, found predominantly in white muscle and BAT, is able to hydrolyze ATP through two different catalytic routes, one coupled and the other one uncoupled from Ca^{2+} transport. In the coupled reaction, part of the energy derived from ATP hydrolysis is used for the translocation of Ca^{2+} across the membrane and the other part is released as heat. In the uncoupled catalytic route, also known as slippage, there is no Ca^{2+} transport and all the energy derived from ATP hydrolysis is converted into heat, indicating that this enzyme might function as a thermogenic device (23, 26, 27, 31).

Recently, our group has shown that heat production by SERCA 1 is increased in red skeletal muscle from hyperthyroid rabbits (32). In addition, Dumonteil et al. (33) verified that this enzyme is over expressed in skeletal muscles derived from ducklings exposed to cold. Urupekc et al. (52)

demonstrated that the induction of SERCA expression could be one of the mechanisms by which ob/ob UCP 1 ^{-/-} mice treated with leptin survive in cold environments. Thus, the heat production by Ca²⁺-ATPase of skeletal muscle seems to be an important thermogenic mechanism involved in cold tolerance.

We have looked for BAT in these cold-exposed rabbits. These animals present white fat pads in the interscapular space, in the cervical area and in the perirenal region, which do not change during cold exposure and preserve the white adipose tissue aspect. So, as far as we are concerned, it seems that no BAT recruitment occurs in rabbits, as assessed macroscopically in these regions.

Taking into consideration that hypothyroid rabbits do survive to prolonged cold exposure, we can speculate that skeletal muscle changes that occur might not be completely dependent on thyroid status in rabbits. It is noteworthy that the increase in mitochondria oxygen consumption and SERCA heat production observed in hypothyroid animals exposed to cold reach the levels found in control animals kept at room temperature and do not achieve the same levels as in cold-exposed control animals. These findings indicate that: i) the extra-heat produced by skeletal muscle in control animals might not be fundamental for survival at 4°C; or ii) hypothyroid rabbits have a higher ability of activating other mechanisms apart from muscle thermogenesis to maintain body temperature, such as increased heat saving mechanisms like a increased peripheral vasoconstriction and piloerection. In fact, Zaninovich et al. (2003) have shown that hypothyroid rats adapted to cold are more sensitive to inhibitors of the α adrenergic system than normal rats when exposed to cold environment. Since vasoconstriction is mainly regulated by the α adrenergic system, these results indicate that cold-adapted rats have increased heat saving mechanisms, which might also occur in hypothyroid rabbits.

Altogether, these observations have revealed a role for skeletal muscle in the rabbit response to cold temperatures, which might depend upon the modulation of skeletal muscle SERCA 1 expression and muscle oxidative metabolism.

Acknowledgments

We are grateful to Valdecir A. Suzano and Antônio Carlos Miranda for technical assistance. This work was supported by grants from Programa de Nucleos de Excelencia (PRONEX),

Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

References

1. **Silva JE** 2006 Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol Rev* 86:435-464.
2. **Lowell BB, Spiegelman BM** 2000 Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 404:652-660.
3. **Bianco AC, Maia AL, da Silva WS, Christoffolete MA** 2005 Adaptive activation of thyroid hormone and energy expenditure. *Biosci Rep* 25:191-208.
4. **Nicholls DG, Locke RM** 1984 Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol.Rev* 64:1-64.
5. **Cannon B, Nedergaard J** 2004 Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84:277-359.
6. **Golozoubova V, Hohtola E, Matthias A, Jacobsson A, Cannon B, Nedergaard J** 2001 Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold. *FASEB J* 15:2048-2050.
7. **Bianco AC, Sheng XY, Silva JE** 1988 Triiodothyronine amplifies norepinephrine stimulation of uncoupling protein gene transcription by a mechanism not requiring protein synthesis. *J Biol Chem* 263:18168-18175.
8. **Bianco AC, Silva JE** 1987 Intracellular conversion of thyroxine to triiodothyronine is required for the optimal thermogenic function of brown adipose tissue. *J Clin Invest* 79:295-300.
9. **Carvalho SD, Kimura ET, Bianco AC, Silva JE** 1991 Central role of brown adipose tissue thyroxine 5'-deiodinase on thyroid hormone-dependent thermogenic response to cold. *Endocrinology* 128:2149-2158.
10. **Bianco AC, Silva JE** 1988 Cold exposure rapidly induces virtual saturation of brown adipose tissue nuclear T3 receptors. *Am J Physiol* 255:E496-E503.
11. **Cambon B, Reyne Y, Nougues J** 1998 In vitro induction of UCP1 mRNA in preadipocytes from rabbit considered as a model of large mammals brown adipose tissue development: importance of PPARgamma agonists for cells isolated in the postnatal period. *Mol Cell Endocrinol.* 146:49-58.
12. **Reyne Y, Nougues J, Cambon B, Viguerie-Bascands N, Casteilla L** 1996 Expression of c-erbA alpha, c-erbA beta and Rev-erbA alpha mRNA during the conversion of brown adipose tissue into white adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 116:59-65
13. **Trayhurn P, Thomas ME, Keith, JS** 1993 Postnatal development of uncoupling protein, uncoupling protein mRNA, and GLUT4 in adipose tissues of goats. *Am J Physiol* 265:R676-R682.
14. **Houstek J, Vizek K, Pavelka S, Kopecký J, Krejcová E, Hermanská J, Cermáková M** 1993 Type II iodothyronine 5'-deiodinase and uncoupling protein in brown adipose tissue of human newborns. *J Clin Endocrinol Metab* 77:382-387.
15. **Block BA** 1994 Thermogenesis in muscle. *Annu Rev Physiol* 56:535-577.
16. **Van Marken Lichtenbelt WD, Daanen HA** 2003 Cold-induced metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 6:469-475.
17. **Zurlo F, Larson K, Bogardus C, Ravussin E** 1990 Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure. *J Clin Invest* 86:1423-1427.

18. **Hirabayashi M, Ijiri D, Kamei Y, Tajima A, Kanai Y** 2005 Transformation of skeletal muscle from fast- to slow-twitch during acquisition of cold tolerance in the chick. *Endocrinology* 146:399-405.
19. **Ueda M, Watanabe K, Sato K, Akiba Y, Toyomizu M** 2005 Possible role for avPGC-1alpha in the control of expression of fiber type, along with avUCP and avANT mRNAs in the skeletal muscles of cold-exposed chickens. *FEBS Lett.* 579:11-17.
20. **Janský L** 1995 Humoral thermogenesis and its role in maintaining energy balance. *Physiol Rev* 75:237-259.
21. **Clausen T, Van Hardeveld C, Everts ME** 1991 Significance of cation transport in control of energy metabolism and thermogenesis. *Physiol Rev* 71:733-774.
22. **Oliveira RL, Ueno M, de Souza CT, Pereira-da-Silva M, Gasparetti AL, Bezzera RM, Alberici LC, Vercesi AE, Saad MJ, Velloso LA** 2004 Cold-induced PGC-1alpha expression modulates muscle glucose uptake through an insulin receptor/Akt-independent, AMPK-dependent pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 287:E686-E695.
23. **de Meis L, Arruda AP, Carvalho DP** 2005 Role of sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in thermogenesis. *Biosci Rep.* 25:181-90.
24. **de Meis L** 1981 *The Sarcoplasmic Reticulum: Transport and Energy Transduction*, John Wiley & Sons, Inc., New York. Vol.2, pp 1-163.
25. **Yu X, Inesi G** 1995 Variable stoichiometric efficiency of Ca²⁺ and Sr²⁺ transport by the sarcoplasmic reticulum ATPase. *J Biol Chem* 270:4361-4367.
26. **de Meis L** 2001 Uncoupled ATPase activity and heat production by the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase *J Biol Chem* 276: 25078-25087.
27. **de Meis L, Arruda AP, da-Silva WS, Reis M, Carvalho DP** 2003 The thermogenic function of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase of normal and hyperthyroid rabbit. *Ann N Y Acad Sci.* 986:481-488.
28. **Nunes MT, Bianco AC, Migala A, Agostini B, Hasselbach W** 1985 Tyroxine induced transformation in sarcoplasmic reticulum of rabbit soleus and psoas muscles. *Z Naturforsch* 40: 726-734.
29. **Muller A, van der Linden GC, Zuidwijk MJ, Simonides WS, van der Laarse WJ, van Hardeveld C.** 1994 Differential effects of thyroid hormone on the expression of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoforms in rat skeletal muscle fibers. *Biochem Biophys Res Commun* 203:1035-1042.
30. **Simonides WS, Thelen MHM, van der Linden CG, Muller A, Van Hardeveld C** 2001 Mechanism of thyroid-hormone regulated expression of SERCA genes in skeletal muscle: implications for thermogenesis. *Biosci Rep* 21:139-154.
31. **Arruda AP, da-Silva WS, Carvalho DP, de Meis L** 2003 Hyperthyroidism increases the uncoupled ATPase activity and heat production by the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ -ATPase. *Biochem J* 375:753-760.
32. **Arruda AP, Oliveira GM, Carvalho DP, de Meis L** 2005 Thyroid hormones differentially regulate the distribution of rabbit skeletal muscle Ca(2+)-ATPase (SERCA) isoforms in light and heavy sarcoplasmic reticulum. *Mol Membr Biol.* 22:529-537.
33. **Dumonteil E, Barre H, Meissner G.** 1993 Sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase and ryanodine receptor in cold-acclimated ducklings and thermogenesis. *Am J Physiol.* 265:507-13.
34. **Als C, Haldimann M, Minder C, Gerber H** 2004 Pilot study of urinary iodine concentration and of biochemical thyroid parameters before and after cautious public health intervention on salt iodide content: the Swiss longitudinal 1996-2000 iodine study. *Eur J Clin Nutr* 58:1201-1210.
35. **Boushel R, Gnaiger E, Schjerling P, Skovbro M, Kraunsøe R, Dela F** 2007 Patients with type 2 diabetes have normal mitochondrial function in skeletal muscle. *Diabetologia* 50:790-796.
36. **Hutter E, Renner K, Pfister G, Stöckl P, Jansen-Dürr P, Gnaiger E** 2004 Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts. *Biochem J.* 380:919-928.

37. **Eletr S, Inesi G** 1972 Phase changes in the lipid moieties of sarcoplasmic reticulum membranes induced by temperature and protein conformational changes. *Biochim Biophys Acta* 282:174-179.
38. **Laemmli UK** 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227:680-685.
39. **Chiesi M, Inesi G** 1979 The use of quench reagents for resolution of single transport cycles in sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 254:370-377.
40. **Grubmeyer C, Penefsky HS** 1981 The presence of two hydrolytic sites on beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 256:3718-3727.
41. **Hasselbach W, Makinose M** 1963 On the mechanism of calcium transport across the membrane of the sarcoplasmic reticulum. *Biochem Z* 339:94-111.
42. **Inesi G** 1985 Mechanism of calcium transport. *Annu Rev Physiol* 47: 573-601.
43. **Zaninovich AA, Rebagliati I, Raices M, Ricci C, Haggmuller K** 2003 Mitochondrial respiration in muscle and liver from cold-acclimated hypothyroid rats. *J Appl Physiol*. 95:1584-90.
44. **Sumbilla C, Cavagna M, Zhong L, Ma H, Lewis D, Farrance I, Inesi G** 1999 Comparison of SERCA1 and SERCA2a expressed in COS-1 cells and cardiac myocytes. *Am J Physiol*. 277:H2381-H2391.
45. **Golozoubova V, Gullberg H, Matthias A, Cannon B, Vennström B, Nedergaard J** 2004 Depressed thermogenesis but competent brown adipose tissue recruitment in mice devoid of all hormone-binding thyroid hormone receptors. *Mol Endocrinol*. 18:384-401.
46. **Zaninovich AA, Raices M, Rebagliati I, Ricci C, Haggmüller K** 2002 Brown fat thermogenesis in cold-acclimated rats is not abolished by the suppression of thyroid function. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 283:496-502.
47. **Puigserver P, Spiegelman BM** 2003 Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* 24:78-90.
48. **Simonyan RA, Jimenez M, Ceddia RB, Giacobino JP, Muzzin P, Skulachev VP** 2001 Cold-induced changes in the energy coupling and the UCP3 level in rodent skeletal muscles. *Biochim Biophys Acta*. 1505:271-9
49. **Gong DW, Monemdjou S, Gavrilova O, Leon LR, Marcus-Samuels B, Chou CJ, Everett C, Kozak LP, Li C, Deng C, Harper ME, Reitman ML** 2000 Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3. *J Biol Chem* 275:16251-16257.
50. **Roussel S, Alves-Guerra MC, Mozo J, Miroux B, Cassard-Doulier AM, Bouillaud F, Ricquier D** 2004 The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes* 53 Suppl 1:S130-135.
51. **DosSantos RA, Alfadda A, Eto K, Kadowaki T, Silva JE** 2003 Evidence for a compensated thermogenic defect in transgenic mice lacking the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene. *Endocrinology* 144:5469-5479.
52. **Ukropec J, Anunciado RV, Ravussin Y, Kozak LP** 2006 Leptin is required for uncoupling protein-1-independent thermogenesis during cold stress. *Endocrinology*. 147:2468-2480.

Legends of the figures

Fig. 1- Body temperature of normal and hypothyroid rabbits. Rectal temperature of control (●) and hypothyroid (○) rabbits.

Fig. 2 - Effect of cold exposure in food intake and body weight gain- Normal (control) and hypothyroid (HypoT) rabbits kept at room temperature or exposed to cold (Cold or HypoT +Cold). Food Intake (A) - the food consumption was measured during 10 days of cold exposure, *** p < 0.001 (vs control) # p < 0.05 (vs HypoT) . Body Weight (B) - body weight was measured before and after 10 days of cold exposure. The values represent the delta body weight gain, * p < 0.05 (vs control), ** p <

0.01 (*vs* control). Food efficiency (C) This rate corresponds to body weigh gain divided by cumulative food consumption, * $p < 0.05$ (*vs* control) or [#] $p < 0.05$ (*vs* HypoT).

Fig. 3- Effect of cold exposure on oxidative metabolism in red and white skeletal muscles. (A) **Gross anatomical appearance of the gastrocnemius and soleus muscles derived from control and cold exposed rabbits.** (B) **O₂ flux in permeabilized gastrocnemius (white) and (C) soleus (red) skeletal muscle fibers .** (D) **Citrate synthase activity of total homogenates from white and (D) red muscles.** (B, C) The fibers derived from normal (control) and hypothyroid (HypoT) rabbits kept at room temperature or exposed to cold (Cold or HypoT +Cold) were permeabilized with saponin (50 µg/ml) and the oxygen consumption was measured in a high resolution oxygraph (Oxygraph-2k; Oroboros). The reaction medium was composed of sucrose (110mM), K-MES (60mM), EGTA (0.5 mM) MgCl₂ (3 mM) , taurine (20 mM), KH₂PO₄ (10 mM), HEPES (20 mM) and bovine serum albumin (2 mg/ml). The respiration was measured in the presence of succinate (10mM), malate + piruvate (5 mM) and ADP (2 mM) at pH 7.1, a 25°C. * $p < 0.05$ (*vs* control), *** $p < 0.001$ (*vs* control); ; [#] $p < 0.05$ (*vs* HypoT) ; (D, E) Citrate synthase activity was measured in total homogenates, ** $p < 0.01$ (*vs* control) [#] $p < 0.05$ (*vs* HypoT). Data are means ± SEM of 4 to 7 experiments. Data were analyzed by statistic t test.

Fig.4 - Ca²⁺ ATPase isoform expression in red skeletal muscle. (A) 3-5 µg of sarcoplasmic reticulum vesicles derived from normal (control) and hypothyroid (HypoT) rabbits kept at room temperature or exposed to cold (Cold or HypoT +Cold) were used to load the gel. The immunodetection was obtained with SERCA 1 and SERCA 2 specific monoclonal antibodies. Densitometric analysis represents arbitrary units (A.U.) relative to control. The figure shows the average ± SE of 3 to 7 different experiments (B) Densitometric analysis represents arbitrary units (A.U.) relative to control. The figure shows the average ± SE of 3 different experiments. * $p < 0.05$ (*vs* control); ** $p < 0.01$ (*vs* control).

Fig. 5 - Ca²⁺ ATPase isoform expression in white skeletal muscle. 0.5-1 µg of sarcoplasmic reticulum vesicles derived from normal (control) and hypothyroid (HypoT) rabbits kept at room temperature or exposed to cold (Cold or HypoT +Cold) were used to load the gel. The immunodetection was obtained with SERCA 1 specific monoclonal antibody. Densitometric analysis represent arbitrary units (A.U.) relative to control. The figure shows the average ± SE of 3 to 7 different experiments.

Fig.6- Ca²⁺ Uptake (A), Ca²⁺ dependent ATPase activity (B) and heat production (C) in red skeletal muscle. Normal (control) and hypothyroid (HypoT) rabbits kept at room temperature or exposed to cold (Cold or HypoT +Cold). Left panel: (A) amount of Ca²⁺ accumulated inside the vesicles at steady state level. (B and C) rates of ATPase activity and Heat released respectively. Right panel: Control (○), Cold exposed (●), Hypothyroid (Δ) and Hypothyroid exposed to cold (▲) rabbits. This figure shows a typical experiment. The assay medium composition was 50 mM Mops/Tris buffer (pH 7.0), 1 mM ATP, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM CaCl₂, 0.2 mM EGTA, 10 mM Pi, 100 mM KCl, 5 mM NaN₃ and trace amounts of ³²ATP. The reaction was performed at 35°C and was started by the addition of vesicles (5 µg protein/ml). The calculated free Ca²⁺ concentration in the medium was 5 µM. The figure represents medium ± SE of 5 to 12 experiments, * $p < 0.05$ (*vs* control), ** $p < 0.01$ (*vs* control).

TABLE 1

Serum total T4 and T3 in cold acclimated control and hypothyroid rabbits.

Groups	T4 ($\mu\text{g} / \text{dL}$)	T3 (ng/dL)	T3/T4
Control	1.50 ± 0.07 (6)	128.17 ± 12.11 (6)	0.09 ± 0.01 (6)
Cold	1.08 ± 0.20 (6)*	148.83 ± 16.78 (6)	0.16 ± 0.03 (6)**
HypoT	< 0.3 (3)	< 10 (3)	-----
HypoT + Cold	<0.3 (3)	< 10 (3)	-----

Hypothyroidism was obtained by propylthiouracil (0.08%) administration in drinking water for 21 days. Normal and Hypothyroid animals were maintained at 4 °C for 10 days. Values are mean \pm SE. The numbers of experiments are in parenthesis. (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$ vs controls.

TABLE 2

Ca²⁺ - Uptake, ATPase activity, heat released and ΔH^{cal} from red skeletal muscle.

Groups	Ca²⁺ - Uptake ($\mu\text{mol Ca}^{2+}/\text{mg}$)	ATP Hydrolysis ($\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}$)	Heat Released ($\text{mcal}/\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}$)	ΔH^{cal} (kcal/mol)
Control	0.38 \pm 0.025 (12)	0.40 \pm 0.03 (8)	5.10 \pm 0.74 (5)	13.20 \pm 2.10 (5)
Cold	0.49 \pm 0.04 (12)*	0.52 \pm 0.05 (7)*	12.21 \pm 0.86 (3)**	23.90 \pm 2.17 (3)*
HypoT	0.22 \pm 0.04 (12)**	0.25 \pm 0.02 (10) **	3.31 \pm 0.77 (5)	11.06 \pm 1.77 (5)
HypoT + Cold	0.31 \pm 0.009 (8)	0.36 \pm 0.04 (5)	5.00 \pm 0.82 (5)	14.13 \pm 3.78 (5)

Assay medium and experimental conditions were as described in Fig 7. Values are mean \pm SE. The numbers of experiments are in parenthesis. (*) p < 0.05; (**) p < 0.01 vs controls.

TABLE 3

Ca²⁺ - Uptake, ATP ase activity, heat Released and ΔH^{cal} from white skeletal muscle

Groups	Ca²⁺ - Uptake ($\mu\text{mol Ca}^{2+}/\text{mg}$)	ATP Hydrolysis ($\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}$)	Heat Released ($\text{mcal}/\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}$)	ΔH^{cal} (kcal/mol)
Control	2.10 \pm 0.14 (31)	2.42 \pm 0.19 (13)	34.61 \pm 3.08 (8)	18.01 \pm 2.12 (8)
Cold 10 Days	2.39 \pm 0.22 (14)	2.50 \pm 0.16 (13)	42.52 \pm 4.08 (8)	18.53 \pm 2.31 (8)
HypoT	2.04 \pm 0.19 (5)	2.16 \pm 0.26 (5)	33.33 \pm 3.94 (4)	20.26 \pm 2.98 (4)
HypoT + Cold	2.01 \pm 0.03 (5)	2.18 \pm 0.20 (5)	37.63 \pm 7.03 (4)	20.10 \pm 2.15 (4)

Assay medium and experimental conditions were as described in Fig 7. Values are mean \pm SE. The numbers of experiments are in parenthesis.

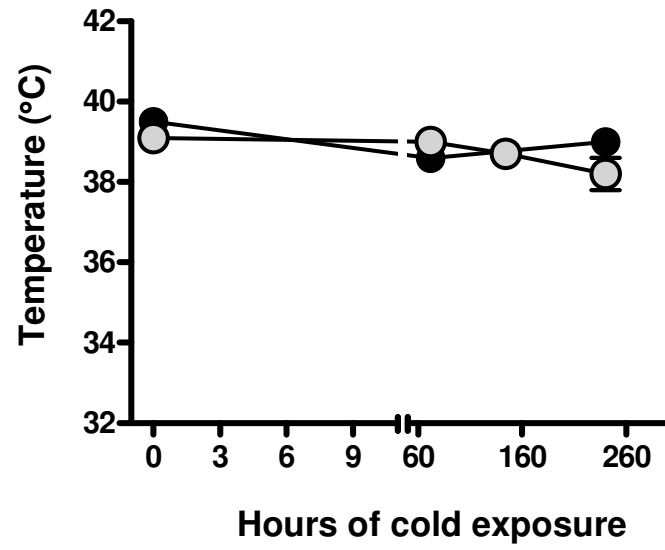


FIGURE 1

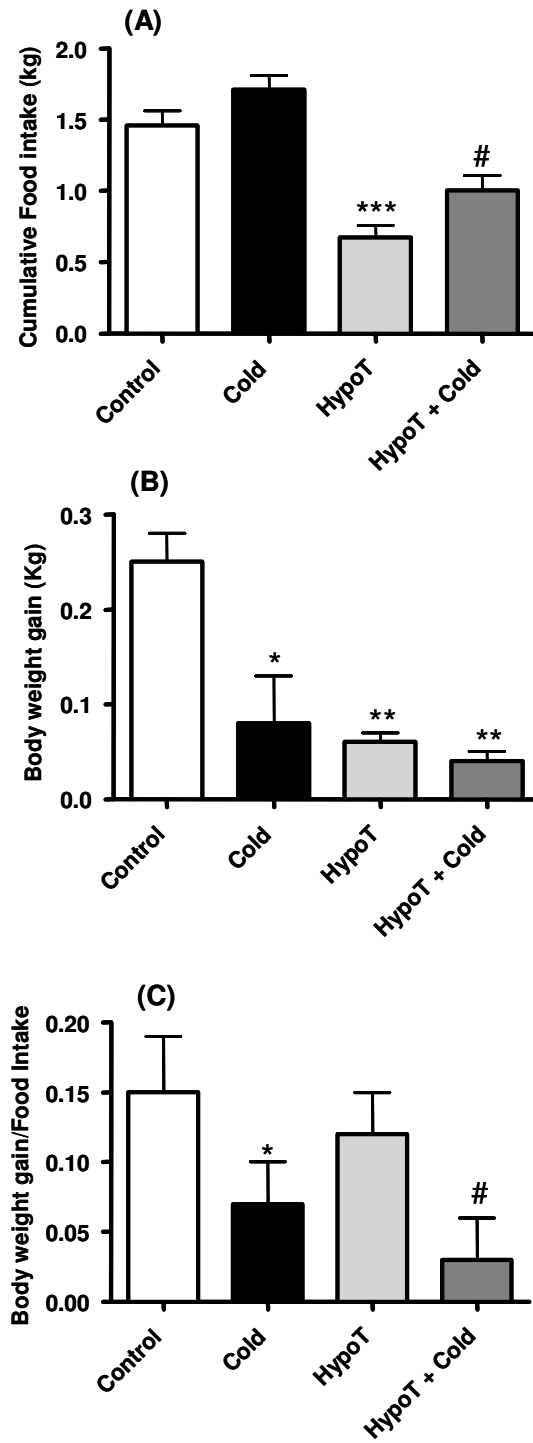


FIGURE 2

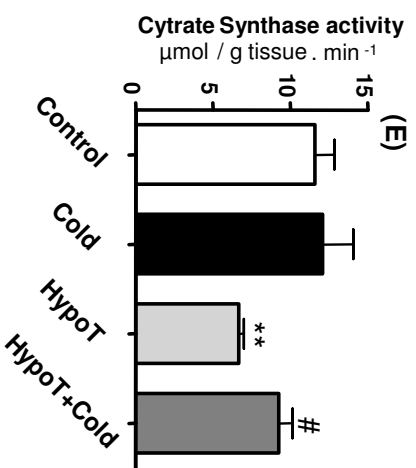
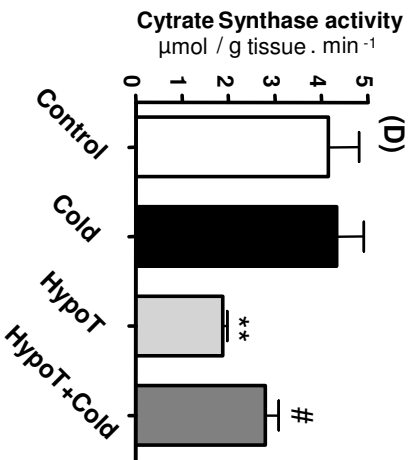
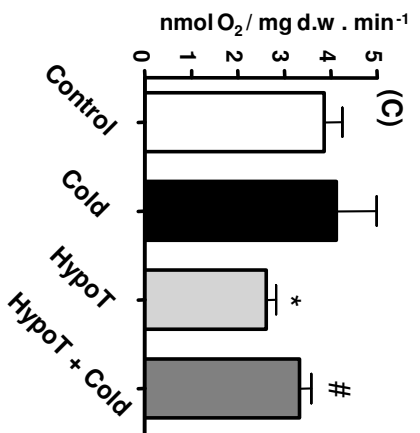
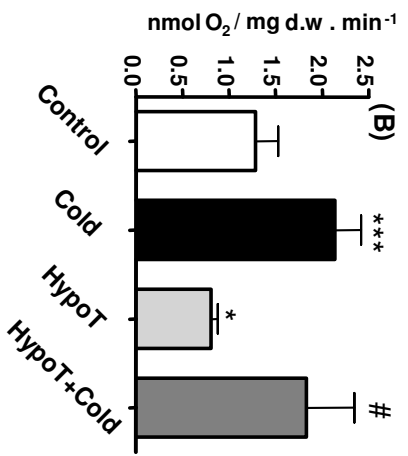
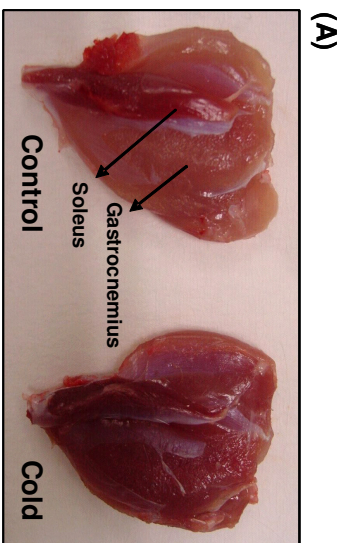


FIGURE 3

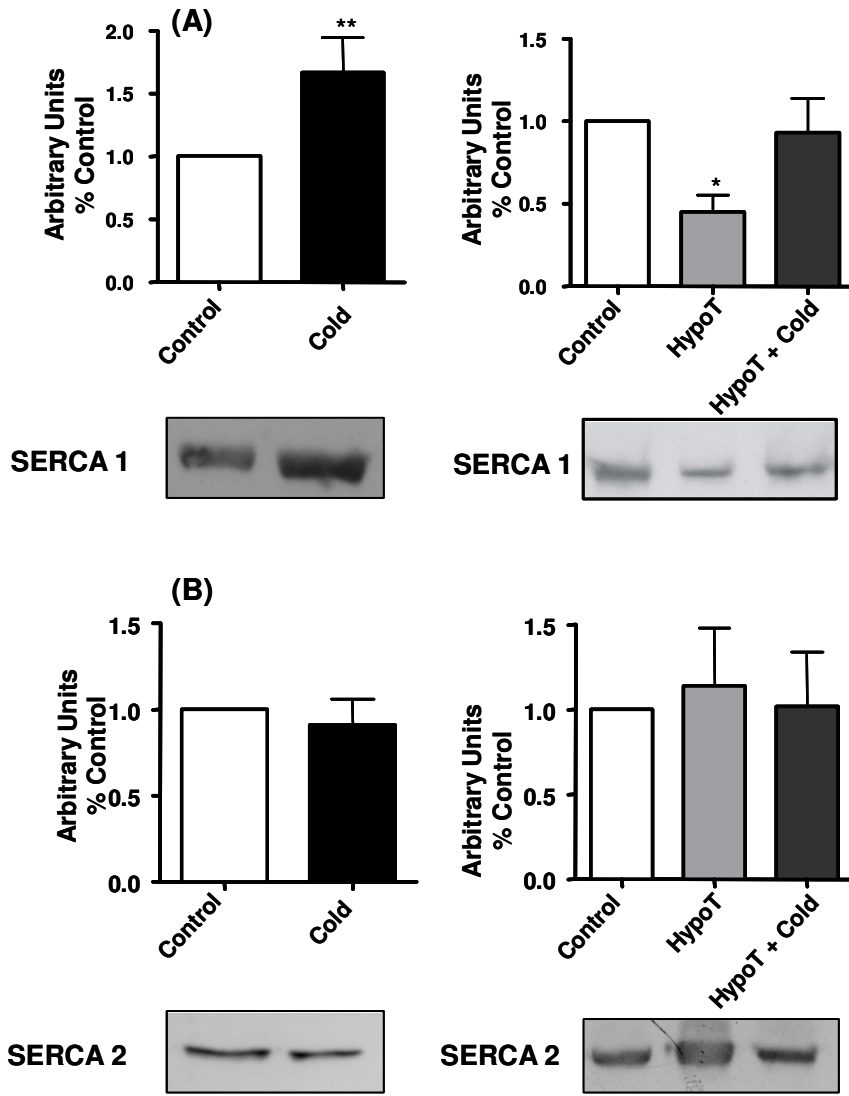


FIGURE 4

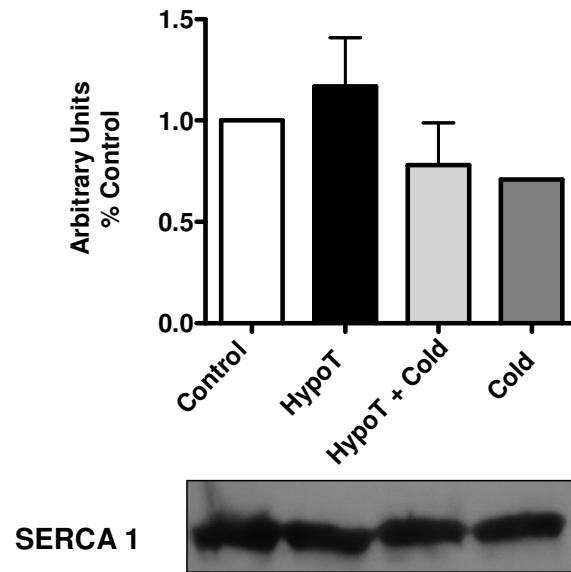


FIGURE 5

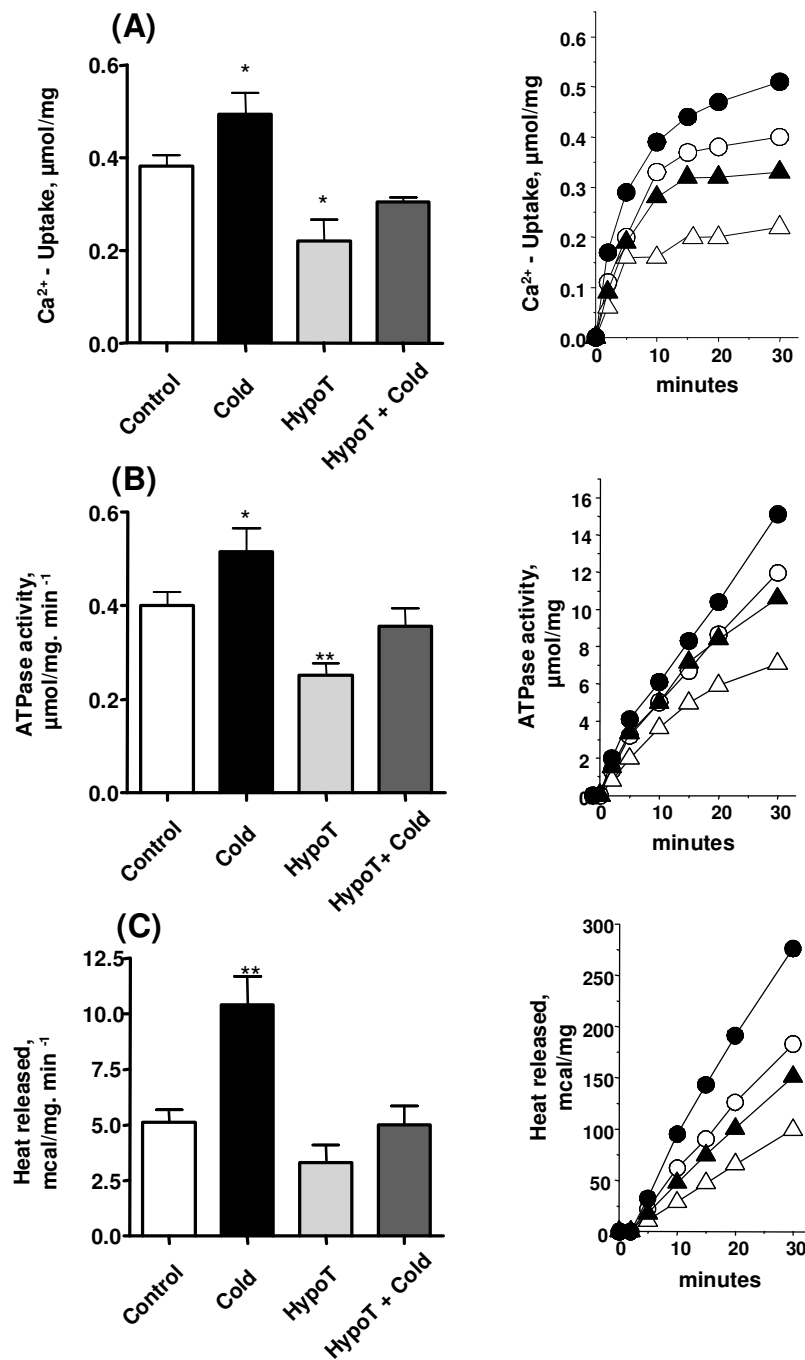


FIGURE 6

ARTIGO 3: Produção de calor pelo músculo esquelético de ratos e coelhos e utilização de glicose 6-fosfato como sistema regenerador de ATP pela Ca^{2+} -ATPase de coração de ratos e coelhos.

Luísa Andrea Ketzer e Leopoldo de Meis

Artigo publicado na revista *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 369:265–269, 2008.

Este artigo é dividido em duas partes:

A) Produção de calor pela Ca^{2+} -ATPase de músculo esquelético de ratos e coelhos.

Ratos possuem o BAT como principal tecido termogênico, enquanto que em coelhos adultos o músculo esquelético é responsável por esta função, já que o BAT é pouco desenvolvido. Neste trabalho, investigou-se a contribuição da SERCA 1 do músculo esquelético branco para a termogênese de ratos e coelhos.

Os principais resultados foram:

- As vesículas de RS de músculo branco de coelhos apresentam uma velocidade de captação de Ca^{2+} maior e acumulam mais Ca^{2+} comparado ao rato.
- Surpreendentemente, a atividade ATPásica e a produção de calor da SERCA de músculo branco de rato são de 2 a 3 vezes mais elevadas do que em coelhos.
- Entretanto, a quantidade de calor produzido por mol de ATP hidrolisado é a mesma pela SERCA de ratos e coelhos.

B) Utilização da glicose 6-fosfato como sistema regenerador de ATP pela Ca^{2+} -ATPase do músculo cardíaco.

A reação catalisada pela hexoquinase é considerada irreversível em condições fisiológicas:



Quando a reação alcança o equilíbrio, a maior parte do ATP é utilizada para a conversão de glicose 6-fosfato, restando uma baixa concentração de ATP no meio. Entretanto, enzimas com alta afinidade por ATP, como a SERCA, ligam-se ao ATP disponível e realizam trabalho. Neste trabalho, verificou-se a capacidade da SERCA de músculo cardíaco em utilizar a glicose 6-fosfato como sistema regenerador de ATP.

Os principais resultados foram:

- Vesículas de RS de músculo cardíaco de ratos e coelhos utilizam glicose 6-fosfato e hexoquinase como sistema regenerador de ATP para transportar Ca^{2+} .
- Utilizando glicose 6-fosfato, observa-se que as taxas de captação de cálcio e hidrólise de ATP pela SERCA de coração são cerca de seis vezes menores comparado ao sistema regenerador fosfoenolpiruvato/ piruvato quinase.
- A atividade da SERCA de músculo cardíaco de rato e coelho é semelhante.



Heat production by skeletal muscles of rats and rabbits and utilization of glucose 6-phosphate as ATP regenerative system by rats and rabbits heart Ca^{2+} -ATPase

Luisa Andrea Ketzer, Leopoldo de Meis*

Instituto de Bioquímica Médica, Prédio do CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil

Received 29 September 2007

Available online 15 January 2008

Abstract

This report is divided in two parts. The first section shows that vesicles derived from the sarcoplasmic reticulum of rats skeletal muscle can cleave ATP at a faster rate and produce more heat than the vesicles derived from rabbit skeletal muscle. In the second part, we compared the rates of Ca^{2+} transport and ATP hydrolysis by rats and rabbits heart sarcoplasmic reticulum. It is shown that the two vesicles preparations are able to use glucose 6-phosphate and hexokinase as an ATP regenerative system. The rates of Ca^{2+} -uptake and ATP hydrolysis measured with glucose 6-phosphate and hexokinase is four to six times slower than that measured with phosphoenolpyruvate and pyruvate kinase as ATP regenerative system.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Heat; Skeletal muscle; Heart; SERCA; Glucose 6-phosphate; ATP regenerating system

There are great masters who are able to unveil from Nature seminal new findings which inspire and teach many in different lands. That is the case of Prof. Ebashi. The contribution of Master Ebashi in the discovery of the endo/sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) and his revolutionary discovery of proteins that regulates physiological events when it binds Ca^{2+} , was to the starting point of more than one generation of young scientists.

Until recently it was assumed that the amount of heat produced during the hydrolysis of an ATP molecule is always the same, as if the energy released during ATP cleavage were divided in two non-interchangeable parts, one would be used for Ca^{2+} transport (work) and the other converted into heat. In recent reports [1–7] it was found that depending on the conditions used, the amount of heat released during the ATP hydrolysis and Ca^{2+} transport may vary between 7 and 32 kcal/mol. This finding indicated that SERCA are able to handle the energy derived

from ATP hydrolysis in such a way as to determine the parcel which is used for Ca^{2+} transport and the parcel of energy that is used for the heat production. Heat generation and burning calories are implicated in the regulation of several physiological processes including body temperature, metabolism, body weight, energy balance and cold acclimation [8–10]. The heat derived from SERCA activity may play an important role in the regulation of non-shivering thermogenesis and obesity control [4,9,21–27].

The various SERCA isoforms have a high affinity for ATP, the apparent K_m being $\sim 10^{-6}$ M. In previous works [11,12] it was shown that brain and skeletal muscle SERCA are able to use glucose 6-phosphate and hexokinase as an ATP regenerative system. This has not been tested previously in cardiac SERCA. The importance of using a low energy phosphate compound as an ATP regenerating system is that it may represent a salvage route used at early stages of cardiac ischemia.

In this report, we will compare the transport and the SERCA thermogenic activity of two animal species (rat and rabbit) and from two different tissues, white skeletal

* Corresponding author. Fax: +55 21 2270 1635.

E-mail address: demeis@bioqmed.ufrj.br (L. de Meis).

muscle and heart. In rats, most of the heat needed for non-shivering thermogenesis is derived from brown adipose tissue (BAT). However, in rabbits that have no significant amount of BAT, the principal source of heat during non-shivering thermogenesis seems to be derived from the ATP hydrolysis catalyzed by SERCA of skeletal muscles [8–10].

Materials and methods

Sarcoplasmic reticulum vesicles. These were derived from the longitudinal sarcoplasmic reticulum of rabbit or Wistar rat muscles and were prepared as described previously [13]. White skeletal muscle was dissected from hind limb and cardiac muscle correspond to ventricle and atria. These vesicles were stored at -80°C until use.

Ca^{2+} -uptake. These were measured by the filtration method [14]. For ^{45}Ca -uptake, trace amounts of ^{45}Ca were included in the assay medium. The reaction was arrested by filtering samples of the assay medium through Millipore filters. After filtration, the filters were washed five times with 5 ml of 3 mM $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ and the radioactivity remaining on the filters was counted using a liquid scintillation counter.

ATPase activity. ATPase activity was assayed in white muscle vesicles by measuring the release of $^{32}\text{P}_i$ from $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. The $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ not hydrolyzed during the reaction was extracted with activated charcoal as described previously [37]. In cardiac muscle vesicles, ATPase activity was assayed by colorimetric method that measure the inorganic phosphate (P_i) released in medium [15]. The reaction was arrested with trichloroacetic acid (final concentration, 5%, w/v). Two different ATPase activities can be distinguished in sarcoplasmic reticulum vesicles derived from heart [16–20]. The Mg^{2+} -dependent activity requires only Mg^{2+} for its activation and is measured in the presence of 10 mM EGTA to remove contaminant Ca^{2+} from the medium. The Ca^{2+} -dependent ATPase activity, which is correlated with Ca^{2+} transport, is determined by subtracting the Mg^{2+} -dependent activity from the activity measured in the presence of both Mg^{2+} and Ca^{2+} .

Heat of reaction. This was measured using an OMEGA Isothermal Titration Calorimeter from Microcal (Northampton, MA, USA). The calorimeter sample cell (1.5 ml) was filled with reaction medium, and the reference cell was filled with Milli-Q water. After equilibration at 35°C , the reaction was started by injecting vesicles into the sample cell and the heat change was recorded for 30 min. The volume of vesicle suspension injected into the sample cell varied between 0.03 and 0.06 ml. The heat change measured during the initial 2 min after vesicle injection was discarded to avoid artifacts such as heat derived from the dilution of the vesicle suspension in the reaction medium and binding of ions to the Ca^{2+} -ATPase. The duration of these events is less than 1 min. Calorimetric enthalpy (ΔH^{cal}) is calculated by dividing the amount of heat released by the amount of ATP hydrolyzed [1,2,4–6]. The units used are mol for substrate hydrolyzed and kcal for heat released. Negative values indicate that the reaction is exothermic and positive values indicate that it is endothermic.

Results and discussion

ATPase activity and heat production

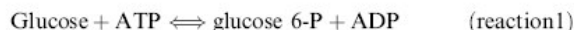
Skeletal muscle is by far the most abundant tissue of human body and accounts for over 50% of the total oxygen consumption in a resting human and up to 90% during very active muscular work [10,28]. Brown adipose tissue (BAT) is capable of rapidly converting fat stores to heat and has been used as a model system for the understanding of non-shivering heat production and mechanisms of energy

wasting to control obesity. In animals lacking BAT, the main source of heat during non-shivering thermogenesis is derived from the hydrolysis of ATP by the SERCA of skeletal muscle [8–10]. In this work, we compare the rates of Ca^{2+} -uptake, ATP hydrolysis and heat produced by SERCA of skeletal muscle of two different animals species, rats that do have a significant deposit of BAT and rabbits which do not have BAT.

Vesicles derived from rabbit skeletal muscle accumulated more Ca^{2+} (steady state) and at a faster rate than vesicles derived from rat skeletal muscle (Table 1). Surprisingly, we found that the rate of ATP cleavage and heat production by rat SERCA was two to three-folds faster than that of rabbit (Fig. 1). Fig. 1 shows a typical experiment and Table 1 shows the values measured in different vesicles preparations. Notice in Table 1 that the amount of heat produced during the hydrolysis of each ATP molecule (ΔH^{cal}) was the same in rats and rabbits. The relationship between body surface area and volume of rats is significantly larger than that of rabbit. Therefore, rats are prone to dissipate more heat to the environment than rabbit. Therefore, in order to maintain the body temperature, in addition to BAT, rats also produce more heat than rabbit at the level of muscle SERCA.

ATP regenerating systems

The reaction catalyzed by hexokinase is usually thought to be irreversible in physiological conditions:



When equilibrium of the reaction is reached, most of the ATP is converted into glucose 6-P but a small fraction of ATP remains available in the medium. Because its high affinity for ATP, SERCA are able to bind the small amount of ATP available in the medium and use it for

Table 1
 Ca^{2+} -uptake, Ca^{2+} -ATPase activity, heat released and ΔH^{cal} in vesicles derived sarcoplasmic reticulum of rat and rabbit white muscle

	2 mM ATP	
	Rat	Rabbit
Ca^{2+} -uptake		
Initial velocity ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein min)	0.40 ± 0.04 (7)	0.53 ± 0.04 (6)
Steady-state ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	2.80 ± 0.38 (7)	3.25 ± 0.41 (6)
Ca^{2+} -ATPase activity (μmol P_i/mg protein min)	3.54 ± 0.49 (7)	0.57 ± 0.06 (13)*
Heat released (mcal/mg protein min)	-70.2 ± 10.5 (7)	-12.84 ± 0.42 (13)*
ΔH^{cal} (mcal/ μmol P_i hydrolyzed)	-21.32 ± 1.1 (7)	-22.85 ± 1.25 (13)

Values are means \pm SE of the number of experiments (n) shown in the table. The difference of ATP hydrolysis and heat release between muscles rat and rabbit SERCA are statistically significant.

* $p < 0.001$.

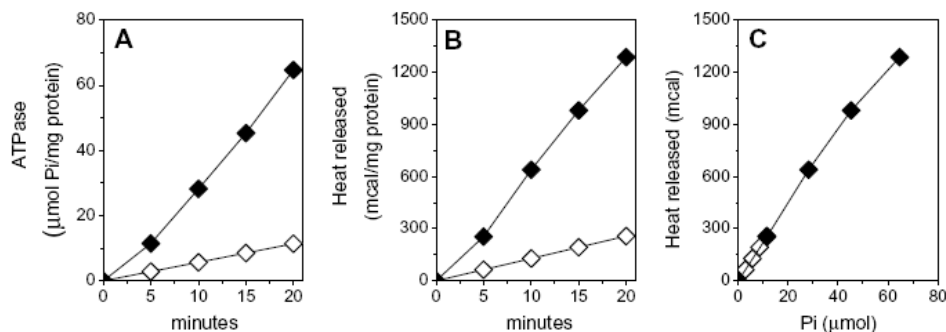


Fig. 1. ATPase activity (A) and heat released (B) in sarcoplasmic reticulum vesicles derived from rat (close symbol) or rabbit (open symbol) white skeletal muscle. In (C), data (A) and (B) were replotted. The assay medium composition was 2 mM ATP, 50 mM MOPS–Tris buffer (pH 7.0), 100 mM KCl, 10 mM Pi, 5 mM NaN_3 , 2 mM MgCl_2 , 0.1 mM CaCl_2 and 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vesicle protein.

Ca^{2+} transport. In order to maintain the equilibrium ATP concentration, the parcel of ATP hydrolyzed is regenerate by a “low energy” sugar phosphate.



This has been previously described using vesicles derived from rabbit white muscle sarcoplasmic reticulum [11]. The sarcoplasmic reticulum of heart muscle is by far less developed than that of white skeletal muscle and the isoforms found embedded into the reticulum membrane is 2a in the heart and SERCA 1 in skeletal muscle. We now show that similar to white muscle SERCA 1, both rabbit and rat sarcoplasmic reticulum vesicles can also use glucose 6-phosphate and hexokinase as an ATP regenerating system to pump Ca^{2+} into the vesicles (Fig. 2). The difference between the use of sugar phosphate and phosphoenolpyruvate (high energy phosphate compound) as ATP regenerating systems is the amount of ADP available in the medium at steady state. While with phosphoenolpyruvate

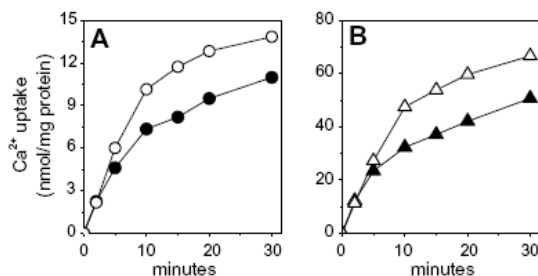


Fig. 2. Ca^{2+} -uptake in sarcoplasmic reticulum vesicles derived from rat (close symbol) or rabbit (open symbol) cardiac muscle. The assay medium composition was 50 mM MOPS–Tris buffer (pH 7.0), 100 mM KCl, 5 mM oxalate, 5 mM NaN_3 , 4 mM MgCl_2 , 0.05 mM $^{45}\text{CaCl}_2$ and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vesicle protein. Ca^{2+} -uptake was supported by 10 U/ml hexokinase, 5 mM glucose 6-phosphate and 50 μM ADP (A) or 10 U/ml pyruvate kinase, 2 mM phosphoenolpyruvate and 50 μM ADP (B).

there is practically no ADP available, with glucose 6-phosphate, most of the nucleotide in the medium is in the form of ADP. In spite of the high ADP concentration, the high ATP affinity of the various SERCA allows the enzyme to “fish” the small amount of ATP available when reaction (reaction 1) above reaches equilibrium. The presence of an excess ADP in the medium, as observed with glucose 6-phosphate and hexokinase, slows down both the rate of Ca^{2+} -uptake and the rate of ATP hydrolysis (Fig. 3). Furthermore, the steady-state level of Ca^{2+} accumulation measured with glucose 6-phosphate is four to six-folds smaller than that measured using phosphoenolpyruvate as an ATP regenerative system (Table 2).

Intracellular Ca^{2+} overload often occurs during severe ischemia and intracellular acidosis, and is a key event leading to cellular injury. Activation of glycolysis during cellular ischemia and energy failure is usually associated with production of lactic acid and a decrease of the intracellular pH to values as low as 6.0 [29,30]. In cardiac muscle lactic acidosis leads to intracellular Ca^{2+} overload and cellular death [31]. Acidification of the medium promotes a decrease of both the Ca^{2+} affinity and the V_{max} of Ca^{2+} transport of the different Ca^{2+} -ATPase isoforms [32–39].

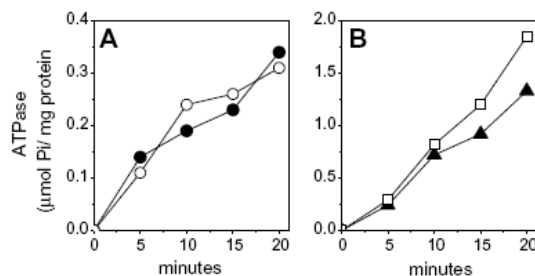


Fig. 3. Ca^{2+} -ATPase activity in sarcoplasmic reticulum vesicles derived from rat (close symbol) or rabbit (open symbol) cardiac muscle. The assay medium composition was 50 mM MOPS–Tris buffer (pH 7.0), 100 mM KCl, 5 mM oxalate, 5 mM NaN_3 , 4 mM MgCl_2 , 0.05 mM CaCl_2 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vesicle protein. Ca^{2+} -ATPase activity was supported by 10 U/ml hexokinase, 5 mM glucose 6-phosphate and 50 μM ADP (A) or 10 U/ml pyruvate kinase, 2 mM phosphoenolpyruvate and 50 μM ADP (B).

Table 2
Ca²⁺-uptake and Ca²⁺-ATPase activity in vesicles derived sarcoplasmic reticulum of rat and rabbit cardiac muscle using ATP-regenerate systems

	Hexokinase		Pyruvate kinase	
	Rat	Rabbit	Rat	Rabbit
Ca ²⁺ -uptake				
Initial velocity (nmol/mg protein min)	1.02 ± 0.22 (7)	1.14 ± 0.23 (6)	5.40 ± 0.84 (8)*	5.55 ± 0.70 (10)*
Steady-state (nmol/mg protein)	10.23 ± 2.50 (7)	13.34 ± 2.81 (6)	46.39 ± 3.33 (8)*	63.14 ± 2.07 (10)*
Ca ²⁺ -ATPase activity (μmol P _i /mg protein min)	0.02 ± 0.01 (7)	0.02 ± 0.01 (6)	0.07 ± 0.01 (8)*	0.09 ± 0.01 (10)*

Values are means ± SE of the number of experiments (*n*) shown in the table. The difference between hexokinase and pyruvate kinase are statistically significant.

* *p* < 0.001.

These changes of the enzyme properties greatly decrease the ability of the SERCA to drain Ca²⁺ from the cytosol into the reticulum. Glucose 6-phosphate can be formed from glycogen and Pi without the need for consuming ATP. The data presented in this report show that the reversal of the reactions catalyzed by hexokinase might be used for the draining of Ca²⁺ from the cytosol during energy failure. The advantage of this system is that during O₂ deprivation, only the initial steps of glycolysis would be activated and the cytosolic Ca²⁺ overload using glucose 6-phosphate an hexokinase as an ATP regenerating system. This would impair the subsequent reactions of glycolysis, thus avoiding the accumulation of lactic acid in the cytosol. The disadvantage is that less ATP would become available to the cell. After the formation of glucose 6-phosphate from glycogen and Pi, three ATP molecules are formed during degradation of glucose 6-phosphate to lactic acid. If glucose 6-phosphate is used to regenerate ATP, then two molecules of ATP that could be formed in the subsequent steps of glycolysis are not synthesized. Perhaps, at the early stages of anoxia and before the energy failure, the use of glucose 6-phosphate might represent a salvage route whereby the cardiac cells may energize the Ca²⁺-ATPase, maintaining a low cytosolic Ca²⁺ concentration and avoiding the deleterious effect derived from Ca²⁺ overload and intracellular acidosis.

Acknowledgments

We are grateful to Valdecir A. Suzano and Antônio Carlos Miranda for technical assistance.

This work was supported by grants from PRONEX—Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

References

- [1] L. de Meis, Control of heat production by the Ca²⁺-ATPase of rabbit and trout sarcoplasmic reticulum, *Am. J. Physiol.* 274 (1998) C1738–C1744.
- [2] L. de Meis, ATP synthesis and heat production during Ca(2+) efflux by sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276 (2000) 35–39.
- [3] L. de Meis, Role of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase on heat production and thermogenesis, *Biosci. Rep.* 21 (2001) 113–137.
- [4] L. de Meis, Uncoupled ATPase activity and heat production by the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 25078–25087.
- [5] L. de Meis, M.L. Bianconi, V.A. Suzano, Control of energy fluxes by the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase: ATP hydrolysis, ATP synthesis and heat production, *FEBS Lett.* 406 (1997) 201–204.
- [6] F. Mitidieri, L. de Meis, Ca²⁺ release and heat production by the endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase of blood platelets, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 28344–28350.
- [7] M. Reis, M. Farage, A.C. de Souza, L. de Meis, Correlation between uncoupled ATP hydrolysis and heat production by the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase: coupling effect of fluoride, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 42793–42800.
- [8] D.G. Nicholls, R.M. Locke, Thermogenic mechanisms in brown fat, *Physiol. Rev.* 64 (1984) 1–64.
- [9] B.A. Block, Thermogenesis in muscle, *Annu. Rev. Physiol.* 56 (1994) 535–577.
- [10] L. Jansky, Humoral thermogenesis and its role in maintaining energy balance, *Physiol. Rev.* 75 (1995) 237–259.
- [11] M. Montero-Lomeli, L. de Meis, Glucose 6-phosphate and hexokinase can be used as an ATP-regenerating system by the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 1829–1833.
- [12] R.C. Ramos, L. de Meis, Glucose 6-phosphate and fructose 1,6-bisphosphate can be used as ATP-regenerating systems by cerebellum Ca²⁺ transport ATPase, *J. Neurochem.* 72 (1999) 81–86.
- [13] S. Eletr, G. Inesi, Phase changes in the lipid moieties of sarcoplasmic reticulum membranes induced by temperature and protein conformational changes, *Biochim. Biophys. Acta* 290 (1972) 178–185.
- [14] M. Chiesi, G. Inesi, The use of quench reagents for resolution of single transport cycles in sarcoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 10370–10377.
- [15] C. Grubmeyer, H.S. Penefsky, The presence of two hydrolytic sites on beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 3718–3727.
- [16] W. Hasselbach, Relaxing factor and relaxation of muscle, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 14 (1964) 167–222.
- [17] L. de Meis, in: E. Bittar (Ed.), *The Sarcoplasmic Reticulum: Transport and Energy Transduction*, vol. 2, John Wiley & Sons, New York, 1981.
- [18] L. de Meis, A.L. Vianna, Energy interconversion by the Ca²⁺-dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum, *Annu. Rev. Biochem.* 48 (1979) 275–292.
- [19] L. de Meis, Approaches to studying the mechanisms of ATP synthesis in sarcoplasmic reticulum, *Methods Enzymol.* 157 (1988) 190–206.
- [20] G. Inesi, Mechanism of calcium transport, *Annu. Rev. Physiol.* 47 (1985) 573–601.
- [21] A. Chinet, A. Decrouy, P.C. Even, Ca²⁺-dependent heat production under basal and near-basal conditions in the mouse soleus muscle, *J. Physiol.* 455 (1992) 663–678.

- [22] E. Dumonteil, H. Barre, G. Meissner, Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and ryanodine receptor in cold-acclimated ducklings and thermogenesis, *Am. J. Physiol.* 265 (1993) C507–C513.
- [23] E. Dumonteil, H. Barre, G. Meissner, Expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transport proteins in cold-acclimating ducklings, *Am. J. Physiol.* 269 (1995) C955–C960.
- [24] F.G. Carey, A brain heater in the swordfish, *Science* 216 (1982) 1327–1329.
- [25] B.A. Block, Structure of the brain and eye heater tissue in marlins, sailfish, and spearfishes, *J. Morphol.* 190 (1986) 169–189.
- [26] B.A. Block, C. Franzini-Armstrong, The structure of the membrane systems in a novel muscle cell modified for heat production, *J. Cell Biol.* 107 (1988) 1099–1112.
- [27] B.A. Block, J. O'Brien, G. Meissner, Characterization of the sarcoplasmic reticulum proteins in the thermogenic muscles of fish, *J. Cell Biol.* 127 (1994) 1275–1287.
- [28] T. Clausen, C. Van Hardeveld, M.E. Everts, Significance of cation transport in control of energy metabolism and thermogenesis, *Physiol. Rev.* 71 (1991) 733–774.
- [29] P.L. Hope, E.B. Cady, A. Chu, D.T. Delpy, R.M. Gardiner, E.O.R. Reynolds, Brain metabolism and intracellular pH during ischemia and hypoxia: an in vivo ^{32}P and ^1H nuclear magnetic resonance study in the lamb, *J. Neurochem.* 49 (1987) 75–82.
- [30] H. Westerblad, J.A. Lee, J. Lannergren, D.G. Allen, Cellular mechanism of fatigue in skeletal muscle, *Am. J. Physiol.* 261 (1991) C185–C209.
- [31] M. Nedergaard, S.A. Goldman, S. Desai, A. Pulsinelli, Acid-induced death in neurons and glia, *J. Neurosci.* 11 (1991) 2489–2497.
- [32] S. Verjovski-Almeida, L. de Meis, pH-induced changes in the reactions controlled by the low- and high-affinity Ca^{2+} binding sites in sarcoplasmic reticulum, *Biochemistry* 16 (1977) 329–334.
- [33] L. de Meis, R.K. Tume, A new mechanism by which an H^+ concentration gradient drives the synthesis of ATP, pH jump, and ATP synthesis by the Ca^{2+} -dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum, *Biochemistry* 16 (1977) 4455–4463.
- [34] T. Watanabe, D. Lewis, R. Nakamoto, M. Kurzmack, C. Fronticelli, G. Inesi, Modulation of calcium binding in sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphatase, *Biochemistry* 20 (1981) 6617–6625.
- [35] U. Pick, S.J.D. Karlisch, Regulation of conformational transition in the Ca^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum by pH, temperature and Ca^{2+} ions, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 6120–6126.
- [36] V. Forge, E. Mintz, F. Guillaïn, Ca^{2+} binding to sarcoplasmic reticulum ATPase revisited, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 10961–10968.
- [37] H. Wolosker, L. de Meis, pH-dependent inhibitory effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} and K^+ on the Ca^{2+} efflux mediated by the sarcoplasmic reticulum ATPase, *Am. J. Physiol.* 266 (1994) C1376–C1381.
- [38] E. Mintz, F. Guillaïn, Ca^{2+} transport by the sarcoplasmic reticulum ATPase, *Biochim. Biophys. Acta* 1318 (1997) 52–70.
- [39] H. Wolosker, J.B.T. Rocha, S. Engelder, R. Panizzutti, J. de Miranda, L. de Meis, Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase isoforms: diverse responses to acidosis, *Biochem. J.* 321 (1997) 545–550.

4 – DISCUSSÃO

Os mecanismos de transdução de energia têm sido objeto de estudo em nosso laboratório há muitos anos. A descoberta da capacidade da SERCA em interconverter diferentes formas de energia trouxe importantes contribuições para o entendimento do processo de termogênese muscular. O músculo esquelético é o tecido mais abundante do corpo humano e é responsável pela manutenção da temperatura corporal (JANSKÝ, 1973; ZURLO et al., 1990; DUCHAMP e BARRÉ, 1993). Em condições basais (repouso), o consumo de oxigênio muscular representa grande parte da demanda metabólica corporal (cerca de 30 %). Durante o exercício físico vigoroso, o consumo de O₂ muscular pode chegar a 90 % da captação de O₂ total do corpo (ZURLO et al., 1990). Além de sua contribuição em condições basais, o músculo esquelético responde pela termogênese adaptativa em resposta ao frio ou à dieta (JANSKÝ, 1973; DUCHAMP e BARRÉ, 1993; BLOCK, 1994).

Os dados reunidos nesta tese mostram a contribuição da SERCA na termogênese adaptativa e sua modulação em condições patofisiológicas, como o hipo- e o hipertireoidismo.

Os hormônios tireoideanos regulam a expressão de SERCA 2a e PLB no músculo cardíaco, sendo responsáveis pela diminuição ou aumento da razão SERCA 2a/ PLB no hipo e hipertireoidismo, respectivamente. A razão SERCA 2a/ PLB é um fator determinante para função contrátil cardíaca. Os dados apresentados confirmam a modulação da expressão destas duas proteínas nos modelos experimentais utilizados. O hipertireoidismo promove um aumento da expressão de SERCA 2a e do estado fosforilado da fosfolambam, reduzindo a interação inibitória SERCA 2a – PLB e levando a um aumento da atividade da SERCA 2a. O

hipertireoidismo leva a uma hipertrofia cardíaca possivelmente devido ao aumento da carga hemodinâmica (KLEIN e HONG, 1986; BIONDI et al., 2000). No hipotireoidismo, as alterações são mais evidentes na expressão de PLB, visto pelo aumento do conteúdo total de PLB e redução da sua fosforilação. A expressão de SERCA 2a não é alterada. Com isso, há uma redução da razão SERCA 2a / PLB, provocando uma inibição da atividade da SERCA.

A quantidade de calor liberado por mol de ATP hidrolisado (ΔH^{cal}) pela SERCA de músculo cardíaco não é alterado em virtude do estado tireóideo do coelho. Além disso, o ΔH^{cal} medido em vesículas de RS cardíaco é cerca de 3 a 5 vezes menor do que o observado no músculo esquelético branco ou vermelho. O coração expressa exclusivamente SERCA 2, enquanto que o músculo esquelético branco expressa somente SERCA 1 e o vermelho uma mistura de SERCA 1 e 2. Trabalhos anteriores em nosso laboratório demonstraram que SERCA 1 é a única isoforma capaz de hidrolisar ATP de maneira desacoplada ao transporte de Ca^{2+} após a formação do gradiente de Ca^{2+} . O músculo esquelético vermelho apresenta uma atividade ATPásica desacoplada baixa em comparação com o músculo branco possivelmente porque expressa ambas as isoformas 1 e 2 da SERCA (REIS et al., 2002). Em virtude da baixa atividade ATPásica desacoplada, os músculos cardíaco e esquelético vermelho apresentam uma pequena contribuição para a termogênese em condições fisiológicas comparado ao músculo esquelético branco.

Além das mudanças observadas no retículo sarcoplasmático, o consumo de oxigênio mitocondrial do músculo cardíaco também é afetado no hipo- e hipertireoidismo. Observa-se um aumento na respiração mitocondrial no ventrículo esquerdo de coelhos hipertireóideos associado ao aumento da atividade da citrato sintase, indicando um aumento da biogênese mitocondrial. No hipotireoidismo, a

redução do número de mitocôndrias promove uma diminuição da velocidade de consumo de oxigênio. Os hormônios tireoideanos regulam a expressão de diferentes genes mitocôndrias, incluindo do fator de transcrição PGC-1 relacionado à biogênese mitocondrial.

A adaptação às baixas temperaturas exige do organismo homeotérmico alterações metabólicas para manter a temperatura corporal constante e, assim, permitir a sobrevivência nessas condições. Essas alterações são mediadas pela ação sinérgica dos hormônios tireoideanos e adrenérgicos que estimulam a termogênese adaptativa em tecidos específicos (LANDSBERG et al., 1984; SILVA, 2006). Os efeitos da exposição ao frio no coração de coelhos eutireóides são verificados nas primeiras 72 horas, ocorrendo uma adaptação evidente após 240 horas. As alterações descritas são semelhantes às observadas em coelhos hipertireóides, com exceção da redução significativa do conteúdo total de PLB. Conseqüentemente, observa-se um aumento da atividade da SERCA nestes animais, entretanto, sem afetar o ΔH^{cal} . O aumento da fosforilação de PLB no resíduo de Serina 16 (Ser¹⁶) pode ser resultado da elevada sinalização β -adrenérgica, já que este aminoácido é um dos alvos da estimulação adrenérgica no coração. A exposição ao frio estimula os receptores β -adrenérgicos, que são abundantemente expressos no coração. Os receptores β -adrenérgicos estão acoplados a proteínas G, que promove a ativação de adenilato ciclase e, conseqüentemente, aumenta os níveis intracelulares de AMP cíclico (AMPc) (LEVITZKI, 1988). Desta maneira, a proteína quinase dependente de AMPc (PKA) é ativada e promove a fosforilação do resíduo Ser¹⁶ da fosfolambam. Interessantemente, as alterações na expressão de proteínas e na atividade da

SERCA observadas em 72 horas de exposição ao frio são revertidas após 240 horas, sugerindo uma adaptação às baixas temperaturas.

Diferente do coração, as respostas do músculo esquelético são mais evidentes após longo período de exposição ao frio, contribuindo possivelmente para o processo de adaptação. A exposição ao frio por 240 horas promove um aumento da expressão de SERCA 1 no músculo esquelético vermelho de coelhos eutiróides. Conseqüentemente, a atividade ATPásica desacoplada e o ΔH^{cal} estão aumentados neste tecido. O músculo branco não apresenta alterações no conteúdo e nas propriedades cinéticas da SERCA 1. Entretanto, observa-se que o músculo branco de coelhos expostos ao frio torna-se mais avermelhado, sugerindo um aumento no número de mitocôndrias e/ou um aumento de mioglobina.

O hipotireoidismo promove uma redução da expressão de SERCA 1 no músculo vermelho, reduzindo a captação de Ca^{2+} e a atividade ATPásica neste tecido. Surpreendentemente, coelhos hipotireóides mantêm a temperatura corporal durante a exposição ao frio, semelhante aos coelhos eutireóides. Ratos hipotireóides são intolerantes às baixas temperaturas e morrem devido à hipotermia nas primeiras horas de exposição ao frio (BIANCO e SILVA, 1987). Portanto, o hormônio tireoideano parece não ser essencial para a termogênese adaptativa em coelhos. As alterações provocadas pelo hipotireoidismo na expressão e atividade da SERCA de músculo vermelho de coelhos são revertidas após a exposição ao frio. Contudo, não alcançam aos níveis observados em coelhos eutireóides expostos ao frio.

O último artigo apresentado na tese abordada dois assuntos relacionados à transdução de energia: a produção de calor pela SERCA de ratos e coelhos e a utilização de glicose 6-fosfato pelo coração.

Diferente de coelhos, os ratos possuem o BAT como principal tecido termogênico. Entretanto, os dados mostram-se que a atividade ATPásica e a produção de calor pela SERCA de músculo branco de rato é 5 vezes maior do em coelhos. A elevada atividade ATPásica reflete no aumento da produção de calor, porém não altera a quantidade de calor liberada por mol de ATP hidrolisado (ΔH^{cal}). Esses dados indicam que, além do BAT, o músculo esquelético branco do rato contribui significativamente para a produção de calor e manutenção da temperatura corporal. Uma possível explicação para este fato é que os ratos possuem uma razão superfície/volume corporal maior de que coelhos e tendem a dissipar mais calor para o meio. Além disso, o músculo esquelético de rato não expressa quantidades significativas de duas proteínas reguladoras da SERCA, a sarcolipina e a fosfolambam (TUPLING et al., 2002; VANGHELUWE et al., 2005). O rato necessita de mecanismos mais complexos para manter a temperatura corporal em comparação ao coelho.

Na segunda parte do artigo 3, estudou-se a capacidade de SERCA de músculo cardíaco em utilizar glicose 6-fosfato como sistema regenerador de ATP. Como previamente mostrado em músculo branco (MONTERO-LOMELI e DE MEIS, 1992), o músculo cardíaco foi capaz de reconhecer o ATP gerado a partir de glicose 6-fosfato e hexoquinase e transportar Ca^{2+} . Entretanto, observa-se que as velocidades de captação de Ca^{2+} e hidrólise de ATP são menores que as observadas utilizando fosfoenolpiruvato e piruvato quinase como sistema regenerador de ATP. A diferença em utilizar glicose 6-fosfato ou fosfoenolpiruvato (composto de alta energia) está na quantidade de ADP disponível no meio durante o estado estacionário. Quando a reação “fosfoenolpiruvato + ADP \leftrightarrow piruvato + ATP” alcança o equilíbrio, existe pequenas quantidade de ADP disponível. Entretanto,

utilizando glicose 6-fosfato, a maior parte do nucleotídeo disponível no meio está na forma de ADP. A presença de um excesso de ADP no meio, como o observado com glicose 6-fosfato, resulta na redução das propriedades cinéticas da SERCA. Outra observação interessante é que, diferente do músculo esquelético branco, a atividade da SERCA de coração não difere entre ratos e coelhos.

5 – CONCLUSÕES

- Os hormônios tireoideanos e a exposição ao frio por curto período promovem alterações na razão SERCA 2a/ PLB e nos parâmetros cinéticos de músculo cardíaco de coelhos. Entretanto, o ΔH^{cal} não é alterado em nenhuma condição experimental testada.
- A exposição ao frio por um período prolongado (240 horas) reverte as alterações cardíacas observadas em 72 horas.
- A adaptação dos coelhos hipo- e eutireóideos está relacionada ao aumento da expressão e atividade da SERCA e a estimulação do consumo de oxigênio das mitocôndrias musculares.
- Diferente de rato, a termogênese adaptativa em coelhos não é completamente dependente de hormônio tireoideano.
- Em ratos, além do BAT, a produção de calor pela Ca^{2+} -ATPase do músculo esquelético tem uma importante contribuição para a termogênese neste animal
- O músculo cardíaco é capaz de utilizar glicose 6-fosfato e hexoquinase como sistema regenerador de ATP.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAI, M., OTSU, K., MACLENNAN, D.H., ALPERT, N.R., PERIASAMY, M. **Effect of thyroid hormone on the expression of mRNA encoding sarcoplasmic reticulum proteins.** Circulation Research, 69:266-276, 1991.

ARRUDA, A.P., DA-SILVA, W.S., CARVALHO, D.P., DE MEIS, L. **Hyperthyroidism increases the uncoupled ATPase activity and heat production by the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase.** Biochemical Journal, 375:753-760, 2003.

ASAHI, M., KURZYDLOWSKI, K., TADA, M., MACLENNAN, D.H. **Sarcolipin inhibits polymerization of phospholamban to induce superinhibition of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases (SERCAs).** Journal of Biological Chemistry, 277:26725-26728, 2002.

BAHOOUTH, S.W. **Thyroid hormones transcriptionally regulate the beta 1-adrenergic receptor gene in cultured ventricular myocytes.** Journal of Biological Chemistry, 266:15863-15869, 1991.

BARLOGIE, B., HASSELBACH, W., MAKINOSE, M. **Activation of calcium efflux by ADP and inorganic phosphate.** FEBS Letters, 12:267-268, 1971.

BENDALL, J.R. **Muscles, molecules and movement.** New York: American Elsevier Publishing Company Inc, 219 p, 1969.

BERS, D.M. **Cardiac excitation-contraction coupling.** Nature, 415:198-205, 2002.

BEUCKELMANN, D.J. e WIER, W.G. **Mechanism of release of calcium from sarcoplasmic reticulum of guinea-pig cardiac cells.** The Journal of Physiology, 405: 233-255, 1988.

BIANCO, A.C. e KIM, B.W. **Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action.** The Journal of Clinical Investigation, 116:2571-2579, 2006.

BIANCO, A.C. e SILVA, J.E. **Intracellular conversion of thyroxine to triiodothyronine is required for the optimal thermogenic function of brown adipose tissue.** The Journal of Clinical Investigation, 79:295-300, 1987.

BIONDI, B., PALMIERI, E.A., FAZIO, S., COSCO, C., NOCERA, M., SACCÀ, L., FILETTI, S., LOMBARDI, G., PERTICONE, F. **Endogenous subclinical hyperthyroidism affects quality of life and cardiac morphology and function in young and middle-aged patients.** Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 85:4701-4705, 2000.

BLOCK, B.A. **Thermogenesis in muscle.** Annual Review Physiology, 56:535-577, 1994.

BOELAERT, K. e FRANKLYN, J.A. **Thyroid hormone in health and disease.** The Journal of Endocrinology, 187:1-15, 2005.

BOOTH, F.W. e THOMASON, D.B **Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: Perspectives of various models.** *Physiological Reviews*, 71:541–585, 1991.

BRENT, G.A **The molecular basis of thyroid hormone action.** *The New England Journal of Medicine*, 331:847-853, 1994.

BURK, S.E., LYTTON, J., MACLENNAN, D.H., SHULL, G.E. **cDNA cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of a third organellar Ca²⁺ pump.** *Journal of Biological Chemistry*, 264:18561-18568, 1989.

CAMPBELL, A.M., KESSLER, P.D., FAMBROUGH, D.M. **The alternative carboxyl termini of avian cardiac and brain sarcoplasmic reticulum/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPases are on opposite sides of the membrane.** *Journal of Biological Chemistry*, 267:9321-9325, 1992.

CANNON, B. e NEDERGAARD, J. **Brown adipose tissue: function and physiological significance.** *Physiological Reviews*, 84:277–359, 2004.

CANTILINA, T., SAGARA, Y., INESI, G., JONES, L.R. **Comparative studies of cardiac and skeletal sarcoplasmic reticulum ATPases. Effect of a phospholamban antibody on enzyme activation by Ca²⁺.** *Journal of Biological Chemistry*, 268:17018-17025, 1993.

CHIBALIN, A.V., YU, M., RYDER, J.W., SONG, X.M., GALUSKA, D., KROOK, A., WALLBERG-HENRIKSSON, H., ZIERATH, J.R. **Exercise-induced changes in expression and activity of proteins involved in insulin signal transduction in skeletal muscle: Differential effects on insulin-receptor substrates 1 and 2.** *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97:38-43, 2000.

CHIEN, K.R. **Genomic circuits and the integrative biology of cardiac diseases.** *Nature*, 407:227-232, 2000.

CHRISTOFFOLETE, M.A., LINARDI, C.C., DE JESUS, L., EBINA, K.N., CARVALHO, S.D., RIBEIRO, M.O., RABELO, R., CURCIO, C., MARTINS, L., KIMURA, E.T., BIANCO, A.C. **Mice with targeted disruption of the Dio2 gene have cold-induced overexpression of the uncoupling protein 1 gene but fail to increase brown adipose tissue lipogenesis and adaptive thermogenesis.** *Diabetes*, 53:577-584, 2004.

CHU, G., LESTER, J.W., YOUNG, K.B., LUO, W., ZHAI, J., KRANIAS, E.G. **A single site (Ser¹⁶) phosphorylation in phospholamban is sufficient in mediating its maximal cardiac responses to beta -agonists.** *Journal of Biological Chemistry*, 275:38938-38943, 2000.

CLAUSEN, T., VAN HARDEVELD, C., EVERTS, M.E. **Significance of cation transport in control of energy metabolism and thermogenesis.** *Physiological Reviews*, 71:733-774, 1991.

COOPER, D.S. **Hyperthyroidism.** *Lancet*, 362:459-468, 2003.

CORNEA, R.L., JONES, L.R., AUTRY, J.M., THOMAS, D.D. **Mutation and phosphorylation change the oligomeric structure of phospholamban in lipid bilayers.** *Biochemistry*, 36:2960-2967, 1997.

DAVIDSON, A.L. e MALONEY, P.C. **ABC transporters: how small machines do a big job.** *Trends in Microbiology*, 15:448-455, 2007.

DAVIS, P.J. e DAVIS, F.B. **Nongenomic actions of thyroid hormone on the heart.** *Thyroid*. 12:459-466, 2002.

DAVIS, P.J., LEONARD, J.L., DAVIS, F.B. **Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone.** *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29:211-218, 2008.

DE LANGE, P., FEOLA, A., RAGNI, M., SENESE, R., MORENO, M., LOMBARDI, A., SILVESTRI, E., AMAT, R., VILLARROYA, F., GOGLIA, F., LANNI, A. **Differential 3,5,3'-triiodothyronine-mediated regulation of uncoupling protein 3 transcription: role of Fatty acids.** *Endocrinology*, 148:4064-4072, 2007.

DE MEIS, L. **ATP synthesis and heat production during Ca^{2+} efflux by sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276:35-39, 2000.

DE MEIS, L. **Control of heat produced during ATP hydrolysis by the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in the absence of a Ca^{2+} gradient.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 243:598-600, 1998.

DE MEIS, L. e INESI, G. **Functional evidence of a transmembrane channel within the Ca^{2+} transport ATPase of sarcoplasmic reticulum.** *FEBS Letters*, 299:33-35, 1992.

DE MEIS, L. **Pyrophosphate of high and low energy. Contributions of pH, Ca^{2+} , Mg^{2+} , and water to free energy of hydrolysis.** *Journal of Biological Chemistry*, 259:6090-6097, 1984.

DE MEIS, L. **Role of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase on heat production and thermogenesis.** *Bioscience Reports*, 21:113-137, 2001.

DE MEIS, L. **Role of water in the energy of hydrolysis of phosphate compounds- energy transduction in biological membranes.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 973:333-349, 1989.

DE MEIS, L. **The concept of energy-rich phosphate compounds: water, transport ATPases, and entropic energy.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 306:287-296, 1993.

DE MEIS, L. **Uncoupled ATPase activity and heat production by the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. Regulation by ADP.** *Journal of Biological Chemistry*, 276:25078-25087, 2001.

DE MEIS, L., BEHRENS, M.I., PETRETSKI, J.H., POLITI, M.J. **Contribution of water to free energy of hydrolysis of pyrophosphate.** *Biochemistry*, 24:7783-7789, 1985.

DE MEIS, L., BIANCONI, M.L., SUZANO, V.A. **Control of energy fluxes by the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase: ATP hydrolysis, ATP synthesis and heat production.** FEBS Letters, 406:201-204, 1997.

DE MEIS, L., GRIECO, M.A., GALINA, A. **Reversal of oxidative phosphorylation in submitochondrial particles using glucose 6-phosphate and hexokinase as an ATP regenerating system.** FEBS Letters, 308:197-201, 1992.

DE MEIS, L., MARTINS, O.B., ALVES, E.W. **Role of water, hydrogen ion, and temperature on the synthesis of adenosine triphosphate by the sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphatase in the absence of a calcium ion gradient.** Biochemistry, 19:4252-4261, 1980.

DE MEIS, L., WOLOSKER, H., ENGELENDER, S. **Regulation of the channel function of the Ca^{2+} ATPase.** Biochimica et Biophysica Acta, 1275:105-110, 1996.

DEVDHAR, M., OUSMAN, Y.H., BURMAN, K.D. **Hypothyroidism.** Endocrinology Metabolism Clinics of North America, 36:595-615, 2007.

DILLMANN, W.H. **Cellular action of thyroid hormone on the heart.** Thyroid, 12:447-452, 2002.

DUCHAMP, C. e BARRÉ, H. **Skeletal muscle as the major site of nonshivering thermogenesis in cold-acclimated ducklings.** American Journal of Physiology 2650:R1076-R1083, 1993.

DUNTAS, L.H. **Thyroid disease and lipids.** Thyroid, 12:287-293, 2002.

EDELMAN, I.S. e ISMAIL-BEIGI, F. **Thyroid thermogenesis and active sodium transport.** Recent Progress in Hormone Research, 30:235-257, 1974.

ENERBÄCK, S., JACOBSSON, A., SIMPSON, E.M., GUERRA, C., YAMASHITA, H., HARPER, M.E., KOZAK, L.P. **Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese.** Nature, 387:90-94, 1997.

ENRIQUEZ, J.A., FERNANDEZ-SILVA, P., GARRIDO, N., PEREZ-MARTOS, A., LOPEZ- PEREZ, M.J., MONTOYA, J. **Direct regulation of mitochondrial RNA synthesis by thyroid hormone.** Molecular and Cellular Biology, 19, 657–670, 1999.

ENYEDI, P., SZABADKAI, G., KRAUSE, K.H., LEW, D.P., SPÄT, A. **Inositol 1,4,5-trisphosphate binding sites copurify with the putative Ca-storage protein calreticulin in rat liver.** Cell Calcium, 14:485-492, 1993.

FABIATO, A. **Simulated calcium current can both cause calcium loading in and trigger calcium release from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell.** The Journal of General Physiology 85:291–320, 1985.

FALCONE, M., MIYAMOTO, T., FIERRO-RENOY, F., MACCHIA, E., DEGROO, T.L.J. **Antipeptide polyclonal antibodies specifically recognize each human thyroid hormone receptor isoform.** Endocrinology, 131:2419-2429, 1992.

FASSOLD, E. e HASSELBACH, W. **Synthesis of ATP from Ca^{2+} gradient by sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transport ATPase.** *Methods in Enzymology*, 157:220-228, 1988.

FLÜCK, M. e HOPPELER, H. **Molecular basis of skeletal muscle plasticity - From gene to form and function.** *Reviews of Physiology, Biochemistry & Pharmacology*, 146:159-216, 2003.

FORBES, M.S., HAWKEY, L.A., JIRGE, S.K., SPERELAKIS, N. **The sarcoplasmic reticulum of mouse heart: its divisions, configurations, and distribution.** *Journal of Ultrastructure Research*, 93:1-16, 1985.

FORBES, M.S., VAN NIEL, E.E., PURDY-RAMOS, S.I. **The atrial myocardial cells of mouse heart: a structural and stereological study.** *Journal of Structural Biology*, 103:266-279, 1990.

FORGAC, M. **Structure, function and regulation of the vacuolar H^+ -ATPases.** *FEBS Letters*, 440:258-263, 1988.

FORGE, V., MINTZ, E., GUILLAIN, F. **Ca^{2+} binding to sarcoplasmic reticulum ATPase revisited. I. Mechanism of affinity and cooperativity modulation by H^+ and Mg^{2+} .** *Journal of Biological Chemistry*, 268:10953-10960, 1993.

FORTEA, M.I., SOLER, F., FERNANDEZ-BELDA, F. **Insight into the uncoupling mechanism of sarcoplasmic reticulum ATPase using the phosphorylating substrate UTP.** *Journal of Biological Chemistry*, 275:12521-12529, 2000.

FRANZINI-ARMSTRONG, C. e PEACHEY, L.D. **Striated muscle-contraction and control mechanisms.** *The Journal of Cell Biology*, 93:166-186, 1981.

GEORGE, P., WITONSKY, R.J., TRACHTMAN, M., WU, C., DORWART, W., RICHMAN, L., RICHMAN, W., SHURAYH, F., LENTZ, B. **"Squiggle- H_2O ". An enquiry into the importance of solvation effects in phosphate ester and anhydride reactions.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 223:1-15, 1970.

GLOSS, B., TROST, S., BLUHM, W., SWANSON, E., CLARK, R., WINKFEIN, R., JANZEN, K., GILES, W., CHASSANDE, O., SAMARUT, J., DILLMANN, W. **Cardiac ion channel expression and contractile function in mice with deletion of thyroid hormone receptor alpha or beta.** *Endocrinology*, 142(2):544-550, 2001.

GOLOZOUBOVA, V., GULLBERG, H., MATTHIAS, A., CANNON, B., VENNSTRÖM, B., NEDERGAARD, J. **Depressed thermogenesis but competent brown adipose tissue recruitment in mice devoid of all hormone-binding thyroid hormone receptors.** *Molecular Endocrinology*, 18:384-401, 2004.

GONG, D.W., HE, Y., KARAS, M., REITMAN, M. **Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3-adrenergic agonists, and leptin.** *Journal of Biological Chemistry*, 272:24129-24132, 1997.

GONG, D.W., MONEMDJOU, S., GAVRILOVA, O., LEON, L.R., MARCUS-SAMUELS, B., CHOU, C.J., EVERETT, C., KOZAK, L.P., LI, C., DENG, C., HARPER, M.E., REITMAN, M.L. **Lack of obesity and normal response to fasting**

and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3. *Journal of Biological Chemistry*, 275:16251-16257, 2000.

GUYTON, A.C e HALL, J.E. **Textbook of medical physiology** Editora Elsevier, 11^a Edição, 2006.

HABER, R.S. e LOEB, J.N. **Stimulation of potassium efflux in rat liver by a low dose of thyroid hormone: evidence for enhanced cation permeability in the absence of Na,K-ATPase induction.** *Endocrinology*, 118:207-211, 1986.

HADDAD, F., BODELL, P.W., QIN, A.X., GIGER, J.M., BALDWIN, K.M. **Role of antisense RNA in coordinating cardiac myosin heavy chain gene switching.** *Journal of Biological Chemistry*, 278:37132-37138, 2003.

HADZIC, E., DESAI-YAJNIK, V., HELMER, E., GUO, S., WU, S., KOUDINOVA, N., CASANOVA, J., RAAKA, B.M., SAMUELS, H.H. **A 10-amino-acid sequence in the N-terminal A/B domain of thyroid hormone receptor alpha is essential for transcriptional activation and interaction with the general transcription factor TFIIB.** *Molecular and Cellular Biology*, 15:4507-4517, 1995.

HARPER, M.E. e SEIFERT, E.L. **Thyroid hormone effects on mitochondrial energetics.** *Thyroid*, 18:145-156, 2008.

HARTONG, R., WANG, N., KUROKAWA, R., LAZAR, M.A., GLASS, C.K., APRILETTI, J.W., DILLMANN, W.H. **Delineation of three different thyroid hormone-response elements in promoter of rat sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase gene. Demonstration that retinoid X receptor binds 5' to thyroid hormone receptor in response element 1.** *Journal of Biological Chemistry*, 269:13021-13029, 1994.

HARVEY, C.B. e WILLIAMS, G.R. **Mechanism of thyroid hormone action.** *Thyroid*, 12:441-446, 2002.

HASSELBACH, W. e MAKINOSE, M. **ATP and active transport.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 7:132-136, 1962.

HASSELBACH, W. e MAKINOSE, M. **Die Calciumpumpe der "Erschlaffungsgrana" des Muskels und ihre Abhängigkeit von der ATP-Spaltung** *Biochemische Zeitschrift*, 333:518-528, 1961.

HASSELBACH, W. e MAKINOSE, M. **On the mechanism of calcium transport across the membrane of the sarcoplasmic reticulum.** *Biochemische Zeitschrift*, 339:94-111, 1963.

HASSELBACH, W., MAKINOSE, M., MIGALA, A. **The arsenate induced calcium release from sarcoplasmic vesicles.** *FEBS Letters*, 20:311-315, 1972.

HAWLEY, J.A. **Adaptations of skeletal muscle to prolonged, intense endurance training.** *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 29:218-222, 2002.

HAYES, D.M., KENYON, G.L., KOLLMAN, P.A. **Theoretical calculations of the hydrolysis energy of some “high-energy” molecules. 2. A survey of some biologically important hydrolytic reactions.** *Journal of the American Chemical Society*, 106:4331–4340, 1978.

HELLSTERN, S., PEGORARO, S., KARIM, C.B., LUSTIG, A., THOMAS, D.D., MORODER, L., ENGEL, J. **Sarcolipin, the shorter homologue of phospholamban, forms oligomeric structures in detergent micelles and in liposomes.** *Journal of Biological Chemistry*, 276:30845-30852, 2001.

HENNEMANN, G., DOCTER, R., FRIESEMA, E.C., DE JONG, M., KRENNING, E.P., VISSER, T.J. **Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability.** *Endocrine Reviews*, 22:451-476, 2001.

HIMMS-HAGEN, J. **Brown adipose tissue thermogenesis and obesity.** *Progress in Lipid Research*, 28:67–115, 1989.

HIMMS-HAGEN, J. **Does thermoregulatory feeding occur in newborn infants? A novel view of the role of brown adipose tissue thermogenesis in control of food intake.** *Obesity Research* 3: 361–369, 1995.

HIROI, Y., KIM, H.H., YING, H., FURUYA, F., HUANG, Z., SIMONCINI, T., NOMA, K., UEKI, K., NGUYEN, N.H., SCANLAN, T.S., MOSKOWITZ, M.A., CHENG, S.Y., LIAO, J.K. **Rapid nongenomic actions of thyroid hormone.** *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103:14104-14109, 2006.

HOHTOLA, E. **Facultative and obligatory thermogenesis in young birds: a cautionary note.** *Comparative Biochemistry and Physiology*, 131:733-739, 2002.

IKEMOTO, N., NAGY, B., BHATNAGAR, G.M., GERGELY, J. **Studies on a metal-binding protein of the sarcoplasmic reticulum.** *Journal of Biological Chemistry*, 249:2357-2365, 1974.

INESI, G. **Mechanism of calcium transport.** *Annual Review of Physiology*, 47:573-601, 1985.

INESI, G., KURZMACK, M., COAN, C., LEWIS, D.E. **Cooperative calcium binding and ATPase activation in sarcoplasmic reticulum vesicles.** *Journal of Biological Chemistry*, 255:3025-3031, 1980.

ISMAIL-BEIGI, F. **Regulation of Na⁺-K⁺-ATPase expression by thyroid hormone.** *Seminars in Nephrology*, 12:44-48, 1992.

ISMAIL-BEIGI, F., HABER, R.S., LOEB, J.N. **Stimulation of active Na⁺ and K⁺ transport by thyroid hormone in a rat liver cell line: role of enhanced Na⁺ entry.** *Endocrinology*, 119:2527-2536, 1986.

ITO, K., YAN, X., FENG, X., MANNING, W.J., DILLMANN, W.H., LORELL, B.H. **Transgenic expression of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase modifies the transition from hypertrophy to early heart failure.** *Circulation Research*, 89:422-429, 2001.

JAMES, P., INUI, M., TADA, M., CHIESI, M., CARAFOLI, E. **Nature and site of phospholamban regulation of the Ca²⁺ pump of sarcoplasmic reticulum.** *Nature*, 342:90-92, 1989.

JANSEN, J., FRIESEMA, E.C., MILICI, C., VISSER, T.J. **Thyroid hormone transporters in health and disease.** *Thyroid*, 15:757-768, 2005.

JANSKÝ, L. **Non-shivering thermogenesis and its thermoregulatory significance.** *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 48:85-132, 1973.

JIANG, M., XU, A., TOKMAKEJIAN, S., NARAYANAN, N. **Thyroid hormone-induced overexpression of functional ryanodine receptors in the rabbit heart.** *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 278:H1429-H1438, 2000.

JORGENSEN, A.O., KALNINS, V., MACLENNAN, D.H. **Localization of sarcoplasmic reticulum proteins in rat skeletal muscle by immunofluorescence.** *The Journal of Cell Biology* 80:372-384, 1979.

JUNQUEIRA, L.C. e CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, Editora Guanabara, 488 p, 2004.

KAHALY, G.J. e DILLMANN, W.H. **Thyroid hormone action in the heart.** *Endocrine Reviews*, 26:704-728, 2005.

KIMURA, Y., OTSU, K., NISHIDA, K., KUZUYA, T., TADA, M. **Thyroid hormone enhances Ca²⁺ pumping activity of the cardiac sarcoplasmic reticulum by increasing Ca²⁺ ATPase and decreasing phospholamban expression.** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 26:1145-1154, 1994.

KING-JONES, K. e THUMMEL, C.S. **Nuclear receptors - a perspective from *Drosophila*.** *Nature Reviews Genetics*, 6:311-323, 2005.

KINUGAWA, K., YONEKURA, K., RIBEIRO, R.C., ETO, Y., AOYAGI, T., BAXTER, J.D., CAMACHO, S.A., BRISTOW, M.R., LONG, C.S., SIMPSON, P.C. **Regulation of thyroid hormone receptor isoforms in physiological and pathological cardiac hypertrophy.** *Circulation Research*, 89:591-598, 2001.

KISS, E., JAKAB, G., KRANIAS, E.G., EDES, I. **Thyroid hormone-induced alterations in phospholamban protein expression. Regulatory effects on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport and myocardial relaxation.** *Circulation Research*, 75:245-251, 1994.

KLEIN, I. e DANZI, S. **Thyroid disease and the heart.** *Circulation*, 116:1725-1735, 2007.

KLEIN, I. e HONG, C. **Effects of thyroid hormone on cardiac size and myosin content of the heterotopically transplanted rat heart.** *The Journal of Clinical Investigation*, 77:1694-1698, 1986.

KLEIN, I. e OJAMAA, K. **Thyroid hormone and the cardiovascular system.** The New England Journal of Medicine, 344:501-509, 2001.

KRANIAS, E.G. **Regulation of Ca^{2+} transport by cyclic 3',5'-AMP-dependent and calcium-calmodulin-dependent phosphorylation of cardiac sarcoplasmic reticulum.** Biochimica et Biophysica Acta, 844:193-199, 1985.

KÜHLBRANDT, W. **Biology, structure and mechanism of P-type ATPases.** Nature Reviews Molecular Cell Biology, 5:282-295, 2004.

LANDSBERG, L., SAVILLE, M.E., YOUNG, J.B. **Sympathoadrenal system and regulation of thermogenesis.** American Journal of Physiology, 247:E181-E189, 1984.

LAZAR, M.A. e CHIN, W.W. **Nuclear thyroid hormone receptors.** The Journal of Clinical Investigation, 86:1777-1782, 1990.

LEVITZKI, A. **From epinephrine to cyclic AMP.** Science 241:800-806, 1988.

LIPMANN, F. **Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy.** Advanced Enzymology, 1: 99–162, 1941.

LOWELL, B.B. e SPIEGELMAN, B.M. **Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis.** Nature, 404:652-660, 2000.

LYTTON, J. e MACLENNAN, D.H. **Molecular cloning of cDNAs from human kidney coding for two alternatively spliced products of the cardiac Ca^{2+} -ATPase gene.** Journal of Biological Chemistry, 263:15024-15031, 1988.

LYTTON, J., WESTLIN, M., BURK, S.E., SHULL, G.E., MACLENNAN, D.H. **Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps.** Journal of Biological Chemistry, 267:14483-14489, 1992.

MACLENNAN, D.H. e KRANIAS, E.G. **Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility.** Nature Reviews Molecular Cell Biology, 4:566-577, 2003.

MACLENNAN, D.H. **Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum.** Journal of Biological Chemistry, 245:4508-4518, 1970.

MACLENNAN, D.H., ASAHI, M., TUPLING, A.R. **The regulation of SERCA-type pumps by phospholamban and sarcolipin.** Annals of the New York Academy of Sciences, 986:472-480, 2003.

MACLENNAN, D.H., BRANDL, C.J., KORCZAK, B., GREEN, N.M. **Amino-acid sequence of a Ca^{2+} + Mg^{2+} -dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence.** Nature, 316:696-700, 1985.

MACLENNAN, D.H., TOYOFUKU, T., LYTTON, J. **Structure-function relationships in sarcoplasmic or endoplasmic reticulum type Ca^{2+} pumps.** Annals of the New York Academy of Sciences, 671:1-10, 1992.

MAKINOSE, M. **Calcium efflux dependent formation of ATP from ADP and orthophosphate by the membranes of the sarcoplasmic vesicles.** FEBS Letters, 12:269-270, 1971.

MAKINOSE, M. e HASSELBACH, W. **ATP synthesis by the reverse of the sarcoplasmic calcium pump.** FEBS Letters, 12:271-272, 1971.

MAKINOSE, M. **Phosphoprotein formation during osmo-chemical energy conversion in the membrane of the sarcoplasmic reticulum.** FEBS Letters, 25:113-115, 1972.

MEISSNER, G. e FLEISCHER, S. **Characterization of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle.** Biochimica et Biophysica Acta, 241:356-378, 1971.

MILLS, E.M., BANKS, M.L., SPRAGUE, J.E., FINKEL, T. **Pharmacology: uncoupling the agony from ecstasy.** Nature, 426:403-404, 2003.

MINAMISAWA, S., UEMURA, N., SATO, Y., YOKOYAMA, U., YAMAGUCHI, T., INOUE, K., NAKAGOME, M., BAI, Y., HORI, H., SHIMIZU, M., MOCHIZUKI, S., ISHIKAWA, Y. **Post-transcriptional downregulation of sarcolipin mRNA by triiodothyronine in the atrial myocardium.** FEBS Letters, 580:2247-2252, 2006.

MITIDIERI, F. e DE MEIS, L. **Ca^{2+} release and heat production by the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase of blood platelets. Effect of the platelet activating factor.** Journal of Biological Chemistry, 274:28344-28350, 1999.

MØLLER, J.V., JUUL, B., LE MAIRE, M. **Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases.** Biochimica et Biophysica Acta, 1286:1-51, 1996.

MONTERO-LOMELI, M. e DE MEIS, L. **Glucose 6-phosphate and hexokinase can be used as an ATP-regenerating system by the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum.** Journal of Biological Chemistry, 267:1829-1833, 1992.

MORENO, M., LANNI, A., LOMBARDI, A., GOGLIA, F. **How the thyroid controls metabolism in the rat: different roles for triiodothyronine and diiodothyronines.** The Journal of Physiology, 505:529-538, 1997.

MUTVEI, A., HUSMAN, B., ANDERSSON, G., NELSON, B.D. **Thyroid hormone and not growth hormone is the principle regulator of mammalian mitochondrial biogenesis.** Acta Endocrinologica, 121:223-228, 1989.

MYNATT, R.L., PARK, E.A., THORNGATE, F.E., DAS, H.K., COOK, G.A. **Changes in carnitine palmitoyltransferase-I mRNA abundance produced by hyperthyroidism and hypothyroidism parallel changes in activity.** Biochemical and Biophysical Research Communications, 201:932-937, 1994.

NABAUER, M., CALLEWAERT, G., CLEEMANN, L., MORAD, M. **Regulation of calcium release is gated by calcium current, not gating charge, in cardiac myocytes.** *Science*, 244:800-803, 1989.

NAYAK, B. e HODAK, S.P. **Hyperthyroidism.** *Endocrinology Metabolism Clinics of North America*, 36:617-656, 2007.

NEEDHAM, D.M. **Red and white muscle.** *Physiological Reviews*, 6: 1 - 27, 1926.

NELSON, N. e HARVEY, W.R. **Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetriphosphatases.** *Physiological Reviews*, 79:361-385, 1999.

NELSON, N. **Organellar proton-ATPases** *Current Opinion in Cell Biology*, 4:654-660, 1992.

NICHOLLS, D.G. e LOCKE, R.M. **Thermogenic mechanisms in brown fat.** *Physiological Reviews*, 64:1-64, 1984.

ODERMATT, A., BECKER, S., KHANNA, V.K., KURZYDLOWSKI, K., LEISNER, E., PETTE, D., MACLENNAN, D.H. **Sarcolipin regulates the activity of SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase.** *Journal of Biological Chemistry*, 273:12360-12369, 1998.

ODERMATT, A., TASCHNER, P.E., SCHERER, S.W., BEATTY, B., KHANNA, V.K., CORNBLATH, D.R., CHAUDHRY, V., YEE, W.C., SCHRANK, B., KARPATI, G., BREUNING, M.H., KNOERS, N., MACLENNAN, D.H. **Characterization of the gene encoding human sarcolipin (SLN), a proteolipid associated with SERCA1: absence of structural mutations in five patients with Brody disease.** *Genomics*, 45:541-553, 1997.

PACHUCKI, J., HOPKINS, J., PEETERS, R., TU, H., CARVALHO, S.D., KAULBACH, H., ABEL, E.D., WONDISFORD, F.E., INGWALL, J.S., LARSEN, P.R. **Type 2 iodothyronin deiodinase transgene expression in the mouse heart causes cardiac-specific thyrotoxicosis.** *Endocrinology*, 142:13-20, 2001.

PETTE, D. **The adaptive potential of skeletal muscle fibers.** *Canadian Journal of Applied Physiology*. 27:423-448, 2002.

POLIKAR, R., BURGER, A.G., SCHERRER, U., NICOD, P. **The thyroid and the heart.** *Circulation*, 87:1435-1441, 1993.

PORTMAN, M.A. **Thyroid hormone regulation of heart metabolism.** *Thyroid*, 18(2):217-225, 2008.

PRIESTMAN, D.A., DONALD, E., HOLNESS, M.J., SUGDEN, M.C. **Different mechanisms underlie the long-term regulation of pyruvate dehydrogenase kinase (PDHK) by tri-iodothyronine in heart and liver.** *FEBS Letters*, 419:55-57, 1997.

RAMOS, R.C. e DE MEIS, L. **Glucose 6-phosphate and fructose 1,6-bisphosphate can be used as ATP-regenerating systems by cerebellum Ca²⁺-transport ATPase.** *Journal of Neurochemistry*, 72:81-86, 1999.

RAMOS, R.S., CALDEIRA, M.T., ARRUDA, P., DE MEIS, L. **The Two Km's for ATP of Corn-Root H⁺-ATPase and the Use of Glucose-6-Phosphate and Hexokinase as an ATP-Regenerating System.** *Plant Physiology*, 105:853-859, 1994.

REED, T.D., BABU, G.J., JI, Y., ZILBERMAN, A., VER HEYEN, M., WUYTACK, F., PERIASAMY, M. **The expression of SR calcium transport ATPase and the Na⁺/Ca²⁺ Exchanger are antithetically regulated during mouse cardiac development and in Hypo/hyperthyroidism.** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 32:453-464, 2000.

REIS, M., FARAGE, M., DE MEIS, L. **Thermogenesis and energy expenditure: control of heat production by the Ca²⁺-ATPase of fast and slow muscle.** *Molecular Membrane Biology*, 19:301-310, 2002.

ROBERTS, C.G. e LADENSON, P.W. **Hypothyroidism.** *Lancet*, 363:793-803, 2004.

ROMERO, P.J. e DE MEIS, L. **Role of water in the energy of hydrolysis of phosphoanhydride and phosphoester bonds.** *Journal of Biological Chemistry*, 264:7869-7873, 1989.

SAYEN, M.R., ROHRER, D.K., DILLMANN, W.H. **Thyroid hormone response of slow and fast sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase mRNA in striated muscle.** *Molecular and Cellular Endocrinology*, 87:87-93, 1992.

SCHIAFFINO, S. e REGGIANI, C. **Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance.** *Physiological Reviews*, 76:371-423, 1996.

SCHNEIDER, M.F. e CHANDLER, W.K. **Voltage dependent charge movement of skeletal muscle: A possible step in excitation–contraction coupling.** *Nature*, 242: 244-246, 1973.

SEKERIS, C.E. **The mitochondrial genome: a possible primary site of action of steroid hormones.** *In vivo* 4, 316–320, 1990.

SILVA, J.E. **The thermogenic effect of thyroid hormone and its clinical implications.** *Annals of Internal Medicine*, 139:205-213, 2003.

SILVA, J.E. **Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation.** *Physiological Reviews*, 86:435-464, 2006.

SILVA, J.E. **Thyroid hormone and the energetic cost of keeping body temperature.** *Bioscience Reports*, 25:129-148, 2005.

SIMMERMAN, H.K. e JONES, L.R. **Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function.** *Physiological Reviews*, 78:921-947, 1998.

SIMONIDES, W.S. e VAN HARDEVELD, C. **Identification and quantification in single muscle fibers of four isoforms of parvalbumin in the iliofibularis muscle of *Xenopus laevis*.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 998:137-144, 1989.

SIMONYAN, R.A., JIMENEZ, M., CEDDIA, R.B., GIACOBINO, J.P., MUZZIN, P., SKULACHEV, V.P. **Cold-induced changes in the energy coupling and the UCP3 level in rodent skeletal muscles.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1505:271-279, 2001.

STOCKDALE, F.E. **Mechanisms of formation of muscle fiber types.** *Cell Structure and Function*, 22:37-43, 1997.

SUGDEN, M.C., LANGDOWN, M.L., HARRIS, R.A., HOLNESS, M.J. **Expression and regulation of pyruvate dehydrogenase kinase isoforms in the developing rat heart and in adulthood: role of thyroid hormone status and lipid supply.** *Biochemical Journal*, 352:731-738, 2000.

TADA, M. e KADOMA, M. **Regulation of the Ca²⁺ pump ATPase by cAMP-dependent phosphorylation of phospholamban.** *Bioessays*, 10:157-163, 1989.

TANFORD, C. **Twenty questions concerning the reaction cycle of the sarcoplasmic reticulum calcium pump.** *Critical Reviews in Biochemistry*, 17:123-151, 1984.

TOYOSHIMA, C. e NOMURA, H. **Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium.** *Nature*, 418:605-611, 2002.

TUPLING, A.R., ASAHI, M., MACLENNAN, D.H. **Sarcolipin overexpression in rat slow twitch muscle inhibits sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and impairs contractile function.** *Journal of Biological Chemistry*, 277:44740-44746, 2002.

VANGHELUWE, P., SCHUERMANS, M., ZÁDOR, E., WAELKENS, E., RAEYMAEKERS, L., WUYTACK, F. **Sarcolipin and phospholamban mRNA and protein expression in cardiac and skeletal muscle of different species.** *Biochemical Journal*, 389:151-159, 2005.

VERBOOMEN, H., WUYTACK, F., DE SMEDT, H., HIMPENS, B., CASTEELS, R. **Functional difference between SERCA2a and SERCA2b Ca²⁺ pumps and their modulation by phospholamban.** *Biochemical Journal*, 286:591-595, 1992.

VERBOOMEN, H., WUYTACK, F., VAN DEN BOSCH, L., MERTENS, L., CASTEELS, R. **The functional importance of the extreme C-terminal tail in the gene 2 organellar Ca²⁺-transport ATPase (SERCA2a/b).** *Biochemical Journal*, 303:979-984, 1994.

VIANNA, A.L. **Interaction of calcium and magnesium in activating the nucleoside triphosphate of the sarcoplasmic reticulum.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 410: 389-406, 1975.

WAGNER, M.S., MORIMOTO, R., DORA, J.M., BENNEMAN, A., PAVAN, R., MAIA, A.L. **Hypothyroidism induces type 2 iodothyronine deiodinase expression in mouse heart and testis.** *Journal of Molecular Endocrinology*, 31:541-550, 2003.

WASSEN, F.W., SCHIEL, A.E., KUIPER, G.G., KAPTEIN, E., BAKKER, O., VISSER, T.J., SIMONIDES, W.S. **Induction of thyroid hormone-degrading deiodinase in cardiac hypertrophy and failure.** *Endocrinology*, 143:2812-2815, 2002.

- WRUTNIAK-CABELLO, C., CASAS, F., CABELLO, G. **Thyroid hormone action in mitochondria.** *Journal of Molecular Endocrinology*, 26:67-77, 2001.
- WRUTNIAK-CABELLO, C., CASAS, F., CABELLO, G., **The direct triiodothyronine mitochondrial pathway: science mythology?** *Thyroid* 10, 965–969, 2000.
- WU, K.D., LEE, W.S., WEY, J., BUNGARD, D., LYTTON, J. **Localization and quantification of endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform transcripts.** *The American Journal of Physiology*, 269:C775-C784, 1995.
- WU, Y. e KOENIG, R.J. **Gene regulation by thyroid hormone.** *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 11:207-211, 2000.
- WUYTACK, F., RAEYMAEKERS, L., MISSIAEN, L. **Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps.** *Cell Calcium*, 32(5-6):279-305, 2002.
- YAMAMOTO, T. e TONOMURA, Y. **Reaction mechanism of the Ca²⁺ -dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. I. Kinetic studies.** *The Journal of Biochemistry*, 62:558-575, 1967.
- YEN, P.M. **Physiological and molecular basis of thyroid hormone action.** *Physiological Reviews*, 81:1097-1142, 2001.
- YU, X. e INESI, G. **Variable stoichiometric efficiency of Ca²⁺ and Sr²⁺ transport by the sarcoplasmic reticulum ATPase.** *Journal of Biological Chemistry*, 270:4361-4367, 1995.
- ZHANG, J. e LAZAR, M.A. **The mechanism of action of thyroid hormones.** *Annual Review of Physiology*, 62:439-466, 2000.
- ZIERATH, J.R. e HAWLEY, J.A. **Skeletal Muscle Fiber Type: Influence on Contractile and Metabolic Properties** *PLoS Biology*, 2:1523-1527, 2004.
- ZOT, A.S. e POTTER, J.D. **Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction.** *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 16:535-559, 1987.
- ZURLO, F., LARSON, K., BOGARDUS, C., RAVUSSIN, E. **Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure.** *The Journal of Clinical Investigation*, 86:1423-1427, 1990.

7 – CURRICULUM VITAE

Dados Pessoais

Nome Completo: Luísa Andrea Ketzer

Data de Nascimento: 23/04/1981

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Três Passos, RS

Formação Acadêmica/Titulação

1999 – 2002 Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura Plena, Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, RS Brasil.

2003 – 2004 Mestre em Bioquímica Toxicológica - Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria. Desenvolvido na Divisão de Farmacologia da Coordenação de Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (INCA/RJ).

2004 - 2008 Doutorado em Química Biológica no Instituto de Bioquímica Médica – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Orientação Concluída

- Trabalho de Conclusão do Curso de Bacharelado em Biomedicina (Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO) intitulado “Estudo da metilação de selenocompostos pela tiopurina metiltransferase”, defendido pelo aluno Jeter Isaac Araújo Pinto, em dezembro de 2004.

Artigos completos publicados em periódicos

- ARRUDA, A.P., **KETZER, L.A.**, NIGRO, M., GALINA, A., CARVALHO, D.P., DE MEIS, L. Cold tolerance of normal and hypothyroid rabbits: role of mitochondria respiration na sarcoplasmic reticulun Ca^{2+} -ATPase. *Endocrinology* (2008).
- **KETZER, L. A.**, DE MEIS, L. Heat production by skeletal muscles of rats and rabbits and utilization of glucose 6-phosphate as ATP regenerative system by rats and rabbits heart Ca^{2+} -ATPase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 369:265–269, 2008.
- ROSSATO, J. I., **KETZER, L. A.**, CENTURIAO, F. B., SILVA, S., LUDTKE, D. S., ZENI, G., BRAGA, A. L., RUBIN, M. A., ROCHA, J. B. T. Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochemical Research*, 27:297-303, 2002.

Artigo completo submetido:

- **KETZER, L.A.**, ARRUDA, A.P., CARVALHO, D.P., DE MEIS, L. Modulation of cardiac bioenergetics by thyroid hormone and cold exposure: role of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and mitochondrial respiration. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* (2008)

Comunicação em Congresso:

- 14 comunicações em congressos nacionais
- 4 comunicações em congressos internacionais

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)