RAFAEL VIANNA CROFFI

Bases moleculares das ações rápidas do T3 na captação de glicose em célula adiposa 3T3-L1

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

São Paulo
2015

Rafael Vianna Croffi

Bases moleculares das ações rápidas do T3 na captação de glicose em célula adiposa 3T3-L1

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza Nunes

Versão original

São Paulo
2015

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

reprodução não autorizada pelo autor

Croffi, Rafael Vianna.
Bases moleculares das ações rápidas do T3 na captação de glicose em célula adiposa 3T3-L1 / Rafael Vianna Croffi. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Maria Tereza Nunes.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Regulação hormonal da expressão gênica.

Versão do título para o inglês: Molecular basis of rapid T3 actions on glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes.

1. Hormônio tireoidiano 2. Captação de glicose 3. Ação não-genômica 4. Vias de sinalização intracelulares 5. Adipócito 6. 3T3-L1 I. Nunes, Profa. Dra. Maria Tereza II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB07/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Rafael Vianna Croffi.

Título da Tese: Bases moleculares das ações rápidas do T3 na captação de glicose em célula adiposa 3T3-L1.

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Tereza Nunes.

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

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° **552/12** referente ao projeto intitulado: "*Bases moleculares das ações rápidas do T3 na captação da glicose em célula muscular esquelética e adiposa*" sob a responsabilidade de **Rafael Vianna Croffi,** foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH-COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 18 de setembro de 2012.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Aos meus pais, que sempre me apoiam em todos os sentidos.

AGRADECIMENTOS

À Capes, o apoio financeiro.

À Professora Maria Tereza, a orientação desde a Iniciação Científica.

À Lhô, o apoio técnico e a parceria na bancada.

À Jazinha, que esteve ao meu lado nesse período.

Aos amigos Fred e Lucas, aos colegas do laboratório e a todos que colaboraram de alguma forma com esse trabalho.

“O importante é não parar de questionar.
A curiosidade tem sua própria razão de existir.”
Albert Einstein

RESUMO

Croffi RV. Bases moleculares das ações rápidas do T3 na captação de glicose em célula adiposa 3T3-L1. [Tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Os hormônios tireoidianos atuam sobre o metabolismo dos diversos tecidos do organismo e participam da regulação do consumo de glicose pelas células. Estudos da literatura e do nosso laboratório já evidenciaram que o T3 atua, dependendo do tipo celular, aumentando a expressão de algumas isoformas dos transportadores de glicose (GLUTs) e/ou a translocação do GLUT4 para a membrana plasmática (MP), além de aumentar, também, a captação de glicose (CGlic) por algumas células em poucos minutos. Os mecanismos envolvidos nessas ações rápidas do T3, contudo, ainda não estão bem esclarecidos. O objetivo do presente estudo foi investigar as possíveis vias de sinalização envolvidas na ação aguda do T3 sobre a CGlic em células adiposas 3T3-L1. A análise da CGlic foi feita através do ensaio de captação de 2-deoxi-D-glicose radioativa (2-DG). A participação das proteínas envolvidas nas vias de sinalização foi analisada usando inibidores farmacológicos e pela técnica de *Western Blotting*. Nossos resultados demonstraram que o T3 promove um aumento rápido e passageiro na CGlic, com pico aos 10 min, retornando aos níveis do controle após 30 minutos de incubação das células com o hormônio. Os dados também sugerem que essa ação do T3 depende, pelo menos, de duas vias de sinalização. Uma delas envolve a ativação das proteínas Src, PI3K e Akt, nessa ordem. A outra, aparentemente, é iniciada na membrana plasmática, possivelmente a partir da integrina αVβ3.

Palavras-chave: Hormônio tireoidiano. Captação de glicose. Ação não-genômica. Vias de sinalização intracelulares. Adipócitos. Células 3T3-L1.

ABSTRACT

Croffi RV. Molecular basis of rapid T3 actions on glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. [Ph. D. Thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Thyroid hormones act on metabolism of many tissues and participate in the regulation of glucose consumption by the cells. Studies from this and other laboratories have demonstrated in some cell types that T3 increases, in a short period of time (minutes), the expression of some glucose transporter (GLUTs) isoforms and GLUT4 translocation to the plasma membrane, leading to an improvement of glucose uptake (Gluptake). However, the mechanisms involved in these T3 actions are still not clear. The aim of this study was to investigate the possible signaling pathways involved in the acute T3 action on Gluptake in 3T3-L1 adipocytes. The Gluptake analysis was performed by radioactive 2-deoxy-D-glucose (2-DG) uptake assay. The involvement of proteins in signaling pathways was assessed by using pharmacological inhibitors and Western Blotting technique. Our results have shown that T3 increases Gluptake with a peak at 10 min returning to the control level after 30 min of the cell incubation with the hormone. The data also suggest that this action depends on at least two parallel signaling pathways. One involves the activation of Src, PI3K and Akt proteins, while the other involves another mechanism triggered by T3, apparently, from the plasma membrane at αVβ3 integrin.

Keywords: Thyroid hormone. Glucose uptake. Non-genomic action. Intracellular signaling pathways. Adipocytes. 3T3-L1 cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Curva tempo-resposta do T3 sobre a captação de 2-DG 25
Figura 2 – Efeito do T3 sobre a fosforilação da Akt 26
Figura 3 - Efeito do T3 sobre a CGlic pelas células previamente tratadas com Wortmannin 27
Figura 4 - Efeito do T3 sobre a fosforilação da Akt em células previamente tratadas com Wortmannin 28
Figura 5 - Efeito do T3 sobre a CGlic pelas células previamente tratadas com Akti1/2 29
Figura 6 - Efeito do T3 sobre a CGlic pelas células previamente tratadas com RGD 30
Figura 7 - Efeito do T3 sobre a fosforilação da Akt em células previamente tratadas com RGD 32
Figura 8 - Efeito do T3 sobre a CGlic pelas células previamente tratadas com Tetrac 33
Figura 9 - Efeito do T3 sobre a fosforilação da Akt em células previamente tratadas com PP2 34
Figura 10 - Efeito do T3 sobre a CGlic pelas células previamente tratadas com PP2 35
Figura 11 - Efeito do T3 sobre a fosforilação da Src em células previamente tratadas com PP2 36
Figura 12 - Efeito do T3 sobre a fosforilação da Src em células previamente tratadas com RGD 37
Figura 13 - Efeito do T3 sobre a fosforilação da Src em células previamente tratadas com Wortmannin 38
Figura 14 - Efeito do T3 sobre a CGlic pelas células previamente tratadas com Colchicina 40
Figura 15 - Resumo do mecanismo proposto para ação do T3 sobre a captação de 2-DG em células 3T3-L1 46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13
1.1 Hormônios tireoidianos 13
1.2 Mecanismos de ação 14
1.2.1 Ações genômicas 14
1.2.2 Ações não-genômicas 15
1.3 A captação de glicose 16
1.3.1 Sinalização da Insulina 17
1.3.2 Sinalização da AMPK 19
1.4 Hormônio tireoidiano e captação de glicose 20
1.5 Objetivos 21
2 MATERIAL E MÉTODOS 22
2.1 Reagentes 22
2.2 Cultivo das células 3T3-L1 22
2.3 Ensaio de captação de 2-deoxi-D-glicose (2-DG) radioativa 23
2.4 Análise de proteínas 23
2.5 Análise estatística 24
3 RESULTADOS 25
3.1 Efeito do T3 sobre a captação de 2-DG (CGlic) pelas células 3T3-L1: Curva tempo-resposta 25
3.2 Efeito do T3 sobre a fosforilação da proteína Akt: Curva tempo-resposta 26
3.3 Efeito do T3 sobre a captação de 2-DG em células 3T3-L1 previamente submetidas a bloqueio da PI3K 26
3.4 Efeito do T3 sobre a fosforilação da Akt em células 3T3-L1 previamente submetidas a bloqueio da PI3K 28
3.5 Efeito do T3 sobre a captação de 2-DG (CGlic) em células 3T3-L1 previamente submetidas a bloqueio da Akt 29
3.6 Avaliação dos efeitos do T3 em células 3T3-L1 previamente submetidas a bloqueio da integrina αVβ3 30
3.6.1 Efeito do RGD sobre a captação de 2-DG estimulada por T3 30
3.6.2 Efeito do RGD sobre a fosforilação da Akt estimulada por T3 31
3.6.3 Efeito do Tetrac sobre a captação de 2-DG estimulada por T3 33
3.7 Avaliação dos efeitos do T3 em células 3T3-L1 após bloqueio da Src 34

3.7.1 Efeito sobre a fosforilação da Akt 34
3.7.2 Efeito sobre a captação de 2-DG 35
3.8 Efeito do T3 sobre a fosforilação da proteína Src 36
3.8.1 Ação do T3 sobre a fosforilação da Src após bloqueio da integrina αVβ3 37
3.8.2 Ação do T3 sobre a fosforilação da Src após bloqueio da PI3K 38
3.9 Avaliação da captação de 2-DG pelas células 3T3-L1 após bloqueio da formação de microtúbulos 39
4 DISCUSSÃO 41
5 CONCLUSÃO 45
REFERÊNCIAS 47

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hormônios tireoidianos

O primeiro hormônio produzido pela tireoide a ser identificado foi a tiroxina ou 3,5,3',5'-tetraiodotironina (T4). Posteriormente, foi demonstrado que a 3,5,3'-triiodotironina (T3) também é produzido por essa glândula, e que possui maior atividade biológica, comparado ao T4 (1-3). Cerca de duas décadas depois foi demonstrado que tecidos extratireoidianos eram capazes de gerar T3 a partir de T4 (4), e que aproximadamente 80% do T3 que se encontra na circulação são produzidos em tecidos periféricos a partir da 5' desiodação do T4, passando este, então, a ser considerado um pró-hormônio (5, 6). Sabe-se hoje que essa desiodação é realizada por três diferentes isoformas de desiodases (D1, D2 e D3), que contêm em seus núcleos ativos o aminoácido raro selenocisteína (7-9). Resumidamente, D1 e D2 são responsáveis por "ativar" o T4, convertendo-o a T3, e a D3 é capaz de "inativar" T4 e T3 convertendo-os à 3,3',5'-T3 (T3 reverso, rT3) e 3,3'-diiodotironina (T2), respectivamente.

A regulação da síntese e secreção dos hormônios tireoidianos (HTs) ocorre, principalmente, por meio do hormônio tirotrofina ou hormônio estimulador da tireoide (TSH, ***t****hyroid-****s****timulating* ***h****ormone*), produzido pela adeno-hipófise, o qual atua na tireoide ativando processos que incluem desde seu crescimento a praticamente todos os passos envolvidos na produção e secreção dos HTs (10). O TSH, por sua vez, é regulado positivamente pelo hormônio liberador de tirotrofina (TRH, ***t****hyrotropin-****r****eleasing* ***h****ormone*) e negativamente pela somatostatina (SS) produzidos pelo hipotálamo, sendo o TSH e TRH regulados negativamente, e a SS positivamente pelos HTs circulantes. Esse mecanismo de regulação do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide é conhecido como *feedback* negativo e garante, em indivíduos saudáveis, uma produção constante e adequada de HTs (11, 12).

1.2 Mecanismos de ação

1.2.1 Ações genômicas

Os HTs influenciam o crescimento e diferenciação dos vertebrados e participam do controle metabólico e energético do organismo regulando o consumo de oxigênio e modulando a síntese/degradação de proteínas, lípides e carboidratos nos diferentes tecidos. Tais ações são reguladas de maneira particular em cada órgão ou tecido pela interação do HT com seus receptores nucleares, o que leva à alterações na transcrição de genes específicos (13).

O receptor de hormônio tireoidiano (TR, ***t****hyroid hormone* ***r****eceptor*) encontra-se associado a sequências específicas na região promotora de diversos genes alvos dos HTs, chamadas elementos responsivos ao HT (TREs, ***t****hyroid hormone* ***r****esponse* ***e****lements*). Os TRs fazem parte de uma superfamília de receptores nucleares que são fatores transcricionais dependentes de ligante e, quando ligados aos TREs, estão sob a forma de homo ou heterodímeros com outros membros dessa superfamília. Aos TRs também se ligam proteínas co-repressoras da transcrição gênica. Essa configuração mantém uma repressão basal de diversos genes e, quando o T3 se liga ao TR, ocorre heterodimerização principalmente com os receptores de retinoide X (RXRs), dissociação dos co-repressores e associação de co-ativadores com consequente aumento na transcrição gênica (13, 14). A ativação desses mecanismos leva horas para ocorrer e pode se prolongar por vários dias.

Os TRs ligam-se ao T3 com muito mais afinidade do que ao T4 e são produzidos por dois genes localizados em cromossomos distintos, que são os TRα e TRβ. O gene do TRα, através de diferentes *splices*, gera o TRα1, TRα2 e TRα3, além de outras isoformas truncadas. Desses três, apenas o TRα1 é capaz de ligar T3. O gene do TRβ também gera três isoformas, TRβ1, 2 e 3. Nesse caso, as três são capazes de ligar o T3. Cada isoforma de TR é expressa diferentemente nos diversos tipos celulares e regula a transcrição de genes de maneira distinta, sendo esse um dos motivos pelo qual o T3 promove ações tecido-específicas (15).

Como visto, as ações genômicas dependem da presença do T3 no núcleo celular, bem como do TR junto a fatores transcricionais associados aos TREs. Porém, os HTs não são capazes de atravessar a membrana plasmática de forma passiva e

dependem da presença de transportadores de membrana para entrar nas células. O transportador de monocarboxilato 8 (MCT8) foi identificado como o transportador específico para HTs e mutações em seu gene causam a síndrome de Allan-Herndon-Dudley, com grave retardo mental e disfunção tireoidiana. Outros transportadores de HTs estão descritos na literatura, como o MCT10, os transportadores tipo L de aminoácido (LAT1 e 2) e vários membros da família dos transportadores de ânions orgânicos (OATPs), mas esses transportam outras moléculas além dos HTs (16-18). Os transportadores permitem, também, a saída dos HTs da célula e, em conjunto com as desiodases, regulam a disponibilidade de T3 intracelular em cada tecido, além da concentração basal de T3 circulante (9).

1.2.2 Ações não-genômicas

Além das clássicas ações genômicas, descritas anteriormente, nas últimas décadas vem sendo relatadas várias ações dos HTs que não dependem da interação do hormônio com o TR nuclear associado aos TREs. Tais ações foram classificadas como não-genômicas e podem ser iniciadas em receptores de membrana, bem como em isoformas de TRα e TRβ citoplasmáticas. Essas ações podem ser desencadeadas não apenas pelo T3, mas também por T4, rT3 e T2, ativando vias de sinalização citoplasmáticas em poucos minutos, que muitas vezes culminam em fosforilação e translocação de fatores transcricionais para o núcleo, o que promove, posteriormente, a modulação da expressão gênica (19, 20). Há evidências de ações não-genômicas dos HTs, por exemplo: ativando o fluxo de íons na membrana plasmática (21-24); sobre a atividade da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA) (25); em organelas como a mitocôndria (26); sobre a polimerização da actina do citoesqueleto de células gliais (27), ósseas (28) e hipofisárias (29, 30).

A hipótese de que algumas ações não-genômicas dos HTs seriam iniciadas na membrana plasmática tem sido fomentada desde o final da década de setenta (31-34). Tais evidências foram demonstradas pelo uso do T3 ou T4, ambos ligados covalentemente a substâncias como, por exemplo, a agarose. Essa ligação impede a entrada do hormônio na célula, porém, ainda assim, é possível reproduzir seus efeitos (35-39). Além disso, a tripsinização extracelular de proteínas da membrana plasmática prejudicou algumas ações do T3, corroborando a hipótese da presença de receptores de HT nessa estrutura (40). Em 2005, Bergh e colaboradores identificaram a integrina

de membrana αVβ3 como sendo o receptor de membrana para os HTs. Eles demonstraram que um peptídeo contendo a sequência Arg-Gly-Asp (RGD) e o ácido tetraiodotiroacético (Tetrac) impedem a ligação do T4 com a integrina, com consequente bloqueio da ativação da MAPK (ERK1/2) e angiogênese pelo T4 (41). Posteriormente, foi mostrado que existem dois sítios de ligação dos HTs na integrina αVβ3. Um deles (S1), liga exclusivamente o T3 e ativa, através da cinase Src, a enzima PI3K. O outro (S2), liga o T4 com maior afinidade do que o T3 e ativa a via da MAPK (ERK1/2). O Tetrac bloqueia ambos os sítios e o RGD bloqueia principalmente o S1 (42). Mais recentemente, foi evidenciado que o T3 ativa, via Src, ambas as vias PI3K e ERK1/2, o que leva ao aumento da atividade da Na-K-ATPase, apesar de não ter sido estudado por qual receptor o T3 iniciou essa ação (43).

Ao mesmo tempo, alguns estudos mostraram que o TRβ podia se apresentar entre o núcleo e o citoplasma (44, 45), e em seguida, outros trabalhos evidenciaram ações não-genômicas dos HTs envolvendo o TRα e TRβ. Foi demonstrado que em fibroblasto humano o TRβ1 citoplasmático pode se ligar à subunidade regulatória p85 da PI3K e ser ativado rapidamente pelo T3, o que leva à transcrição de alguns genes (46, 47). Além disso, também foi relatado a existência, no TRβ1, de um sítio de interação com a MAPK (ERK1/2) e que a ativação desta pelo T4 levaria à translocação do TR para o núcleo (48, 49). Outro trabalho mostrou que em célula endotelial o T3 promove ligação da p85 ao TRα1, ativando proteínas *downstream* na via de sinalização da PI3K, como a GSK-3β e eNOS (50). Em astrócitos, o T4 e rT3, mas não o T3, promovem a polimerização da actina em apenas 20 min (27). Como os astrócitos expressam basicamente as isoformas truncadas do TRα (TRΔα1 e 2) (51, 52), e essas não possuem o domínio de ligação ao DNA (15), provavelmente o T4 e o rT3 atuam nesses receptores para ativar a polimerização da actina por mecanismos não-genômicos.

1.3 A captação de glicose

A regulação da glicemia ocorre, simplificadamente, através do balanço entre a produção/ingestão e a utilização da glicose pelo organismo. Virtualmente, todos os tecidos são capazes de captar e utilizar a glicose como fonte de energia de acordo com a demanda metabólica local. No entanto, durante o período pós-prandial, o principal hormônio responsável por aumentar a captação de glicose (CGlic) em tecidos

do organismo é a insulina. Nessa situação, esse hormônio promove o armazenamento da glicose, sob a forma de glicogênio e de triglicérides, pelo fígado, músculo estriado e tecido adiposo (53, 54).

Para que a glicose seja captada pela célula, é necessário que transportadores estejam presentes em sua membrana plasmática (MP) (55). Uma família de transportadores de glicose, os GLUTs, têm sido alvo de muitos estudos nas últimas décadas (56, 57). Dentre os 14 GLUTs descritos na literatura, tem-se dado atenção especial ao GLUT4. Esse transportador é expresso principalmente no músculo estriado e tecido adiposo, onde sua translocação e inserção na MP são reguladas principalmente pela insulina (58). Sabe-se que defeito nas vias de sinalização desse hormônio pode causar resistência insulínica e levar ao Diabetes tipo 2, doença que vem crescendo mundialmente à níveis epidêmicos (59).

O transporte de glicose através dos GLUTs ocorre por difusão facilitada, ou seja, em função do gradiente de concentração e sem gasto de energia. No entanto, após entrar na célula, a glicose é fosforilada pela enzima hexocinase, o que impede sua saída pelos GLUTs e permite que ela seja metabolizada pela via glicolítica, bem como armazenada sob a forma de glicogênio ou triglicerídeos (60). A insulina aumenta a captação de glicose e o estoque desta no músculo estriado e tecido adiposo, ativando, basicamente, todos os processos envolvidos nesses mecanismos (61). No músculo esquelético, além da insulina, a própria contração muscular é capaz de ativar os mecanismos de CGlic, por vias distintas da utilizada por aquele hormônio (62).

1.3.1 Sinalização da Insulina

A insulina inicia sua ação pela interação com seu receptor de membrana, o receptor de insulina (IR). Este é um heterotetrâmero formado por duas subunidades α e duas β, sendo que as α se localizam na parte extracelular e as β, ligadas às α, estão inseridas na MP e apresentam uma cauda citoplasmática com atividade tirosina cinase (63). Quando a insulina se liga às subunidades α, ocorre ativação da tirosina cinase e autofosforilação nos resíduos de tirosina das caudas citoplasmáticas das subunidades β, o que aumenta ainda mais a atividade cinase do IR (64). Em seguida ocorre fosforilação de substratos do receptor de insulina (IRS) com consequente ativação da subunidade regulatória p85 da enzima fosfatidilinositol-3’-cinase (PI3K). A p85 recruta e ativa sua subunidade catalítica p110 próxima à MP, onde ocorre a produção de

fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato (PIP3) a partir de fosfatidilinositol-(3,4)-bifosfato (PIP2), que, por sua vez, ativa a proteína cinase dependente de fosfoinositídeo (PDK-1) e a Akt (também chamada PKB) (65). A PDK-1 juntamente com a complexo protéico mTORC2 ativam completamente a Akt (66, 67), que fosforila e inativa seu substrato de 160 KDa (AS160 ou TBC1D4), gerando acúmulo de Rab-GTP e essa cascata de sinalização direciona a translocação do GLUT4 para a MP com aumento na CGlic (68-70). Além da Akt, a insulina ativa as isoformas atípicas da proteína cinase C (PKC ζ e λ) via PDK-1, o que também tem sido relacionado ao aumento na translocação de GLUT4 e CGlic (71-73).

A translocação do GLUT4 tem sido associada à integridade do citoesqueleto das células muscular e adiposa e depende, ao menos em parte, da polimerização de microtúbulos e actina (74-77). Em células musculares, estudos mostraram que a translocação das vesículas de GLUT4 ocorre pela associação dessas ao citoesqueleto de actina e depende da proteína α-actinina-4 (ACTN4) (78, 79). Nessas células a insulina ativa, via PI3K, a GTPase Rac1, com consequente aumento na remodelação da actina e translocação do GLUT4 (70, 80, 81). Há evidências de que a PKC ζ participa dessa sinalização (82). Outra via de sinalização ativada pela insulina, porém, independente da PI3K, também influencia a polimerização da actina e aumenta a translocação do GLUT4 para a MP. Trata-se de outra GTPase, a TC10, que é ativada por um complexo de proteínas: CAP-Cbl-CrkII-C3G (83-85). Apesar de um trabalho mostrar que esse complexo proteico pode não estar envolvido na translocação do GLUT4 e CGlic em células adiposas (86), ao menos a isoforma α da TC10 parece que está (85). Essa via, no entanto, participa da CGlic estimulada pela insulina em células adiposas, mas provavelmente não tem o mesmo papel em células musculares (87).

Alguns trabalhos têm mostrado que alterações na taxa de CGlic nem sempre estão associadas às alterações na translocação do GLUT4, sugerindo a hipótese de que o GLUT4 possui atividade intrínseca regulada pela insulina (88-90). A translocação do GLUT4 pela insulina parece depender da produção de PIP3 (91-93), enquanto a ativação ocorre pela remoção de proteínas inibitórias, como a hexocinase II, de alças intracelulares do GLUT4 inserido na MP, e da ligação do GAPDH a essas regiões (94).

1.3.2 Sinalização da AMPK

Além da insulina, outros estímulos são capazes de aumentar a CGlic no músculo esquelético e tecido adiposo. A contração muscular, assim como a hipóxia e outros estímulos que aumentam a razão AMP:ATP, são capazes de aumentar a captação e metabolização da glicose através da ativação da proteína cinase ativada por AMP (AMPK) (62). Esses mecanismos envolvem o transporte de glicose via GLUT1 e GLUT4 e ativação da via glicolítica, como a fosforilação da 6-fosfofruto-2-cinase e aumento de frutose-2,6-bisfosfato. A ativação da AMPK aumenta tanto a translocação do GLUT4 (95, 96) quanto a sua expressão gênica (97, 98). Tais ações não dependem da via de sinalização da insulina e, fármacos ativadores da AMPK, como a metformina, já são utilizados no tratamento da resistência insulínica e diabetes tipo 2 (99, 100).

A AMPK é um complexo heterotrimérico formado por uma subunidade α catalítica e duas subunidades regulatórias, β e γ (101). Esse complexo é ativado pela fosforilação do aminoácido Thr-172 na subunidade α (102) e seus principais ativadores são a proteína cinase B1 de fígado (LKB1) (103, 104) e a proteína cinase da cinase cálcio/calmodulina-dependente (CaMKK) (105, 106). Os principais estímulos que promovem ativação da via de sinalização da AMPK assim o fazem por aumentar a concentração de AMP ou Ca citoplasmático e já foi demonstrado que tais efeitos são desencadeados por várias substâncias ativadoras dessa proteína (107). As ações sobre o transporte de glicose e translocação do GLUT4 de algumas dessas substâncias também foram observadas em células adiposas e, da mesma forma que em células musculares, ocorrem via ativação da AMPK (108-110).

Em células musculares, o aumento na CGlic pela contração ou por fármacos como a metformina e AICAR parece não ocorrer exatamente pelas mesmas vias. Esses fármacos aumentam a CGlic via ativação da AMPK, MAPK (ERK1/2) e PKC atípica (111, 112). A contração muscular, apesar de ativar essas vias, não depende da ativação da ERK1/2 e PKC atípica para aumentar a CGlic (112-114). Trabalhos recentes também mostram que outras enzimas participam do aumento da CGlic via AMPK, como a fosfolipase D1 (PLD1) e isoformas convencionais da PKC (115, 116).

1.4 Hormônio tireoidiano e captação de glicose

Como já discutido anteriormente, os HTs participam de ações que regulam o metabolismo energético. Uma das formas dessa regulação envolve a produção e o consumo da glicose circulante por seus tecidos alvos, que estão ambos aumentados em animais hipertireoideos e reduzidos no hipotireoidismo (117, 118). Muitos trabalhos já evidenciaram a participação dos HTs no aumento da CGlic e da expressão gênica do GLUT4 em músculo esquelético (119-122) e tecido adiposo (123), na CGlic e expressão do GLUT1 em células de Sertoli (124), na CGlic em células cardíacas (125) e hepáticas (126), na CGlic e expressão do GLUT1 e 4 em células adiposas 3T3-L1 (127), na regulação do mRNA do GLUT1 e 3 no córtex cerebral (128) e no conteúdo de GLUT1, 3 e 4 na MP de monócitos (129). Em ratos neonatos hipotireoideos, uma única injeção de T3 foi capaz de aumentar o mRNA do GLUT4 no tecido cardíaco (130). Além disso, também foi evidenciado um elemento responsivo ao HT no promotor do gene do GLUT4 (131, 132). Recentemente, foi demonstrado que o tratamento de camundongos *db/db* (modelo de diabetes tipo 2) com T3 melhorou a sensibilidade à insulina, aumentou a síntese de GLUT4 e atenuou a hiperglicemia (133). De fato, muitos trabalhos têm discutido a respeito do sinergismo entre os HTs e a insulina na manutenção da homeostase glicêmica. Não apenas o GLUT4, mas algumas enzimas da via glicolítica são reguladas pelo T3 e/ou pela insulina (134). A importância de se manter os níveis plasmáticos de HTs dentro da normalidade é evidenciada pelo fato de que tanto o hipo quanto o hipertireoidismo normalmente estão associados à resistência insulínica e diabetes tipo 2 (135-137).

Além dos efeitos mencionados, que envolvem a transcrição de genes como o do GLUT4 e tempos longos de tratamento com HT (de horas a dias), experimentos utilizando bloqueadores da transcrição gênica e da síntese proteica sugeriram que o T3 aumenta a CGlic em células cardíacas por mecanismos não-genômicos (138), iniciados na membrana plasmática (35) e esse efeito pôde ser observado a partir de um minuto de incubação com o hormônio (139). Efeito similar do T3 foi observado também em timócitos *in vitro* (140) e *in vivo* (141). Em ratos eutireoideos, o T3 aumentou a CGlic no músculo cardíaco, esquelético e tecido adiposo em apenas 30 min, mesmo com a síntese proteica bloqueada (142).

Os mecanismos envolvidos nessas regulações rápidas dos HTs ainda precisam ser melhor esclarecidos. Estudos em nosso laboratório mostraram que o T3 em 30

min aumenta a translocação do GLUT4 para a MP em músculo esquelético de ratos e melhora a sensibilidade à insulina em relação aos animais hipotireoideos (143). Apesar do aumento na translocação do GLUT4 observado em músculo *in vivo* (143), nossos estudos *in vitro* utilizando células musculares L6 que superexpressam o GLUT1 ou 4 marcados com antígeno *myc* em sua alça extracelular (GLUT1- ou 4-*myc*) mostraram que o tratamento por 30 min com T3 aumenta a CGlic sem alterar a inserção desses GLUTs na MP, sugerindo uma possível ativação desses transportadores pelo T3; já aos 40 min de tratamento, o T3 aumentou a CGlic e o conteúdo de GLUT4 na MP (144). Já foi demonstrado que o T3 é capaz de ativar rapidamente a via da PI3K-Akt (23, 145-147) a partir de sua interação com: o TRβ1 associado à subunidade p85α da PI3K, com consequente ativação da via mTOR-$p70^{S6K}$ (46, 148, 149); o TRα1 associado à subunidade p85α da PI3K (50); e com a integrina de membrana αVβ3 (42). Em células L6, o T3 aumentou a CGlic em 90 min e esse efeito foi bloqueado pelo inibidor da PI3K, wormannin (150). Por outro lado, nossos dados mostraram que de 10 a 30 min o T3 não alterou significativamente a fosforilação da Akt nessas células (144). Uma diferença importante entre esses dois trabalhos é que em nossos experimentos as células permaneceram por 24h com meio de cultura depletado de HT antes da adição do T3. Recentemente, foi mostrado que em células adiposas 3T3-L1 o T3, em 30 min, potencializa a ação da insulina quanto ao aumento da fosforilação da Akt, à translocação do GLUT4 para a MP e à CGlic, apesar de não exercer, *per se*, nenhum desses efeitos (151).

Nosso laboratório tem investigado as ações rápidas dos HTs na regulação do GLUT4 em músculo esquelético, cardíaco e tecido adiposo de ratos e na sensibilidade insulínica desses animais. No entanto, os mecanismos envolvidos nessas ações ainda não estão bem estabelecidos, sobretudo no tecido adiposo branco. O presente trabalho tem como objetivo investigar a ação do T3 sobre a CGlic em células adiposas 3T3-L1 e os possíveis mecanismos envolvidos nessa ação.

1.5 Objetivos

Os objetivos do trabalho foram:

a) Analisar o padrão de resposta de captação de glicose (CGlic) de células 3T3-L1 ao T3;
b) Investigar as possíveis vias de sinalização e receptores envolvidos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Meio de cultura DMEM alta glicose (Vitrocell Embriolife COD.00044, Campinas, SP, Brasil), Soro fetal bovino (Gibco® 12657 - Life Technologies, São Paulo, SP, Brasil), 3-3'-5-L-triiodotironina (T3) (Sigma-Aldrich Co. LLC. T2877, St. Louis, MO, USA), solução com antibióticos penicilina e estreptomicina (Gibco® 15140122), insulina bovina (Sigma-Aldrich I5500), *Wortmannin* (Sigma-Aldrich W1628), *Akt1/2 kinase inhibitor* (Sigma-Aldrich A6730), PD98059 (Sigma-Aldrich P215), PP2 (Sigma-Aldrich P0042), Tetrac (Sigma-Aldrich T3787), *Cytochalasin B* (Sigma-Aldrich C6762), Colchicina (Sigma-Aldrich C9754), 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (Sigma-Aldrich I5879), *Dexamethasone* (Sigma-Aldrich D1756), 2-Deoxi-D-Glicose (Sigma-Aldrich D6134), 2-[^{3}H]-Deoxi-D-Glicose (PerkinElmer Inc. NET549A001MC, Waltham, MA, USA), peptídeos G**RGD**SP e G**RGE**SP (Proteimax, Cotia, SP, Brasil). Anticorpos: anti-Glut4 (Cell Signaling Technology, Inc. #2213, Danvers, MA, USA), anti-p-Akt Ser^{473} (Cell Signaling #4058), anti-Akt total (Cell Signaling #9272), anti-p-Src Tyr^{416} (Cell Signaling #2101), anti-Src total (Cell Signaling #2108).

2.2 Cultivo das células 3T3-L1

Os pré-adipócitos 3T3-L1, provenientes da ATCC®, cresceram em placas contendo meio de cultura DMEM alta concentração de glicose (DMEM high), 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos [penicilina (100 U/mL) e ampicilina (10 µg/mL)] em estufa com temperatura controlada a 37 ºC, atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 e 95% de ar, até atingirem 100% de confluência. Então, para diferenciação, foi adicionado meio DMEM high contendo 10% SFB com antibiótico, insulina bovina (870 nM), Dexamethasone (250 nM) e IBMX (500 µM), sendo este considerado o dia zero. No quarto dia o meio foi trocado por DMEM high contendo 10% SFB com antibiótico e insulina. Esse meio foi trocado a cada 2 dias e no décimo dia de cultivo mais de 80% das células estavam diferenciadas, estimativa feita por corante Oil Red (152). Então, as células foram lavadas uma vez com DMEM high com 10% SFB e antibiótico e mantidas nesse meio por cerca de 24 horas. Após esse período as células

foram lavadas uma vez com meio DMEM high puro apenas com antibiótico (sem SFB e sem insulina) e mantidas nesse meio por 1 hora antes do experimento. Então, foi adicionado meio DMEM high puro contendo ou não T3 e/ou inibidores farmacológicos. Foram utilizadas células entre a 8ª e 11º passagem.

2.3 Ensaio de captação de 2-deoxi-D-glicose (2-DG) radioativa

A 2-deoxi-D-glicose, assim como a D-glicose, entra nas células pelos GLUTs e é fosforilada pela hexocinase, produzindo a 2-Deoxi-D-Glicose-6-fosfato, que, ao contrário da D-glicose-6-fosfato, não é metabolizada pela próxima enzima da via da glicólise, a fosfoglicoisomerase (153). Assim, é possível medir a 2-DG fosforilada que permanece dentro da célula após incubação dessas com 2-DG radioativa.

Após os tratamentos, as células foram lavadas duas vezes com o tampão HBS (140 mM NaCl, 20 mM Hepes [pH 7,4], 5 mM KCl, 2,5 mM MgSO4 e 1,0 mM CaCl2) e, então, incubadas por 5 min com 250 µl de “solução de transporte” (HBS, 10 µM 2-Deoxi-D-Glicose, 0,5 µCi/mL 2-[^{3}H]-Deoxi-D-Glicose) por poço. Após a incubação, as células foram lavadas três vezes com “solução de bloqueio” (9 g/L NaCl, 4,5 g/L D-Glicose) e, então, foi adicionado 0,5 mL de NaOH (0,05 N) por poço, para homogeneização. Deste homogeneizado, foram transferidos 0,4 mL para um tubo contendo líquido de cintilação (2 mL) e, a radiação, correspondente à captação de glicose, foi quantificada em contador beta. A radiação residual (branco) foi determinada pela incubação das células (grupo separado) com solução de transporte contendo 10 µM de citocalasina B, um inibidor não seletivo dos transportadores de glicose e, então, subtraída dos valores totais.

2.4 Análise de proteínas

Após o tratamento das células, estas foram homogeneizadas em tampão para proteínas fosforiladas [PBS (NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4), Triton® X-100 (1%, Sigma-Aldrich), *cocktail* inibidor de protease (1:500, Sigma-Aldrich P8340), inibidores de fosfatases ortovanadato de sódio (Sigma-Aldrich S6508) e ácido ocadaico (Sigma-Aldrich O9381)] ou para proteínas de membrana (Tris 10 mM, sacarose 250 mM, EDTA 1 mM), seguindo centrifugação a 3000g por 20 min. O

sobrenadante foi transferido para outro tubo e após quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford (BioRad), foram aliquotados de 10 a 50 µg de proteínas em tampão Laemmli (154) e essas foram separadas em SDS-PAGE 10%. As proteínas do gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose, que foram coradas com Ponceau (Sigma-Aldrich P3504) e bloqueadas por 1 h com 3% de albumina em PBS com 1% de detergente Tween20 (PBS-T). As membranas, a seguir, foram incubadas *overnight* a 4-8 ºC com anticorpos específicos. No dia seguinte, foram lavadas com PBS-T e incubadas com anticorpo secundário ligado à *horseradish* peroxidase (Jackson ImmunoResearch) por 1-3 h, lavadas novamente com PBS-T e tratadas com reagentes quimioluminescentes (ECL, Amershan RPN2232) por 1 minuto. A seguir, as membranas foram expostas a filmes auto-radiográficos, cuja análise densitométrica das bandas foi realizada por meio do software ImageJ (155).

2.5 Análise estatística

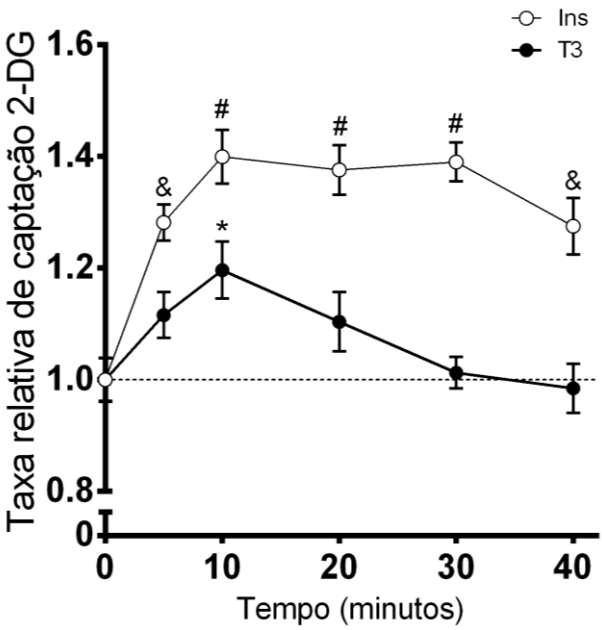
Os valores numéricos foram expressos como média ± erro padrão da média. O teste de análise de variância de uma via (one-way ANOVA) ou duas vias (two-way ANOVA) seguido do pós-teste Student–Newman–Keuls ou Turkey, respectivamente, foi utilizado quando necessário. A significância estatística foi definida pelos valores de $P < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Efeito do T3 sobre a captação de 2-DG (CGlic) pelas células 3T3-L1: Curva tempo-resposta

Para avaliar a resposta aguda de CGlic das células 3T3-L1 ao T3, realizamos o ensaio de captação de 2-DG após 5, 10, 20, 30 e 40 min de incubação dos adipócitos com 1 nM de T3 e, como controle positivo, 1nM de insulina (figura 1). A concentração do T3 (1 nM) foi utilizada com base em nossos resultados prévios e em trabalhos na literatura (37, 42, 145).

Figura 1 – Curva tempo-resposta do T3 sobre a captação de 2-DG



Taxa de captação de 2-DG em relação ao controle (sem tratamento, linha pontilhada). Após incubação com 1 nM de T3 e insulina (Ins) nos tempos indicados, as células foram incubadas com 2-DG radioativa por 5 min (ver seção 2.3) e posteriormente foi quantificada a radioatividade intracelular e normalizada pelo conteúdo total de proteína. N = 12, (* $p < 0,05$, & $p < 0,001$ e # $p < 0,0001$ vs controle).

A figura 1 mostra que houve um aumento significativo na captação de 2-DG após 10 min de incubação das células com T3 e que, em tempos maiores, a taxa de captação cai até retornar aos níveis do grupo controle. A insulina, controle positivo, promoveu aumento máximo na CGlic sustentado dos 10 aos 30 minutos. Portanto, para estudar os mecanismos envolvidos nessa ação, selecionamos o tempo de 10

min de incubação com T3 para realizar os experimentos de captação de 2-DG em células 3T3-L1 submetidas previamente à inibição de vias de sinalização específicas.

3.2 Efeito do T3 sobre a fosforilação da proteína Akt: Curva tempo-resposta

Após observarmos aumento significativo na captação de 2-DG pelo T3 (figura 1), e considerando o envolvimento da Akt na translocação de GLUT4 e captação de glicose, avaliamos o grau de fosforilação da proteína Akt (p-Akt Ser^{473}), por *Western blotting*, após os mesmos períodos de tempo de incubação com 1 nM de T3, bem como após tratamento das células com 100n nM de insulina por 5 min (controle positivo) (figura 2).

Figura 2 – Efeito do T3 sobre a fosforilação da Akt

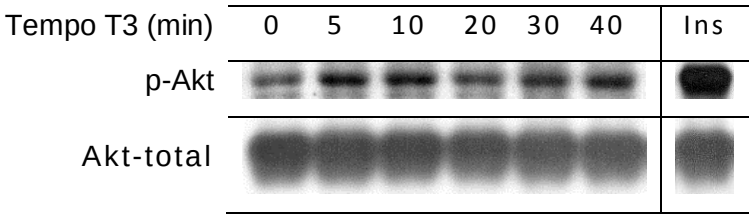


Imagem dos *blots* correspondentes ao conteúdo de proteínas p-Akt (Ser^{473}) e Akt-total de células 3T3-L1 nos diferentes tempos de incubação com T3 ou Insulina (Ins), por 5 min (controle positivo). Foram depositados 30 µg de proteínas totais em cada poço do gel.

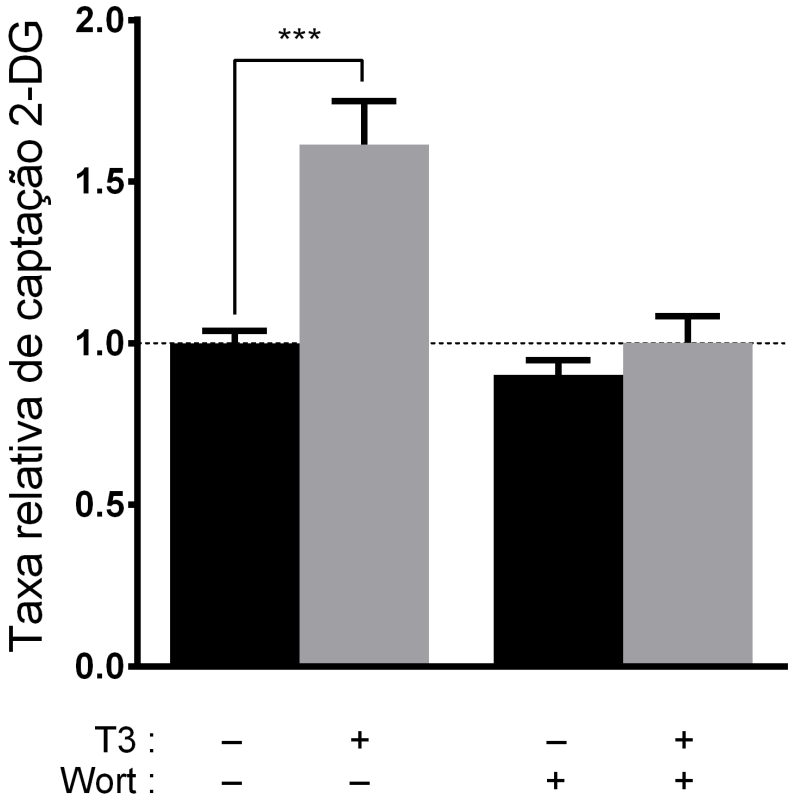
Na figura 2 observa-se aumento na intensidade dos *blots* da p-Akt correspondentes aos tempos 5 e 10 minutos de tratamento com T3. Portanto, escolhemos o tempo de 5 min de incubação com T3 para realizar os experimentos que visaram identificar as proteínas envolvidas na ativação da Akt.

3.3 Efeito do T3 sobre a captação de 2-DG em células 3T3-L1 previamente submetidas a bloqueio da PI3K

Como nossos resultados mostraram que a Akt pode ter um papel fundamental no aumento da captação de 2-DG pelo T3, buscamos analisar se a PI3K, sua principal ativadora na via da sinalização da insulina, participa dessas ações. Para tanto, utilizamos um de seus inibidores, a *Wortmannin* (Sigma-Aldrich W1628).

Após 30 min de incubação com *Wortmannin*, as células receberam T3 por 10 min seguindo-se o ensaio de captação de 2-DG. A análise da radioatividade intracelular detectada nos diferentes grupos é mostrada na figura 3.

Figura 3 - Efeito do T3 sobre a CGlic pelas células previamente tratadas com *Wortmannin*



Taxa relativa da captação de 2-DG em resposta ao T3 após tratamento das células 3T3-L1 com inibidor da PI3K. As células sofreram pré-incubação por 30 min com *Wortmannin* (1 µM) seguida de incubação por 10 min com T3 (1 nM). N = 8, (*** $p < 0,001$ vs controle). Interação significativa ($p < 0,01$). Wort = *Wortmannin*.

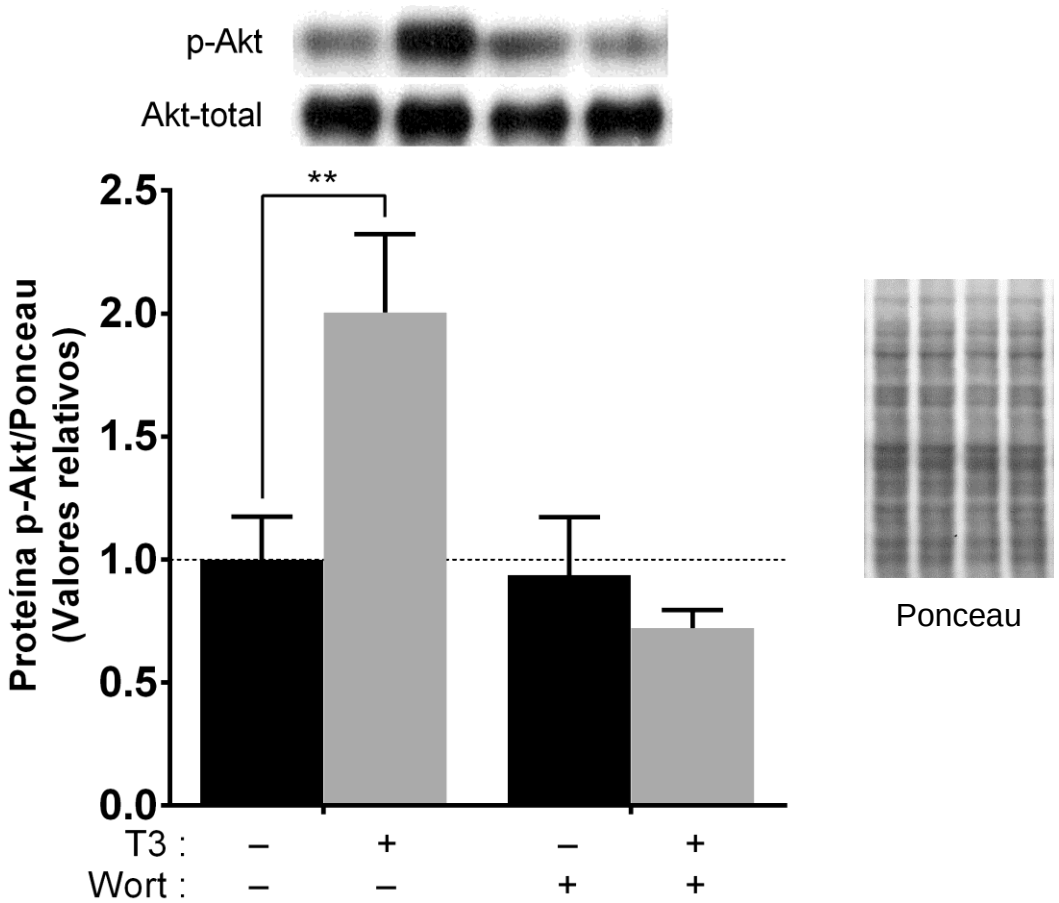
A figura 3 mostra que o tratamento prévio das células com a *Wortmannin* preveniu o aumento na taxa de captação de 2-DG induzido pelo T3, sugerindo que a ativação da sinalização da PI3K é um processo fundamental na resposta ao T3 observada.

3.4 Efeito do T3 sobre a fosforilação da Akt em células 3T3-L1 previamente submetidas a bloqueio da PI3K

Avaliamos, também, se a ativação da Akt pelo T3 (seção 3.2) ocorre via PI3K.

Após pré-tratamento por 30 min com 1 µM de *Wortmannin* (Sigma-Aldrich W1628), as células foram incubadas com T3 por 5 min e processadas (ver 2.4), para análise da p-Akt por *Western blotting* (figura 4).

Figura 4 - Efeito do T3 sobre a fosforilação da Akt em células previamente tratadas com *Wortmannin*



Representação da intensidade de fosforilação da Akt em resposta ao T3 após tratamento das células 3T3-L1 com inibidor de PI3K. As células sofreram pré-incubação por 30 min com *Wortmannin* (1 µM), seguida por incubação por 5 min com T3 (1 nM). Foram depositados 30 µg de proteínas para p-Akt (Ser^{473}) e 15 µg para Akt-total em cada poço de gel. N = 6, (** $p < 0,01$ vs controle). Interação significativa ($p < 0,01$). Wort = *Wortmannin*.

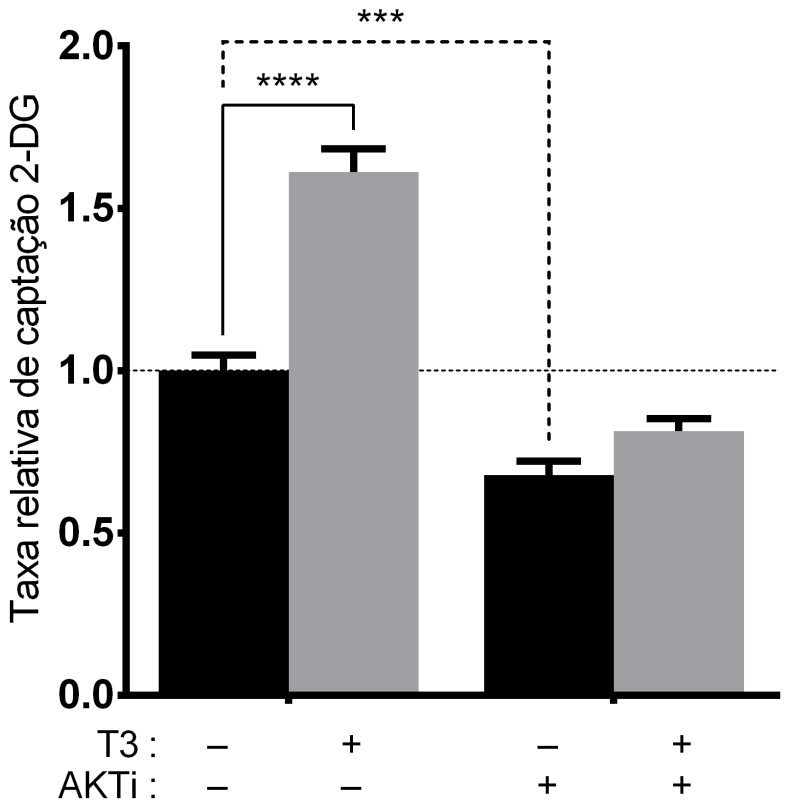
A figura 4 mostra que o tratamento prévio das células com a *Wortmannin* bloqueou completamente o aumento na fosforilação da Akt induzido pelo T3, sugerindo que a PI3K é uma enzima chave nesse processo.

3.5 Efeito do T3 sobre a captação de 2-DG (CGlic) em células 3T3-L1 previamente submetidas a bloqueio da Akt

Os resultados mostrados anteriormente indicam que o aumento da captação de 2-DG e da fosforilação da Akt pelo T3 é dependente da PI3K. Investigamos, então, se o aumento na captação de 2-DG pelo T3 é dependente, também, da ativação da Akt. Para tal, utilizamos um bloqueador farmacológico das isoformas 1 e 2 da Akt, o *Akti1/2* (Sigma-Aldrich A6730).

Após 1 hora de incubação com o inibidor *Akti1/2* (10 µM), as células foram tratadas com T3 por 10 min e, em seguida, submetidas ao ensaio de captação de 2-DG (figura 5).

Figura 5 - Efeito do T3 sobre a CGlic pelas células previamente tratadas com *Akti1/2*



Taxa relativa da captação de 2-DG em reposta ao T3 após tratamento das células com bloqueador farmacológico das isoformas 1 e 2 da Akt. As células sofreram pré-incubação por 1 h com Akti1/2 (10 µM), seguida de incubação por 10 min com T3 (1 nM). N = 8, (*** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vs controle). Interação significativa ($p < 0,0001$). AKTi = Akti1/2.

A figura 5 mostra que o tratamento prévio das células com o inibidor *Akti1/2* impediu o aumento da captação de 2-DG induzido pelo T3. Tal resultado indica que, provavelmente, a Akt seja uma enzima essencial na ação do T3 sobre a CGlic.

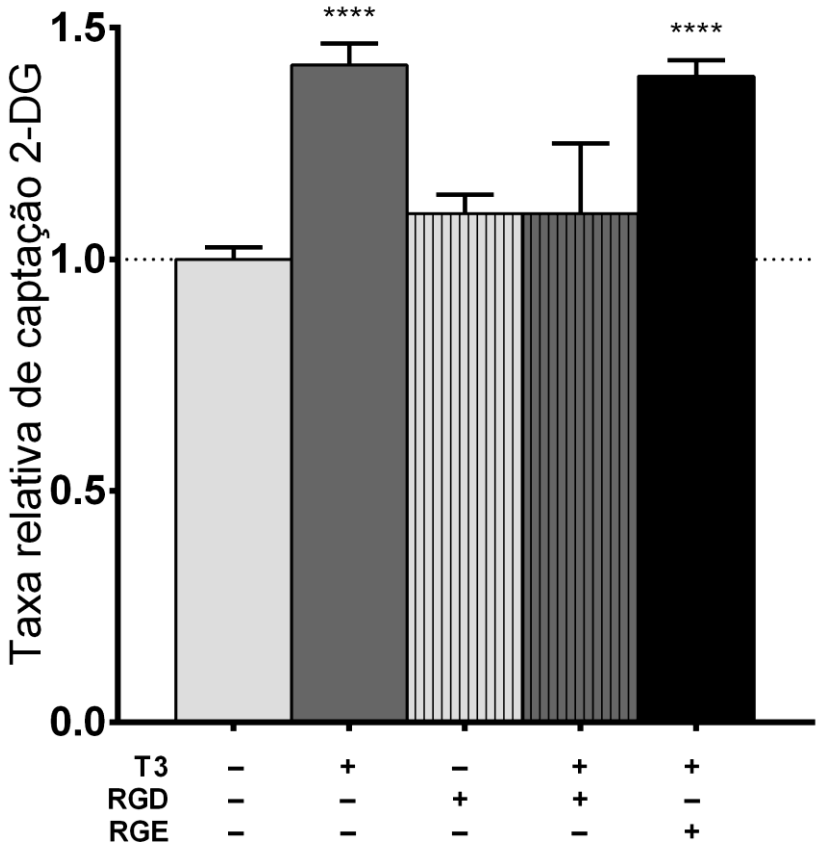
3.6 Avaliação dos efeitos do T3 em células 3T3-L1 previamente submetidas a bloqueio da integrina αVβ3

A integrina de membrana αVβ3 tem sido considerada um receptor de membrana para o T3 e T4, a partir de onde se iniciam várias ações não-genômicas desses hormônios, por meio da ativação de vias de sinalização intracelulares, sendo que uma dessas ações envolve a sinalização da PI3K (15). Portanto, avaliamos o efeito do bloqueio dessa integrina, com um hexapeptídeo contendo a sequência RGD (Proteimax, ver seção 2.1) e com o Tetrac (Sigma-Aldrich T3787), sobre as ações do T3.

3.6.1 Efeito do RGD sobre a captação de 2-DG estimulada por T3

Após incubação por 50 min com o peptídeo RGD ou RGE (100 µg/mL), as células receberam T3 por 10 min seguindo-se o ensaio de captação de 2-DG. A análise da radioatividade intracelular detectada nos grupos estudados é mostrada na figura 6.

Figura 6 - Efeito do T3 sobre a CGlic pelas células previamente tratadas com RGD



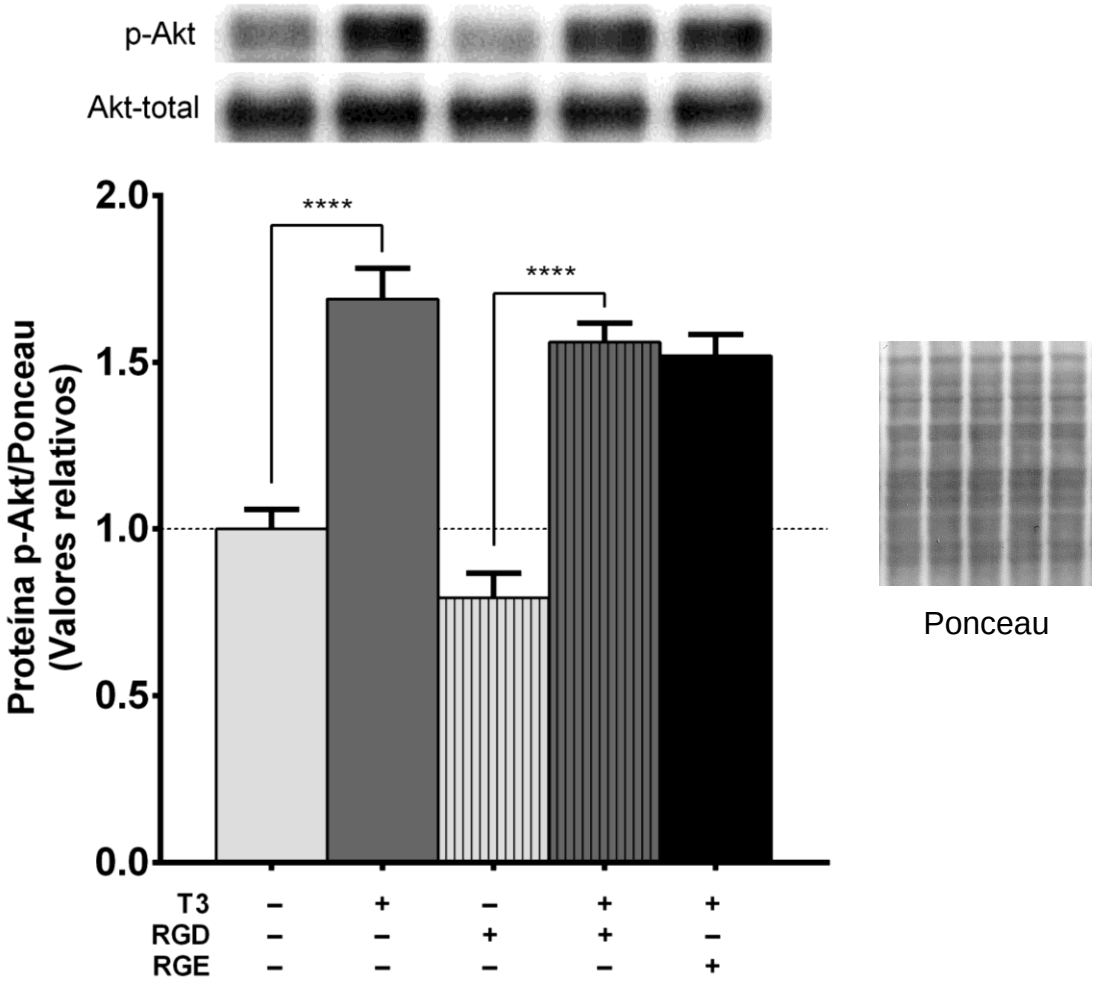
Taxa relativa da captação de 2-DG em resposta ao T3 após tratamento das células 3T3-L1 com RGD ou RGE. As células sofreram pré-incubação por 50 min com RGD ou RGE (100 µg/mL) seguida de incubação por 10 min com T3 (1 nM). N = 12, (**** $p < 0,0001$ vs controle).

A figura 6 mostra que o tratamento prévio das células com o peptídeo RGD bloqueou o aumento na taxa de captação de 2-DG induzido pelo T3, ao contrário do RGE que não interferiu na resposta. A especificidade do bloqueio pelo RGD, e não pelo RGE, sugere que a integrina αVβ3 participa da ativação da captação de 2-DG induzida pelo T3.

3.6.2 Efeito do RGD sobre a fosforilação da Akt estimulada por T3

Após pré-tratamento das células 3T3-L1, por 50 min, com peptídeo RGD (100 µg/mL), as células foram incubadas com T3 por 5 min e processadas para a análise da p-Akt por *Western blotting* (figura 7). Procedimento idêntico foi realizado utilizando o peptídeo RGE (Arg-Gly-Glu), o qual não se liga ao sítio da integrina com o qual o T3 e o T4 interagem (controle negativo).

Figura 7 - Efeito do T3 sobre a fosforilação da Akt em células previamente tratadas com RGD



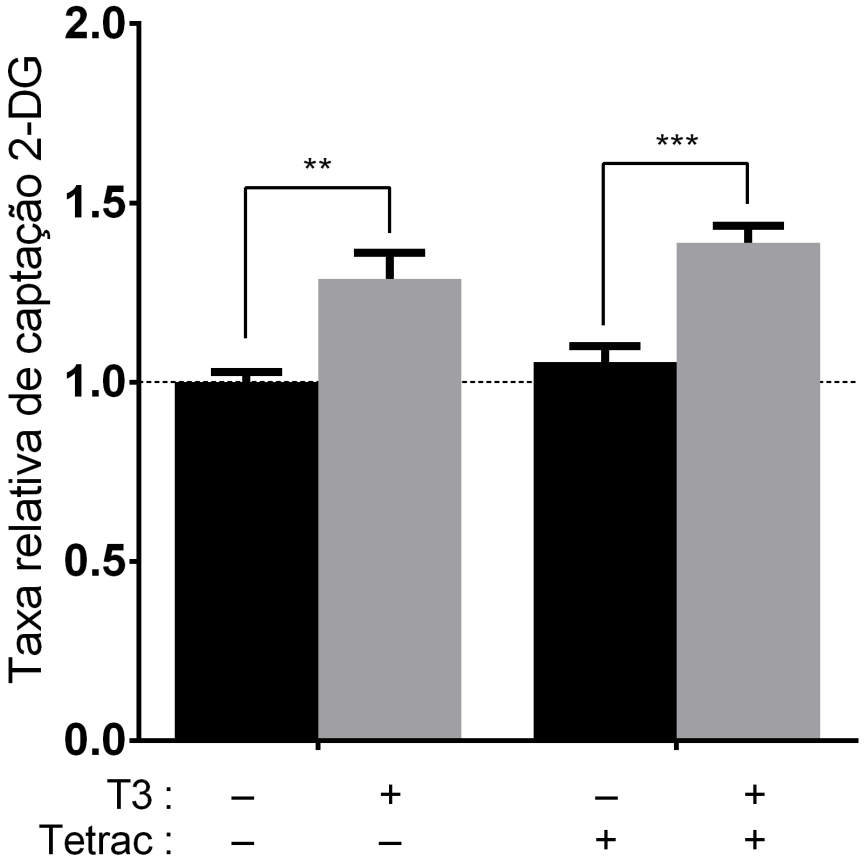
Representação da intensidade de fosforilação da Akt em resposta ao T3 após tratamento das células 3T3-L1 com RGD ou RGE. As células sofreram pré-incubação por 50 min com RGD ou RGE (100 µg/mL) seguida por incubação por 5 min com T3 (1 nM). Foram depositados 30 µg de proteínas para p-Akt (Ser^{473}) e 15 µg para Akt-total. N = 10, (**** $p < 0,0001$ vs respectivos grupos controle).

A figura 7 mostra que, apesar do peptídeo RGD *per se* reduzir o nível basal de fosforilação da Akt (não significativo), o efeito do T3 não foi modificado por esse peptídeo. O peptídeo RGE não alterou o efeito do T3, como esperado. Os dados indicam que a ativação da Akt pelo T3 não depende da integrina αVβ3.

3.6.3 Efeito do Tetrac sobre a captação de 2-DG estimulada por T3

Após incubação por 30 min com Tetrac (10 µM), as células receberam T3 por 10 min seguindo-se o ensaio de captação de 2-DG. A análise da radioatividade intracelular detectada nos grupos estudados é mostrada na figura 8.

Figura 8 - Efeito do T3 sobre a CGlic pelas células previamente tratadas com Tetrac



Taxa relativa da captação de 2-DG em resposta ao T3 após tratamento das células 3T3-L1 com Tetrac. As células sofreram pré-incubação por 30 min com Tetrac (10 µM) seguida de incubação por 10 min com T3 (1 nM). N = 8, (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs respectivos grupos controle).

A figura 8 mostra que o tratamento prévio das células com o Tetrac não bloqueou o aumento na taxa de captação de 2-DG induzido pelo T3. Esse dado sugere que a integrina αVβ3 não participa da ativação da captação de 2-DG induzida pelo T3, o que vai de encontro ao resultado obtido com o RGD (figura 6).

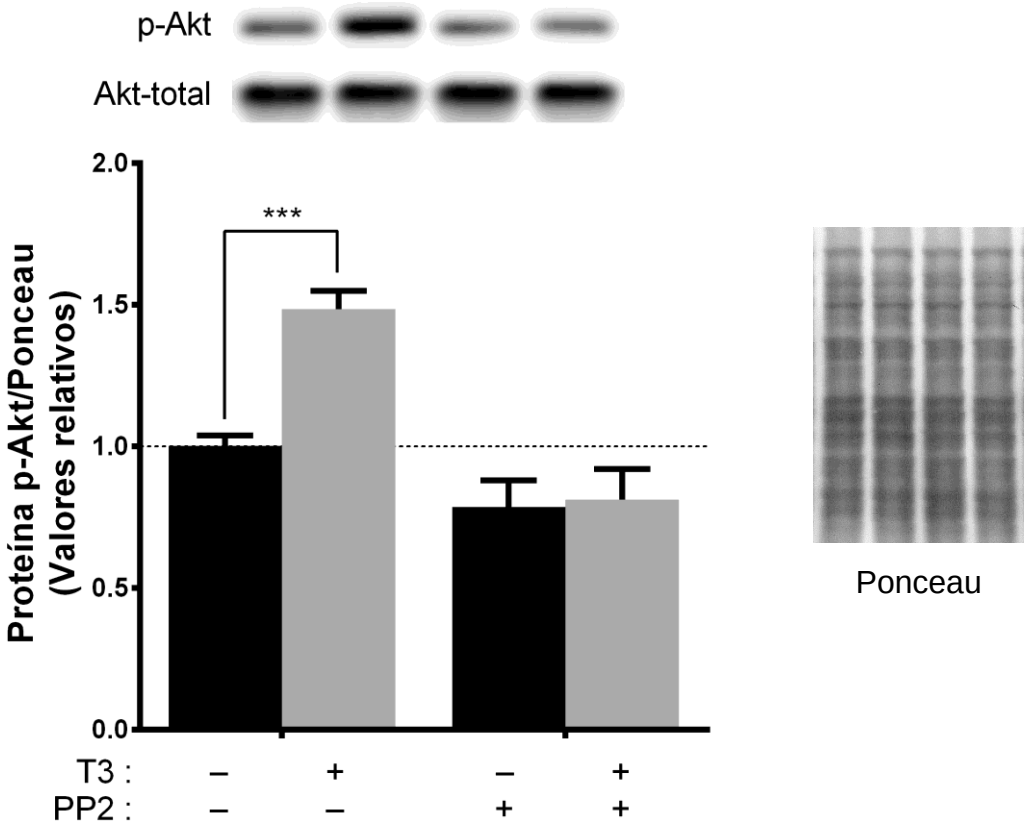
3.7 Avaliação dos efeitos do T3 em células 3T3-L1 após bloqueio da Src

A ativação da via de sinalização da PI3K pelo hormônio tireoidiano através da integrina αVβ3 é intermediada pela enzima Src (42). Como observamos anteriormente (figura 6), essa integrina pode estar envolvida na ativação da captação de 2-DG pelo T3. Assim, buscamos inibir a Src com o inibidor farmacológico PP2 (Sigma-Aldrich P0042) a fim de verificar se o T3 ativa, ou não, essa via de sinalização e se essa participa da captação de 2-DG estimulada por T3.

3.7.1 Efeito sobre a fosforilação da Akt

Após pré-tratamento por 40 min com PP2 (10 µM), as células 3T3-L1 foram incubadas com T3 por 5 min e processadas para a análise da p-Akt por *Western blotting* (figura 9).

Figura 9 - Efeito do T3 sobre a fosforilação da Akt em células previamente tratadas com PP2



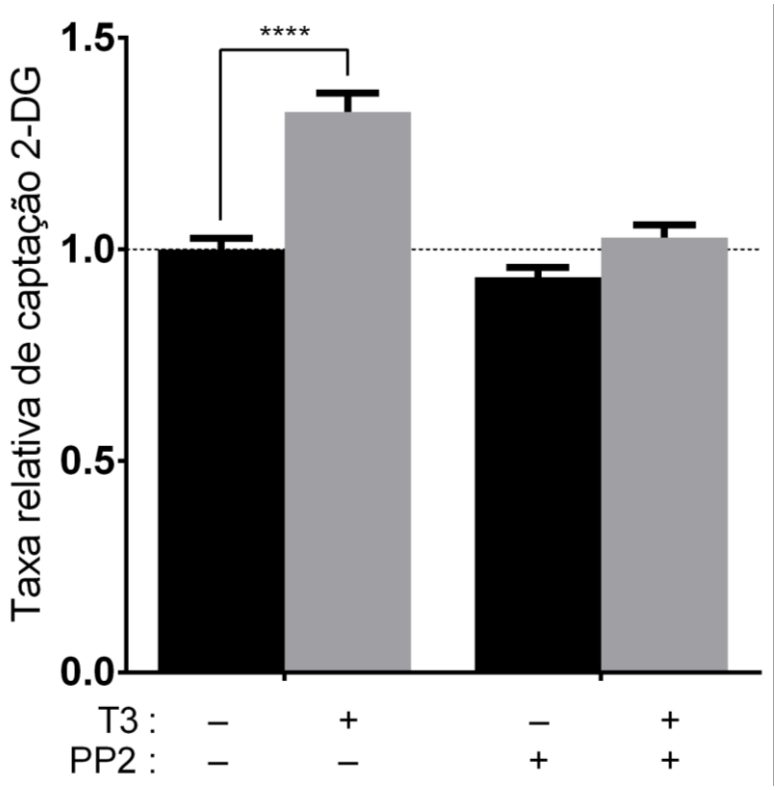
Representação da intensidade de fosforilação da Akt em resposta ao T3 após tratamento das células 3T3-L1 com PP2. As células sofreram pré-incubação por 40 min com PP2 (10 µM) seguida por incubação por 5 min com T3 (1 nM). Foram depositados em cada poço do gel 30 µg de proteínas para avaliação da p-Akt (Ser^{473}) e 15 µg para a da Akt-total. N = 9, (*** p < 0,001 vs controle), interação significativa (p < 0,01).

A figura 9 mostra que o PP2 impediu o aumento da fosforilação da Akt em resposta ao T3. Esse dado sugere que a Src está envolvida com a ativação da via PI3K-Akt.

3.7.2 Efeito sobre a captação de 2-DG

Após 40 min de incubação com PP2 (10 µM), as células receberam T3 por 10 min seguindo-se o ensaio de captação de 2-DG. A análise da radioatividade intracelular apresentada pelos grupos é mostrada na figura 10.

Figura 10 - Efeito do T3 sobre a CGlic pelas células previamente tratadas com PP2



Taxa relativa da captação de 2-DG em resposta ao T3 após tratamento das células. 3T3-L1 com PP2. As células sofreram pré-incubação por 40 min com PP2 (10 µM) seguida de incubação por 10 min com 1 nM de T3. N = 8, (**** p < 0,0001 vs controle), Interação significativa (p < 0,01).

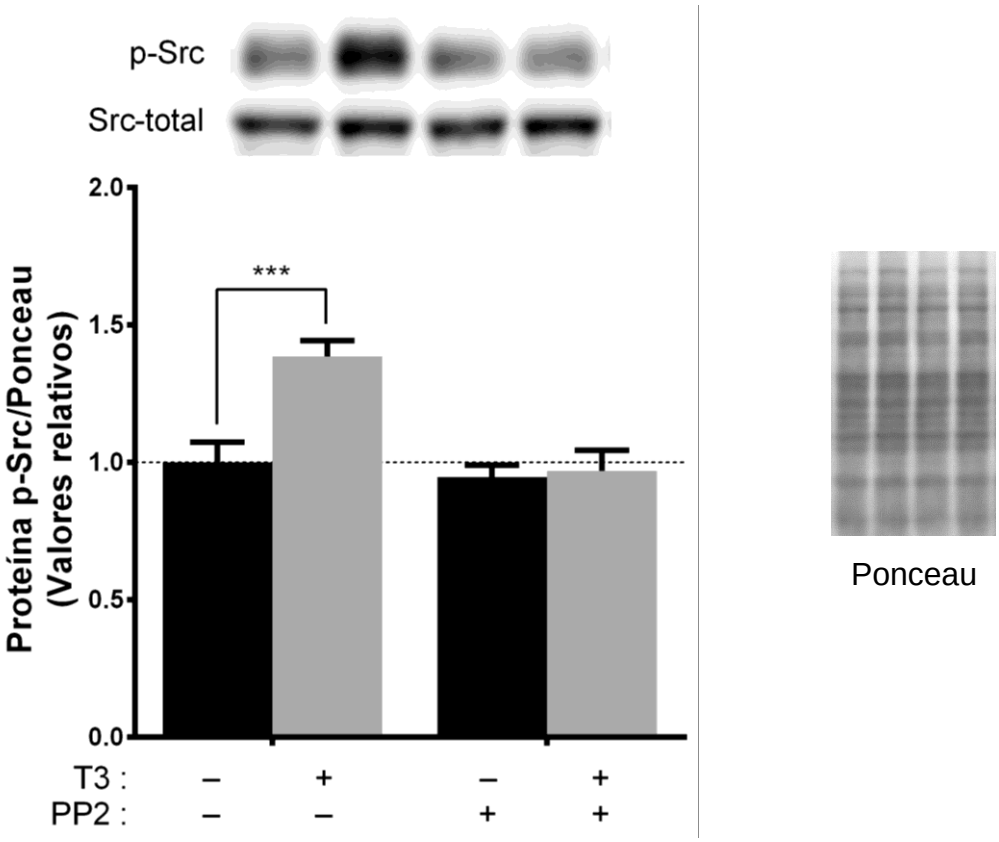
A figura 10 mostra que o PP2 bloqueou o aumento da captação de 2-DG induzido pelo T3. Esse dado aponta para uma importante participação da Src na captação de 2-DG ativada pelo T3.

3.8 Efeito do T3 sobre a fosforilação da proteína Src

Os dados mostrados anteriormente (seção 3.7) sugerem o envolvimento da enzima Src no aumento da CGlic e fosforilação da Akt pelo T3, nas células 3T3-L1. Para apoiar essa hipótese, procuramos verificar se o T3 altera, em 5 minutos, o grau de fosforilação da Src, na presença ou não do seu inibidor, o PP2.

Após pré-tratamento por 40 min com PP2 (10 µM), as células foram incubadas com T3 por 5 min e processadas para a análise da p-Src por *Western blotting* (figura 11).

Figura 11 - Efeito do T3 sobre a fosforilação da Src em células previamente tratadas com PP2



Representação da intensidade de fosforilação da Src em resposta ao T3 após tratamento das células 3T3-L1 com PP2. As células sofreram pré-incubação por 40 min com PP2 (10 µM)

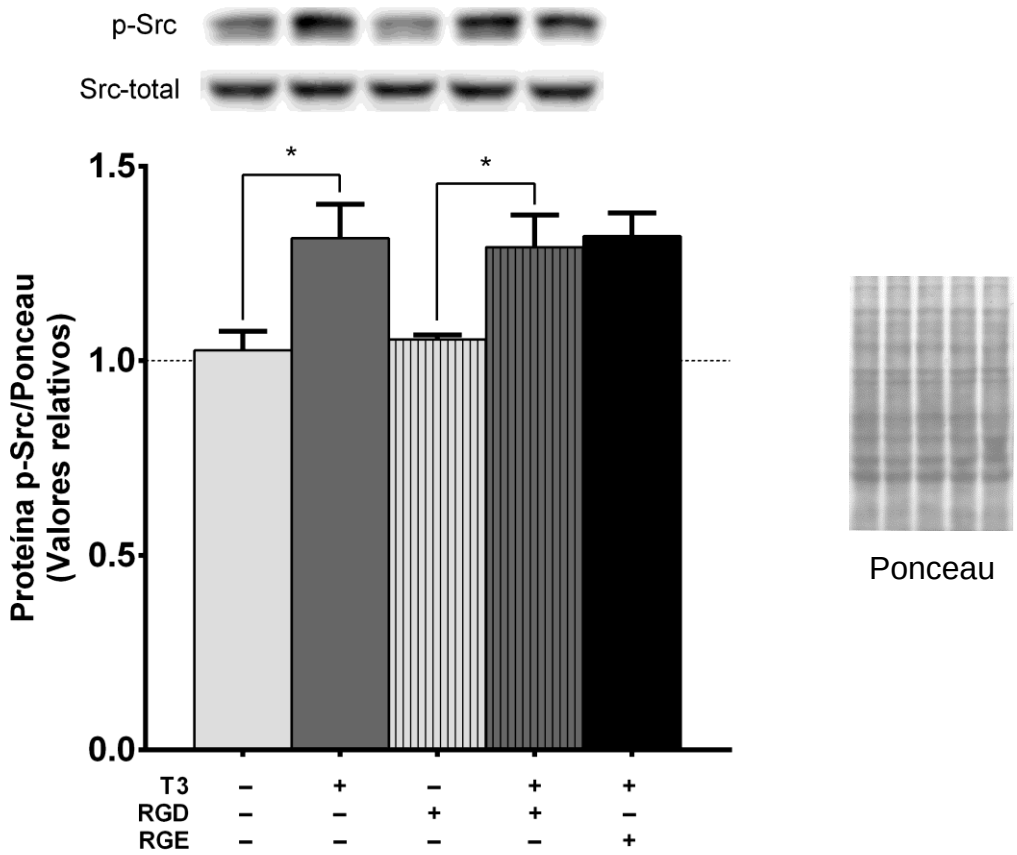
seguida por incubação por 5 min com T3 (1 nM). Foram depositados em cada poço do gel 40 µg de proteínas para avaliação da p-Src (Tyr^{416}) e Src-total. N = 6, (*** p < 0,001 vs controle), interação significativa (p < 0,01).

A figura 11 mostra que o T3 aumentou significativamente a fosforilação da Src em 5 minutos, e que seu inibidor PP2 foi capaz de bloquear essa ação.

3.8.1 Ação do T3 sobre a fosforilação da Src após bloqueio da integrina αVβ3

Já foi demonstrado que a integrina αVβ3 é capaz de ativar a Src (156), e que o T3 ativa essa enzima por meio desta integrina (42). Como nossos dados indicam que o aumento da captação de 2-DG e da fosforilação da Akt pelo T3 dependem da ativação da Src (ver 3.7), avaliamos se a ativação dessa proteína depende da integrina αVβ3. Para isso, utilizamos o peptídeo contendo a sequência RGD no pré-tratamento das células por 50 min, seguindo-se o tratamento com T3 por 5 minutos.

Figura 12 - Efeito do T3 sobre a fosforilação da Src em células previamente tratadas com RGD



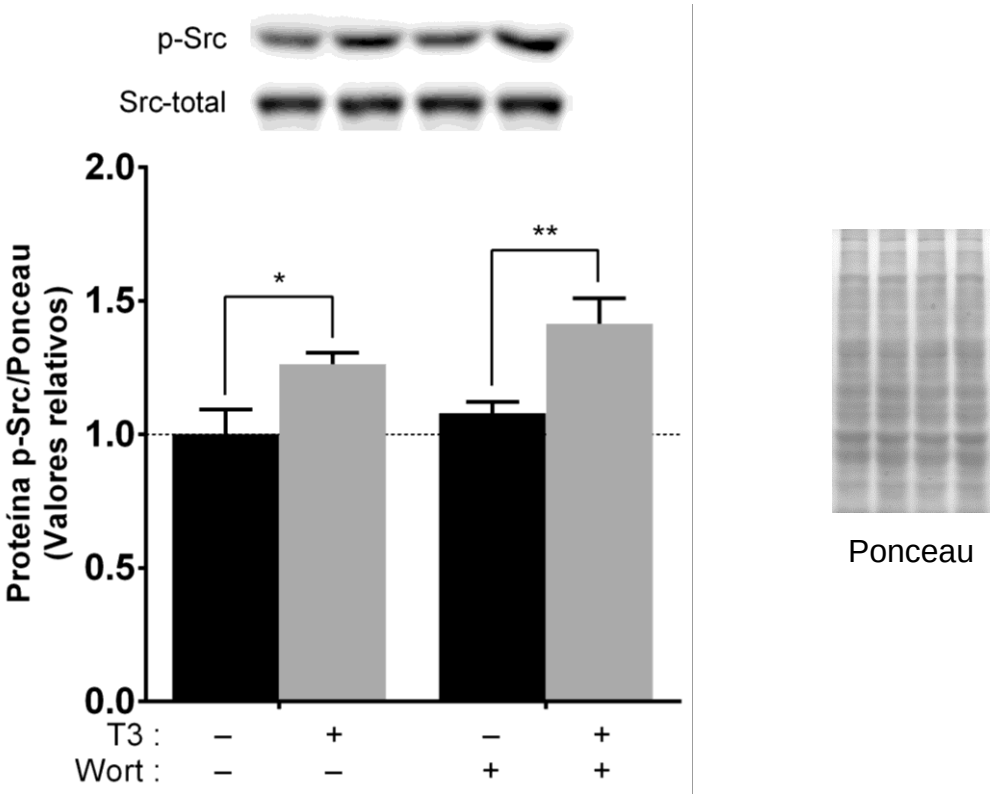
Representação da intensidade de fosforilação da Src em resposta ao T3 após tratamento das células 3T3-L1 com RGD ou RGE. As células sofreram pré-incubação por 50 min com RGD ou RGE (100 µg/mL) seguida por incubação por 5 min com T3 (1 nM). Foram depositados em cada poço do gel 40 µg de proteínas para avaliação da p-Src (Tyr^{416}) e Src-total. N = 6, (* $p < 0,05$ vs respectivos grupos controle).

A figura 12 mostra que o RGD não inibiu o aumento da fosforilação da Src pelo T3. Esse dado sugere que a integrina αVβ3 não esteja envolvida nessa ação do hormônio e levanta a possibilidade de que o T3 interaja com outro sitio intracelular, promovendo aumento da fosforilação da Src.

3.8.2 Ação do T3 sobre a fosforilação da Src após bloqueio da PI3K

Nossos dados sugerem que o aumento da fosforilação da Akt pelo T3 depende da ativação da Src, seguida da PI3K, e essa sequência de ativação já foi reportada por outros trabalhos (23, 42). Para confirmar se essa cascata de fosforilação está envolvida no efeito que estamos descrevendo, avaliamos se a ativação da PI3K pelo T3 exerce ou não algum efeito no grau de fosforilação da Src. Para tal, as células foram pré-tratadas por 30 min com 1 µM de *Wortmannin* (Sigma-Aldrich W1628), inibidor da PI3K, e em seguida tratadas com T3 por 5 minutos.

Figura 13 - Efeito do T3 sobre a fosforilação da Src em células previamente tratadas com *Wortmannin*



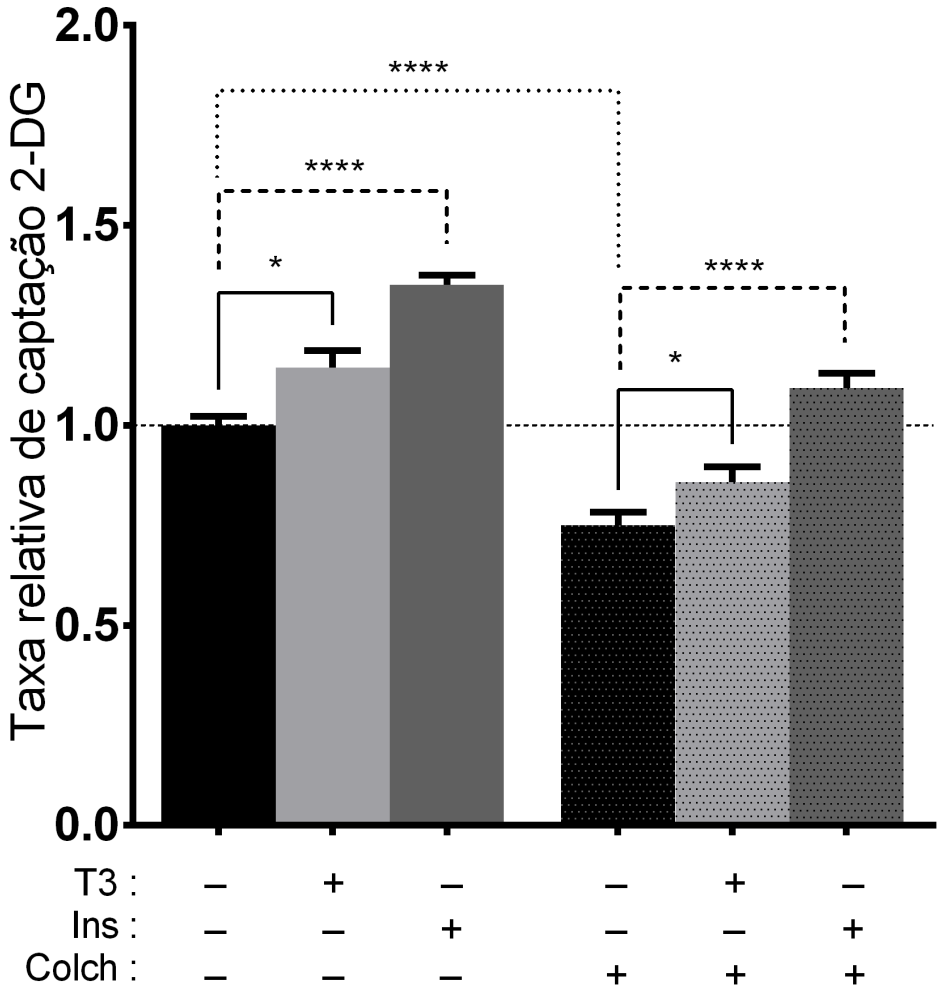
Representação da intensidade de fosforilação da Src em resposta ao T3 após tratamento das células 3T3-L1 com *Wortmannin*. As células sofreram pré-incubação por 30 min com *Wortmannin* (1 µM) seguida por incubação por 5 min com T3 (1 nM). Foram depositados em cada poço do gel 40 µg de proteínas para avaliação da p-Src (Tyr^{416}) e Src-total. N = 9, (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs respectivos grupos controle), interação não significativa. Wort = *Wortmannin.*

A figura 13 mostra que a *Wortmannin* não interferiu no aumento da fosforilação da Src pelo T3.

3.9 Avaliação da captação de 2-DG pelas células 3T3-L1 após bloqueio da formação de microtúbulos

A fim de investigar o papel da translocação de transportadores de glicose (possivelmente o GLUT4) na CGlic estimulada pelo T3, buscamos inibir a formação dos microtúbulos das células 3T3-L1, com o intuito de prejudicar o tráfego de vesículas para a MP, antes do tratamento com T3. Para isso, as células foram pré-incubadas com 10 µM de Colchicina (Sigma-Aldrich C9754) por 3 h, seguindo-se a incubação por 10 minutos com T3 ou insulina (controle positivo). O ensaio de captação de 2-DG é mostrado na figura 14.

Figura 14 - Efeito do T3 sobre a CGlic pelas células previamente tratadas com Colchicina



Taxa relativa da captação de 2-DG em resposta ao T3 após tratamento das células 3T3-L1 com Colchicina. As células sofreram pré-incubação por 3 h com Colchicina (10 µM) seguida de incubação por 10 min com T3 (1 nM) ou insulina (1 nM). N = 8, (* $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$ vs respectivos grupos controle). Ins = insulina, Colch = Colchicina.

A figura 14 mostra que o T3 e a insulina aumentaram a captação de 2-DG em relação ao grupo controle, e que a pré-incubação com Colchicina, apesar de reduzir a captação basal de 2-DG, não alterou o efeito estimulatório de ambos os hormônios nessa ação.

4 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas o número de estudos sobre as ações não-genômicas dos HTs vem aumentando consideravelmente, alterando o paradigma de que esses hormônios atuam apenas por mecanismos genômicos. Essas ações não-genômicas podem ser iniciadas na membrana plasmática ou em isoformas de TR citoplasmáticas, culminando rapidamente em efeitos fisiológicos diversos que podem envolver, tardiamente, a transcrição gênica (15, 157). Sítios de interação com os HTs também foram identificados em mitocôndria (158, 159) e retículo endoplasmático (160).

Nosso laboratório vem estudando os efeitos genômicos e não-genômicos dos HTs em diversos tecidos, em modelos *in vivo* e *in vitro*. Demonstramos que, em músculo esquelético e cardíaco de rato o T3 promoveu um rápido aumento (30 min) do conteúdo de GLUT4 na MP, bem como de sua translocação para a MP (161); que em células musculares L6 o T3 aumentou a CGlic e que em células adiposas 3T3-L1 esse hormônio aumentou o conteúdo do GLUT4, também em 30 minutos (162). Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo explorar essas ações rápidas do T3 nas células adiposas 3T3-L1, bem como os mecanismos moleculares envolvidos.

A 3T3-L1 é uma das linhagens celulares desenvolvidas para estudar o processo de diferenciação do adipócito e é considerada um modelo confiável que reproduz o padrão metabólico do tecido adiposo (163). Dentre vários genes alterados após sua diferenciação, o adipócito maduro passa a expressar o GLUT4 (164), a aumentar o conteúdo de receptor de insulina (165) e a sensibilidade ao hormônio na captação de glicose (166). Tem sido muito utilizada na elucidação de mecanismos de ações da insulina na captação de glicose do tecido adiposo (167), o que faz dessas células um bom modelo para os nossos estudos.

Considerando que nossos resultados preliminares nessas células evidenciaram aumento do conteúdo total de GLUT4 frente ao tratamento com T3 na dose de 1 nM por 30 min, e que esta proteína é a principal responsável pela captação de glicose pelas células adiposas em resposta à insulina, iniciamos nosso estudo avaliando a captação de 2-deoxi-glicose (2-DG) em resposta ao T3 (1nM) em tempos que variaram de 5 a 40 min. Detectamos, já aos 5 min de incubação com o hormônio, um aumento de aproximadamente 10% na captação 2-DG, que se tornou significativo aos 10 min, atingindo o seu pico (cerca de 20%), decaindo a seguir, e chegando aos valores do grupo controle aos 30 minutos de incubação com T3 (figura 1). Esse padrão de

resposta, ainda não descrito na literatura, talvez possa explicar o porquê da ausência de efeito sobre a captação de 2-DG nessas células, após 30 min de incubação com T3 reportado por Lin e colaboradores (151).

Esses resultados, obtidos em tão curto espaço de tempo, estão em consonância com artigos da literatura envolvendo ações não-genômicas dos HTs, que também mostraram um padrão de ação rápida e passageira (duração de minutos) desses hormônios. Lin e colaboradores mostraram que o T4 ativa a MAPK (ERK1/2) a partir de 10 min de exposição às células HeLa, com um pico de ativação entre 20 e 30 min, retornando ao nível do controle após 60 min (36). Lei e colaboradores também mostraram um padrão de resposta semelhante na ativação da ERK1/2 pelo T3 em célula alveolar, com pico de ativação aos 20 min de incubação, retornando ao basal após 2 horas (168). Em fibroblastos, o T3 promoveu um pico de fosforilação da Akt em apenas 15 min de incubação (46) e, em células de músculo liso, o pico de fosforilação dessa proteína ocorreu aos 20 min de incubação com o hormônio (147).

Levando em conta o reconhecido envolvimento da Akt na captação de glicose em resposta à insulina, e que alguns trabalhos já evidenciaram a ativação dessa enzima pelo T3, analisamos o grau de fosforilação dessa proteína, que apresentou um pico de ativação pelo T3 após 5 min de incubação das células com o hormônio (figura 2). Essa ativação ocorreu via PI3K, conforme mostrado na figura 4. Adicionalmente, nossos dados mostraram que o T3 aumentou a captação de 2-DG através da ativação da via da PI3K-Akt (figuras 3-5), já que esse efeito foi prevenido pelo tratamento prévio das células com os bloqueadores farmacológicos *Wortmannin* e *Akti1/2*, respectivamente.

As vias não-genômicas mais conhecidas como acionadas pelo T3 envolvem sua interação com o TRα (50), TRβ no citossol (149), ou com a integrina αVβ3 na membrana plasmática (42). Desta forma, avaliamos se os efeitos do T3 aqui descritos envolveriam a integrina αVβ3. Utilizamos, então, o hexapeptídeo contendo a sequência RGD (Arg-Gly-Asp) e o ácido tetraiodotiroacético (Tetrac), ambos reconhecidos por bloquearem a interação do T3 com essa integrina (42). Observamos que o peptídeo bloqueou o aumento na captação de 2-DG induzido pelo T3 (figura 6), sem, contudo alterar a fosforilação da Akt induzida pelo hormônio (figura 7). O Tetrac tampouco bloqueou a captação de 2-DG induzida pelo T3 (figura 8). Esses últimos dados vão de encontro à hipótese de que o T3 ativa esses mecanismos apenas via

integrina αVβ3, sugerindo que talvez haja uma somatória de eventos desencadeados pelo T3 a nível da membrana plasmática e intracelular.

Considerando que a Src é uma enzima que também é ativada por essa integrina, e que se encontra *upstream* à PI3K-Akt (23, 42), avaliamos a sua participação na captação de 2-DG e fosforilação da Akt induzidas por T3, por meio do bloqueio da sua atividade pelo uso do PP2. Observamos que o PP2 bloqueou o aumento da fosforilação da Akt pelo T3 (figura 9), bem como o aumento da captação de 2-DG induzida pelo hormônio (figura 10). Confirmando a participação da Src na ação do T3, mostramos que o hormônio ativou essa enzima em apenas 5 min, e que o PP2 foi eficaz em bloquear essa ativação (figura 11).

Propomos, então, que o T3 ativa a Src, levando à ativação da Akt, pois o PP2 (inibidor da Src) bloqueia essa ativação, e que essa ação ocorre via PI3K, pois seu inibidor, *Wortmannin*, impediu o aumento da fosforilação da Akt pelo T3, mas não da Src (figura 13).

Considerando que o RGD não impediu a ação do T3 sobre a fosforilação da Akt (figura 7), e nem a fosforilação da Src induzida pelo hormônio (figura 12), e que o Tetrac não bloqueou a captação de 2-DG induzida pelo T3, poderíamos sugerir que a integrina αVβ3 não participa das ações do hormônio observadas em nosso estudo. Porém, interessantemente, mostramos que o RGD inibiu o aumento da captação de 2-DG pelo T3 (figura 6). Uma hipótese seria que a integrina estaria agindo em eventos finais relacionados com a captação de glicose, como por exemplo no remodelamento do citoesqueleto de actina (169, 170). Essa ação ocorreria em paralelo com a ativação da via Src-PI3K-Akt pelo T3, por um mecanismo não iniciado ao nível da membrana, e ambos os eventos seriam necessários para a ativação da captação de 2-DG pelo hormônio. Vale comentar que, outras integrinas também reconhecem a sequência RGD, como a α3β1, α5β1, α8β1, αVβ1, αVβ5, αVβ6 e αIIbβ3 (171). No entanto, se alguma delas é capaz de ligar o T3, é algo que precisa ser investigado. Reforçando essa possibilidade, há estudos em célula tronco embrionária que mostram que a fibronectina aumentou a captação de 2-DG por meio de sua interação, em parte, com a integrina α5β1 (172).

A ativação da cascata de sinalização Src-PI3K-Akt pelo T3 não tem início apenas na integrina αVβ3. Cao e colaboradores mostraram que essa via é ativada rapidamente pelo T3 a partir do TRα1, que forma um complexo com a Src e a subunidade p85α da PI3K, em linhagem celular neuronal (173). Como dados

preliminares do nosso laboratório mostraram que, nas células 3T3-L1, o TRα1 é a isoforma de TR mais expressa (dados não mostrados), é possível que esse receptor esteja envolvido com a ação do T3 em nosso modelo.

Além do estudo de vias de sinalização intracelulares envolvidas na ativação da CGlic pelo T3, buscamos analisar, também, as repercussões dessa ativação sobre os possíveis mecanismos envolvidos na translocação do transportador de glicose, provavelmente o GLUT4, para a membrana plasmática. Nesse aspecto, os microtúbulos apresentam uma importante função no transporte dessas vesículas (75, 77, 174). Para a análise dessa estrutura, realizamos o experimento de captação de 2-DG em células pré-tratadas com o disruptor de microtúbulos, Colchicina, e incubadas, em seguida, com T3 ou insulina (figura 14). Os dados mostraram que o aumento da captação de 2-DG estimulada por T3 não depende da integridade dos microtúbulos, uma vez que, embora o pré-tratamento com Colchicina tenha reduzido a captação basal de 2-DG, a resposta de aumento da captação ao hormônio foi semelhante a observada em células não tratadas com o inibidor. A insulina foi utilizada como controle positivo, pois já foi mostrado que a pré-incubação por 3h com Colchicina bloqueia cerca de 40% da CGlic estimulada por aquele hormônio em células 3T3-L1 (75). No entanto, em nosso experimento, essa droga não teve efeito sobre a ação da insulina. O fato da Colchicina ter reduzido a captação basal de 2-DG sugere que essa droga foi efetiva em impedir a polimerização dos microtúbulos. Entretando, é necessário confirmar sua eficácia pela análise da integridade dos microtúbulos através da imunohistoquímica das células.

Ainda, em relação ao citoesqueleto, a actina também tem um importante papel na CGlic e translocação do GLUT4 para a membrana plasmática (74, 76, 175). Já foi demonstrado que o aumento da translocação do GLUT4 pela insulina depende da ativação da proteína TC10, em paralelo com a PI3K, em células 3T3-L1 (84). A TC10 está envolvida na regulação do citoesqueleto de actina (176), e esse mecanismo também participa do aumento na captação de 2-DG via GLUT1 pela fibronectina, em células tronco embrionárias, que se inicia, como já mencionado, a partir da integrina α5β1 (172). Sendo assim, o envolvimento do citoesqueleto de actina e da proteína TC10 no aumento da captação de 2-DG pelo T3 em nosso modelo merece ser investigado.

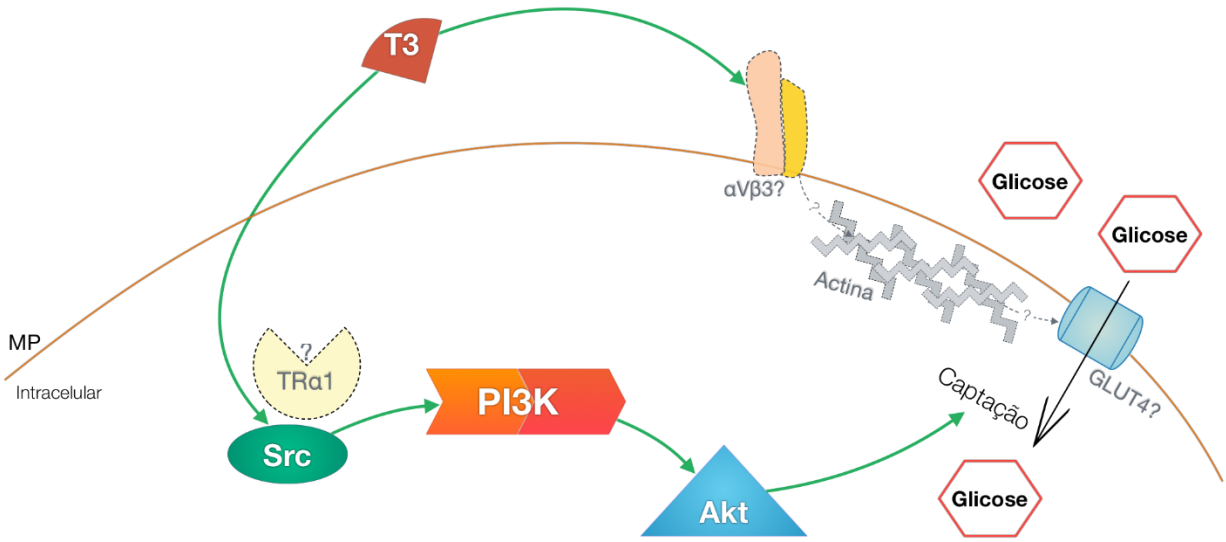
Além da análise dos possíveis mecanismos envolvidos na translocação do GLUT4, outro evento que requer nossa atenção, é a possibilidade de ativação desse

transportador presente na membrana plasmática. A ativação do GLUT4, em resposta à insulina, já foi proposta por Klip e colaboradores como sendo uma das ações adicionais desse hormônio sobre a captação de glicose (177). Além disso, estudo desenvolvido pelo nosso grupo em células L6 que superexpressam GLUT4myc mostrou que o tratamento destas com T3 por 30 min promoveu aumento da captação de glicose sem que qualquer alteração no conteúdo de GLU4myc na MP fosse detectado. Contudo aos 40 min de tratamento com T3 ocorreu aumento do conteúdo de GLUT4 na MP e aumento maior da captação de glicose (144). Também existe a possibilidade de outro transportador, como o GLUT1, estar envolvido no aumento da CGlic após tratamento com esses hormônios.

5 CONCLUSÃO

O conjunto dos dados obtidos sugere que o rápido aumento na captação de 2-DG pelo T3 envolve, ao menos, duas vias de sinalização, que seriam desencadeadas intracelularmente e na membrana plasmática. O T3, possivelmente por meio da primeira via, ativa as proteínas Src-PI3K-Akt, nessa ordem, evento que é necessário, mas não suficiente, para aumentar a captação de 2-DG nas células 3T3-L1. Esse processo, para ser efetivo, parece requerer a interação do T3 com a integrina de membrana αVβ3, já que o peptídeo contendo a sequência RGD, que impede as ações do T3 na MP via integrina, bloqueou o aumento na captação de 2-DG sem interferir na ativação daquelas proteínas. Adicionalmente, levantamos a possibilidade do TRα1 estar envolvido com a ativação da via intracelular pelo T3, e do citoesqueleto de actina participar do aumento na captação de 2-DG acionado a partir da membrana plasmática. Um resumo dessas ações é mostrado na figura 15, a seguir.

Figura 15 - Resumo do mecanismo proposto para ação do T3 sobre a captação de 2-DG em células 3T3-L1



REFERÊNCIAS*

1. Gross J, Pitt-Rivers R. Physiological activity of 3:5:3'-L-triiodothyronine. Lancet. 1952;1(6708):593-4.

2. Gross J, Pitt-Rivers R. 3:5:3'-triiodothyronine. 2. Physiological activity. Biochem J. 1953;53(4):652-7.

3. Gross J, Pitt-Rivers R. 3:5:3' -triiodothyronine. 1. Isolation from thyroid gland and synthesis. Biochem J. 1953;53(4):645-50.

4. Braverman LE, Ingbar SH, Sterling K. Conversion of thyroxine (T4) to triiodothyronine (T3) in athyreotic human subjects. J Clin Invest. 1970;49(5):855-64.

5. Oppenheimer JH, Schwartz HL, Surks MI. Propylthiouracil inhibits the conversion of L-thyroxine to L-triiodothyronine. An explanation of the antithyroxine effect of propylthiouracil and evidence supporting the concept that triiodothyronine is the active thyroid hormone. J Clin Invest. 1972;51(9):2493-7.

6. Ingbar SH, Braverman LE. Active form of the thyroid hormone. Annual Review Of Medicine. 1975;26:443-9.

7. Kohrle J. Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. Mol Cell Endocrinol. 1999;151(1-2):103-19.

8. Marsili A, Zavacki AM, Harney JW, Larsen PR. Physiological role and regulation of iodothyronine deiodinases: a 2011 update. J Endocrinol Invest. 2011;34(5):395-407.

9. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. Endocr Rev. 2002;23(1):38-89.

10. Tong W. The biological actions of thyrotropin. Pharmacol Ther B. 1975;1(4):769-800.

11. Moura EG, Moura CC. [Regulation of thyrotropin synthesis and secretion]. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2004;48(1):40-52.

12. Chiamolera MI, Wondisford FE. Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. Endocrinology. 2009;150(3):1091-6.

13. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. Physiol Rev. 2001;81(3):1097-142.

14. Barra GB, Velasco LF, Pessanha RP, Campos AM, Moura FN, Dias SM, et al. [Molecular mechanism of thyroid hormone action]. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2004;48(1):25-39.

---

*De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Avaiable from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

15. Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. Endocr Rev. 2010;31(2):139-70.

16. van der Deure WM, Peeters RP, Visser TJ. Molecular aspects of thyroid hormone transporters, including MCT8, MCT10, and OATPs, and the effects of genetic variation in these transporters. J Mol Endocrinol. 2010;44(1):1-11.

17. Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. J Clin Invest. 2012;122(9):3035-43.

18. Friesema EC, Jansen J, Visser TJ. Thyroid hormone transporters. Biochem Soc Trans. 2005;33(Pt 1):228-32.

19. Davis PJ, Leonard JL, Davis FB. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. Front Neuroendocrinol. 2008;29(2):211-8.

20. Goulart-Silva F, Serrano-Nascimento C, Texeira SS, Nunes MT. Triiodothyronine (T3) induces proinsulin gene expression by activating PI3K: possible roles for GSK-3beta and the transcriptional factor PDX-1. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2013;121(1):14-9.

21. Segal J, Ingbar SH. Evidence that an increase in cytoplasmic calcium is the initiating event in certain plasma membrane-mediated responses to 3,5,3'-triiodothyronine in rat thymocytes. Endocrinology. 1989;124(4):1949-55.

22. Incerpi S, Luly P, De Vito P, Farias RN. Short-term effects of thyroid hormones on the Na/H antiport in L-6 myoblasts: high molecular specificity for 3,3',5-triiodo-L-thyronine. Endocrinology. 1999;140(2):683-9.

23. Lei J, Mariash CN, Ingbar DH. 3,3',5-Triiodo-L-thyronine up-regulation of Na,K-ATPase activity and cell surface expression in alveolar epithelial cells is Src kinase- and phosphoinositide 3-kinase-dependent. J Biol Chem. 2004;279(46):47589-600.

24. Davis PJ, Davis FB, Lawrence WD. Thyroid hormone regulation of membrane Ca2(+)-ATPase activity. Endocr Res. 1989;15(4):651-82.

25. Zinman T, Shneyvays V, Tribulova N, Manoach M, Shainberg A. Acute, nongenomic effect of thyroid hormones in preventing calcium overload in newborn rat cardiocytes. J Cell Physiol. 2006;207(1):220-31.

26. Harper ME, Seifert EL. Thyroid hormone effects on mitochondrial energetics. Thyroid. 2008;18(2):145-56.

27. Siegrist-Kaiser CA, Juge-Aubry C, Tranter MP, Ekenbarger DM, Leonard JL. Thyroxine-dependent modulation of actin polymerization in cultured astrocytes. A novel, extranuclear action of thyroid hormone. J Biol Chem. 1990;265(9):5296-302.

28. Luegmayr E, Varga F, Frank T, Roschger P, Klaushofer K. Effects of triiodothyronine on morphology, growth behavior, and the actin cytoskeleton in mouse osteoblastic cells (MC3T3-E1). Bone. 1996;18(6):591-9.

29. Bargi-Souza P, Romano RM, Salgado Rde M, Goulart-Silva F, Brunetto EL, Zorn TM, et al. Triiodothyronine rapidly alters the TSH content and the secretory granules distribution in male rat thyrotrophs by a cytoskeleton rearrangement-independent mechanism. Endocrinology. 2013;154(12):4908-18.

30. Silva FG, Giannocco G, Luchessi AD, Curi R, Nunes MT. T3 acutely increases GH mRNA translation rate and GH secretion in hypothyroid rats. Mol Cell Endocrinol. 2010;317(1-2):1-7.

31. Segal J, Ingbar SH. Specific binding sites for the triiodothyronine in the plasma membrane of rat thymocytes. Correlation with biochemical responses. J Clin Invest. 1982;70(5):919-26.

32. Segal J, Ingbar SH. Studies of the mechanism by which 3,5,3'- triiodothyronine stimulates 2-deoxyglucose uptake in rat thymocytes in vitro. Role of calcium and adenosine 3':5'-monophosphate. J Clin Invest. 1981;68(1):103-10.

33. Pliam NB, Goldfine ID. High affinity thyroid hormone binding sites on purified rat liver plasma membranes. Biochem Biophys Res Commun. 1977;79(1):166-72.

34. Gharbi-Chihi J, Torresani J. Thyroid hormone binding to plasma membrane preparations: studies in different thyroid states and tissues. J Endocrinol Invest. 1981;4(2):177-83.

35. Dickstein Y, Schwartz H, Gross J, Gordon A. Stimulation of sugar transport in cultured heart cells by triiodothyronine (T3) covalently bound to red blood cells and by T3 in the presence of serum. Endocrinology. 1983;113(1):391-8.

36. Lin HY, Davis FB, Gordinier JK, Martino LJ, Davis PJ. Thyroid hormone induces activation of mitogen-activated protein kinase in cultured cells. Am J Physiol. 1999;276(5 Pt 1):C1014-24.

37. D'Arezzo S, Incerpi S, Davis FB, Acconcia F, Marino M, Farias RN, et al. Rapid nongenomic effects of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on the intracellular pH of L-6 myoblasts are mediated by intracellular calcium mobilization and kinase pathways. Endocrinology. 2004;145(12):5694-703.

38. Davis FB, Mousa SA, O'Connor L, Mohamed S, Lin HY, Cao HJ, et al. Proangiogenic action of thyroid hormone is fibroblast growth factor-dependent and is initiated at the cell surface. Circ Res. 2004;94(11):1500-6.

39. Shih A, Zhang S, Cao HJ, Tang HY, Davis FB, Davis PJ, et al. Disparate effects of thyroid hormone on actions of epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are mediated by 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase II. Endocrinology. 2004;145(4):1708-17.

40. Segal J, Ingbar SH. The effect of trypsinization on the plasma membrane binding and action of 3,5,3'-triiodothyronine in rat thymocytes. Endocrinology. 1986;118(5):1863-8.

41. Bergh JJ, Lin HY, Lansing L, Mohamed SN, Davis FB, Mousa S, et al. Integrin alphaVbeta3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. Endocrinology. 2005;146(7):2864-71.

42. Lin HY, Sun M, Tang HY, Lin C, Luidens MK, Mousa SA, et al. L-Thyroxine vs. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. Am J Physiol Cell Physiol. 2009;296(5):C980-91.

43. Lei J, Ingbar DH. Src kinase integrates PI3K/Akt and MAPK/ERK1/2 pathways in T3-induced Na-K-ATPase activity in adult rat alveolar cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2011;301(5):L765-71.

44. Zhu XG, Hanover JA, Hager GL, Cheng SY. Hormone-induced translocation of thyroid hormone receptors in living cells visualized using a receptor green fluorescent protein chimera. J Biol Chem. 1998;273(42):27058-63.

45. Baumann CT, Maruvada P, Hager GL, Yen PM. Nuclear cytoplasmic shuttling by thyroid hormone receptors. multiple protein interactions are required for nuclear retention. J Biol Chem. 2001;276(14):11237-45.

46. Cao X, Kambe F, Moeller LC, Refetoff S, Seo H. Thyroid hormone induces rapid activation of Akt/protein kinase B-mammalian target of rapamycin-p70S6K cascade through phosphatidylinositol 3-kinase in human fibroblasts. Mol Endocrinol. 2005;19(1):102-12.

47. Moeller LC, Cao X, Dumitrescu AM, Seo H, Refetoff S. Thyroid hormone mediated changes in gene expression can be initiated by cytosolic action of the thyroid hormone receptor beta through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Nucl Recept Signal. 2006;4:e020.

48. Lin HY, Zhang S, West BL, Tang HY, Passaretti T, Davis FB, et al. Identification of the putative MAP kinase docking site in the thyroid hormone receptor-beta1 DNA-binding domain: functional consequences of mutations at the docking site. Biochemistry. 2003;42(24):7571-9.

49. Cao HJ, Lin HY, Luidens MK, Davis FB, Davis PJ. Cytoplasm-to-nucleus shuttling of thyroid hormone receptor-beta1 (Trbeta1) is directed from a plasma membrane integrin receptor by thyroid hormone. Endocr Res. 2009;34(1-2):31-42.

50. Hiroi Y, Kim HH, Ying H, Furuya F, Huang Z, Simoncini T, et al. Rapid nongenomic actions of thyroid hormone. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(38):14104-9.

51. Leonard JL, Farwell AP, Yen PM, Chin WW, Stula M. Differential expression of thyroid hormone receptor isoforms in neurons and astroglial cells. Endocrinology. 1994;135(2):548-55.

52. Leonard JL, Farwell AP. Cytoskeletal actions of iodothyronines. Hot Thyroidology. 2006.

53. Elbrink J, Bihler I. Membrane transport: its relation to cellular metabolic rates. Science. 1975;188(4194):1177-84.

54. Gerich JE. Physiology of glucose homeostasis. Diabetes Obes Metab. 2000;2(6):345-50.

55. Le FP. Evidence of active transfer of certain non-electrolytes across the human red cell membrane. J Gen Physiol. 1948;31(6):505-27.

56. Thorens B, Mueckler M. Glucose transporters in the 21st Century. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2010;298(2):E141-5.

57. Uldry M, Thorens B. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. Pflugers Arch. 2004;447(5):480-9.

58. Ishiki M, Klip A. Minireview: recent developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: new signals, locations, and partners. Endocrinology. 2005;146(12):5071-8.

59. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care. 2004;27(5):1047-53.

60. Wilson JE. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. J Exp Biol. 2003;206(Pt 12):2049-57.

61. Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari V, Maratou E, Raptis SA. Insulin effects in muscle and adipose tissue. Diabetes Res Clin Pract. 2011;93 Suppl 1:S52-9.

62. Richter EA, Ruderman NB. AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease. Biochem J. 2009;418(2):261-75.

63. Ullrich A, Bell JR, Chen EY, Herrera R, Petruzzelli LM, Dull TJ, et al. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. Nature. 1985;313(6005):756-61.

64. Myers MG, Jr., White MF. Insulin signal transduction and the IRS proteins. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1996;36:615-58.

65. Rameh LE, Cantley LC. The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. J Biol Chem. 1999;274(13):8347-50.

66. Bhaskar PT, Hay N. The two TORCs and Akt. Dev Cell. 2007;12(4):487-502.

67. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. Science. 2005;307(5712):1098-101.

68. Zeigerer A, McBrayer MK, McGraw TE. Insulin stimulation of GLUT4 exocytosis, but not its inhibition of endocytosis, is dependent on RabGAP AS160. Mol Biol Cell. 2004;15(10):4406-15.

69. Larance M, Ramm G, Stockli J, van Dam EM, Winata S, Wasinger V, et al. Characterization of the role of the Rab GTPase-activating protein AS160 in insulin-regulated GLUT4 trafficking. J Biol Chem. 2005;280(45):37803-13.

70. Ishikura S, Koshkina A, Klip A. Small G proteins in insulin action: Rab and Rho families at the crossroads of signal transduction and GLUT4 vesicle traffic. Acta Physiol (Oxf). 2008;192(1):61-74.

71. Bandyopadhyay G, Standaert ML, Zhao L, Yu B, Avignon A, Galloway L, et al. Activation of protein kinase C (alpha, beta, and zeta) by insulin in 3T3/L1 cells. Transfection studies suggest a role for PKC-zeta in glucose transport. J Biol Chem. 1997;272(4):2551-8.

72. Standaert ML, Galloway L, Karnam P, Bandyopadhyay G, Moscat J, Farese RV. Protein kinase C-zeta as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport. J Biol Chem. 1997;272(48):30075-82.

73. Kotani K, Ogawa W, Matsumoto M, Kitamura T, Sakaue H, Hino Y, et al. Requirement of atypical protein kinase clambda for insulin stimulation of glucose uptake but not for Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. Mol Cell Biol. 1998;18(12):6971-82.

74. Kanzaki M, Pessin JE. Insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes is dependent upon cortical actin remodeling. J Biol Chem. 2001;276(45):42436-44.

75. Fletcher LM, Welsh GI, Oatey PB, Tavare JM. Role for the microtubule cytoskeleton in GLUT4 vesicle trafficking and in the regulation of insulin-stimulated glucose uptake. Biochem J. 2000;352 Pt 2:267-76.

76. Tong P, Khayat ZA, Huang C, Patel N, Ueyama A, Klip A. Insulin-induced cortical actin remodeling promotes GLUT4 insertion at muscle cell membrane ruffles. J Clin Invest. 2001;108(3):371-81.

77. Liu LB, Omata W, Kojima I, Shibata H. Insulin recruits GLUT4 from distinct compartments via distinct traffic pathways with differential microtubule dependence in rat adipocytes. J Biol Chem. 2003;278(32):30157-69.

78. Foster LJ, Rudich A, Talior I, Patel N, Huang X, Furtado LM, et al. Insulin-dependent interactions of proteins with GLUT4 revealed through stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). J Proteome Res. 2006;5(1):64-75.

79. Talior-Volodarsky I, Randhawa VK, Zaid H, Klip A. Alpha-actinin-4 is selectively required for insulin-induced GLUT4 translocation. J Biol Chem. 2008;283(37):25115-23.

80. Khayat ZA, Tong P, Yaworsky K, Bloch RJ, Klip A. Insulin-induced actin filament remodeling colocalizes actin with phosphatidylinositol 3-kinase and GLUT4 in L6 myotubes. J Cell Sci. 2000;113 Pt 2:279-90.

81. JeBailey L, Wanono O, Niu W, Roessler J, Rudich A, Klip A. Ceramide- and oxidant-induced insulin resistance involve loss of insulin-dependent Rac-activation and actin remodeling in muscle cells. Diabetes. 2007;56(2):394-403.

82. Liu LZ, Zhao HL, Zuo J, Ho SK, Chan JC, Meng Y, et al. Protein kinase Czeta mediates insulin-induced glucose transport through actin remodeling in L6 muscle cells. Mol Biol Cell. 2006;17(5):2322-30.

83. Ribon V, Printen JA, Hoffman NG, Kay BK, Saltiel AR. A novel, multifuntional c-Cbl binding protein in insulin receptor signaling in 3T3-L1 adipocytes. Mol Cell Biol. 1998;18(2):872-9.

84. Chiang SH, Baumann CA, Kanzaki M, Thurmond DC, Watson RT, Neudauer CL, et al. Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. Nature. 2001;410(6831):944-8.

85. Chang L, Chiang SH, Saltiel AR. TC10alpha is required for insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes. Endocrinology. 2007;148(1):27-33.

86. Mitra P, Zheng X, Czech MP. RNAi-based analysis of CAP, Cbl, and CrkII function in the regulation of GLUT4 by insulin. J Biol Chem. 2004;279(36):37431-5.

87. JeBailey L, Rudich A, Huang X, Di Ciano-Oliveira C, Kapus A, Klip A. Skeletal muscle cells and adipocytes differ in their reliance on TC10 and Rac for insulin-induced actin remodeling. Mol Endocrinol. 2004;18(2):359-72.

88. Karnieli E, Garvey WT, Olefsky JM, Hueckstead TP, Harel C, Maianu L, et al. Potential role for insulin and cycloheximide in regulating the intrinsic activity of glucose transporters in isolated rat adipocytes. Endocrinology. 1993;133(6):2943-50.

89. Armoni M, Harel C, Burvin R, Karnieli E. Modulation of the activity of glucose transporters (GLUT) in the aged/obese rat adipocyte: suppressed function, but enhanced intrinsic activity of GLUT. Endocrinology. 1995;136(8):3292-8.

90. Moyers JS, Bilan PJ, Reynet C, Kahn CR. Overexpression of Rad inhibits glucose uptake in cultured muscle and fat cells. J Biol Chem. 1996;271(38):23111-6.

91. Jiang T, Sweeney G, Rudolf MT, Klip A, Traynor-Kaplan A, Tsien RY. Membrane-permeant esters of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. J Biol Chem. 1998;273(18):11017-24.

92. Sweeney G, Garg RR, Ceddia RB, Li D, Ishiki M, Somwar R, et al. Intracellular delivery of phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate causes incorporation of glucose transporter 4 into the plasma membrane of muscle and fat cells without increasing glucose uptake. J Biol Chem. 2004;279(31):32233-42.

93. Ishiki M, Randhawa VK, Poon V, Jebailey L, Klip A. Insulin regulates the membrane arrival, fusion, and C-terminal unmasking of glucose transporter-4 via distinct phosphoinositides. J Biol Chem. 2005;280(31):28792-802.

94. Zaid H, Talior-Volodarsky I, Antonescu C, Liu Z, Klip A. GAPDH binds GLUT4 reciprocally to hexokinase-II and regulates glucose transport activity. Biochem J. 2009;419(2):475-84.

95. Lee JO, Lee SK, Jung JH, Kim JH, You GY, Kim SJ, et al. Metformin induces Rab4 through AMPK and modulates GLUT4 translocation in skeletal muscle cells. J Cell Physiol. 2011;226(4):974-81.

96. Niu W, Bilan PJ, Ishikura S, Schertzer JD, Contreras-Ferrat A, Fu Z, et al. Contraction-related stimuli regulate GLUT4 traffic in C2C12-GLUT4myc skeletal muscle cells. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2010;298(5):E1058-71.

97. Holmes BF, Sparling DP, Olson AL, Winder WW, Dohm GL. Regulation of muscle GLUT4 enhancer factor and myocyte enhancer factor 2 by AMP-activated protein kinase. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2005;289(6):E1071-6.

98. Zheng D, MacLean PS, Pohnert SC, Knight JB, Olson AL, Winder WW, et al. Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase. J Appl Physiol (1985). 2001;91(3):1073-83.

99. Hardie DG. Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase. Am J Clin Nutr. 2011;93(4):891S-6.

100. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. J Clin Invest. 2001;108(8):1167-74.

101. Davies SP, Hawley SA, Woods A, Carling D, Haystead TA, Hardie DG. Purification of the AMP-activated protein kinase on ATP-gamma-sepharose and analysis of its subunit structure. Eur J Biochem. 1994;223(2):351-7.

102. Hawley SA, Davison M, Woods A, Davies SP, Beri RK, Carling D, et al. Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. J Biol Chem. 1996;271(44):27879-87.

103. Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, Neumann D, et al. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. Curr Biol. 2003;13(22):2004-8.

104. Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, Mustard KJ, Udd L, Makela TP, et al. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. J Biol. 2003;2(4):28.

105. Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM, et al. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. Cell Metab. 2005;2(1):9-19.

106. Woods A, Dickerson K, Heath R, Hong SP, Momcilovic M, Johnstone SR, et al. Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. Cell Metab. 2005;2(1):21-33.

107. Hawley SA, Ross FA, Chevtzoff C, Green KA, Evans A, Fogarty S, et al. Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. Cell Metab. 2010;11(6):554-65.

108. Lee JO, Lee SK, Kim JH, Kim N, You GY, Moon JW, et al. Metformin regulates glucose transporter 4 (GLUT4) translocation through AMP-activated protein kinase (AMPK)-mediated Cbl/CAP signaling in 3T3-L1 preadipocyte cells. J Biol Chem. 2012;287(53):44121-9.

109. Yamaguchi S, Katahira H, Ozawa S, Nakamichi Y, Tanaka T, Shimoyama T, et al. Activators of AMP-activated protein kinase enhance GLUT4 translocation and its glucose transport activity in 3T3-L1 adipocytes. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2005;289(4):E643-9.

110. Shen Y, Honma N, Kobayashi K, Jia LN, Hosono T, Shindo K, et al. Cinnamon Extract Enhances Glucose Uptake in 3T3-L1 Adipocytes and C2C12 Myocytes by Inducing LKB1-AMP-Activated Protein Kinase Signaling. PLoS One. 2014;9(2):e87894.

111. Chen HC, Bandyopadhyay G, Sajan MP, Kanoh Y, Standaert M, Farese RV, Jr., et al. Activation of the ERK pathway and atypical protein kinase C isoforms in exercise- and aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-riboside (AICAR)-stimulated glucose transport. J Biol Chem. 2002;277(26):23554-62.

112. Sajan MP, Bandyopadhyay G, Miura A, Standaert ML, Nimal S, Longnus SL, et al. AICAR and metformin, but not exercise, increase muscle glucose transport through AMPK-, ERK-, and PDK1-dependent activation of atypical PKC. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2010;298(2):E179-92.

113. Wojtaszewski JF, Lynge J, Jakobsen AB, Goodyear LJ, Richter EA. Differential regulation of MAP kinase by contraction and insulin in skeletal muscle: metabolic implications. Am J Physiol. 1999;277(4 Pt 1):E724-32.

114. Hayashi T, Hirshman MF, Dufresne SD, Goodyear LJ. Skeletal muscle contractile activity in vitro stimulates mitogen-activated protein kinase signaling. Am J Physiol. 1999;277(4 Pt 1):C701-7.

115. Kim JH, Park JM, Yea K, Kim HW, Suh PG, Ryu SH. Phospholipase D1 mediates AMP-activated protein kinase signaling for glucose uptake. PLoS One. 2010;5(3):e9600.

116. Turban S, Stretton C, Drouin O, Green CJ, Watson ML, Gray A, et al. Defining the contribution of AMP-activated protein kinase (AMPK) and protein kinase C (PKC) in regulation of glucose uptake by metformin in skeletal muscle cells. J Biol Chem. 2012;287(24):20088-99.

117. Okajima F, Ui M. Metabolism of glucose in hyper- and hypo-thyroid rats in vivo. Glucose-turnover values and futile-cycle activities obtained with 14C- and 3H-labelled glucose. Biochem J. 1979;182(2):565-75.

118. Dimitriadis GD, Leighton B, Vlachonikolis IG, Parry-Billings M, Challiss RA, West D, et al. Effects of hyperthyroidism on the sensitivity of glycolysis and glycogen synthesis to insulin in the soleus muscle of the rat. Biochem J. 1988;253(1):87-92.

119. Casla A, Rovira A, Wells JA, Dohm GL. Increased glucose transporter (GLUT4) protein expression in hyperthyroidism. Biochem Biophys Res Commun. 1990;171(1):182-8.

120. Weinstein SP, Watts J, Haber RS. Thyroid hormone increases muscle/fat glucose transporter gene expression in rat skeletal muscle. Endocrinology. 1991;129(1):455-64.

121. Weinstein SP, O'Boyle E, Haber RS. Thyroid hormone increases basal and insulin-stimulated glucose transport in skeletal muscle. The role of GLUT4 glucose transporter expression. Diabetes. 1994;43(10):1185-9.

122. Torrance CJ, Devente JE, Jones JP, Dohm GL. Effects of thyroid hormone on GLUT4 glucose transporter gene expression and NIDDM in rats. Endocrinology. 1997;138(3):1204-14.

123. Matthaei S, Trost B, Hamann A, Kausch C, Benecke H, Greten H, et al. Effect of in vivo thyroid hormone status on insulin signalling and GLUT1 and GLUT4 glucose transport systems in rat adipocytes. J Endocrinol. 1995;144(2):347-57.

124. Ulisse S, Jannini EA, Pepe M, De Matteis S, D'Armiento M. Thyroid hormone stimulates glucose transport and GLUT1 mRNA in rat Sertoli cells. Mol Cell Endocrinol. 1992;87(1-3):131-7.

125. Segal J, Schwartz H, Gordon A. The effect of triiodothyronine on 2-deoxy-D-(1-3H)glucose uptake in cultured chick embryo heart cells. Endocrinology. 1977;101(1):143-9.

126. Weinstein SP, Watts J, Graves PN, Haber RS. Stimulation of glucose transport by thyroid hormone in ARL 15 cells: increased abundance of glucose transporter protein and messenger ribonucleic acid. Endocrinology. 1990;126(3):1421-9.

127. Romero R, Casanova B, Pulido N, Suarez AI, Rodriguez E, Rovira A. Stimulation of glucose transport by thyroid hormone in 3T3-L1 adipocytes: increased abundance of GLUT1 and GLUT4 glucose transporter proteins. J Endocrinol. 2000;164(2):187-95.

128. Santalucia T, Palacin M, Zorzano A. T3 strongly regulates GLUT1 and GLUT3 mRNA in cerebral cortex of hypothyroid rat neonates. Mol Cell Endocrinol. 2006;251(1-2):9-16.

129. Dimitriadis G, Maratou E, Alevizaki M, Boutati E, Psara K, Papasteriades C, et al. Thyroid hormone excess increases basal and insulin-stimulated recruitment of GLUT3 glucose transporters on cell surface. Horm Metab Res. 2005;37(1):15-20.

130. Castello A, Rodriguez-Manzaneque JC, Camps M, Perez-Castillo A, Testar X, Palacin M, et al. Perinatal hypothyroidism impairs the normal transition of GLUT4 and GLUT1 glucose transporters from fetal to neonatal levels in heart and brown adipose tissue. Evidence for tissue-specific regulation of GLUT4 expression by thyroid hormone. J Biol Chem. 1994;269(8):5905-12.

131. Torrance CJ, Usala SJ, Pessin JE, Dohm GL. Characterization of a low affinity thyroid hormone receptor binding site within the rat GLUT4 gene promoter. Endocrinology. 1997;138(3):1215-23.

132. Richardson JM, Pessin JE. Identification of a skeletal muscle-specific regulatory domain in the rat GLUT4/muscle-fat gene. J Biol Chem. 1993;268(28):21021-7.

133. Lin Y, Sun Z. Thyroid hormone potentiates insulin signaling and attenuates hyperglycemia and insulin resistance in a mouse model of type 2 diabetes. Br J Pharmacol. 2011;162(3):597-610.

134. Kim SR, Tull ES, Talbott EO, Vogt MT, Kuller LH. A hypothesis of synergism: the interrelationship of T3 and insulin to disturbances in metabolic homeostasis. Med Hypotheses. 2002;59(6):660-6.

135. Wang C. The Relationship between Type 2 Diabetes Mellitus and Related Thyroid Diseases. J Diabetes Res. 2013;2013:390534.

136. Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari V, Boutati E, Maratou E, Panagiotakos DB, et al. Insulin action in adipose tissue and muscle in hypothyroidism. J Clin Endocrinol Metab. 2006;91(12):4930-7.

137. Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari V, Boutati E, Maratou E, Koukkou E, et al. Glucose and lipid fluxes in the adipose tissue after meal ingestion in hyperthyroidism. J Clin Endocrinol Metab. 2006;91(3):1112-8.

138. Segal J, Gordon A. The effects of actinomycin D, puromycin, cycloheximide and hydroxyurea on 3',5,3-triiodo-L-thyronine stimulated 2-deoxy-D-glucose uptake in chick embryo heart cells in vitro. Endocrinology. 1977;101(1):150-6.

139. Segal J. Acute effect of thyroid hormone on the heart: an extranuclear increase in sugar uptake. J Mol Cell Cardiol. 1989;21(3):323-34.

140. Segal J, Ingbar SH. Stimulation by triiodothyronine of the in vitro uptake of sugars by rat thymocytes. J Clin Invest. 1979;63(3):507-15.

141. Segal J, Ingbar SH. In vivo stimulation of sugar uptake in rat thymocytes. An extranuclear action of 3,5,3'-triiodothyronine. J Clin Invest. 1985;76(4):1575-80.

142. Segal J. A rapid, extranuclear effect of 3,5,3'-triiodothyronine on sugar uptake by several tissues in the rat in vivo. Evidence for a physiological role for the thyroid hormone action at the level of the plasma membrane. Endocrinology. 1989;124(6):2755-64.

143. Brunetto EL, Teixeira Sda S, Giannocco G, Machado UF, Nunes MT. T3 rapidly increases SLC2A4 gene expression and GLUT4 trafficking to the plasma membrane in skeletal muscle of rat and improves glucose homeostasis. Thyroid. 2012;22(1):70-9.

144. Teixeira SS, Tamrakar AK, Goulart-Silva F, Serrano-Nascimento C, Klip A, Nunes MT. Triiodothyronine acutely stimulates glucose transport into L6 muscle cells without increasing surface GLUT4, GLUT1, or GLUT3. Thyroid. 2012;22(7):747-54.

145. Incerpi S, De Vito P, Luly P, Spagnuolo S, Leoni S. Short-term effects of thyroid hormones and 3,5-diiodothyronine on membrane transport systems in chick embryo hepatocytes. Endocrinology. 2002;143(5):1660-8.

146. Storey NM, Gentile S, Ullah H, Russo A, Muessel M, Erxleben C, et al. Rapid signaling at the plasma membrane by a nuclear receptor for thyroid hormone. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(13):5197-201.

147. Carrillo-Sepulveda MA, Ceravolo GS, Fortes ZB, Carvalho MH, Tostes RC, Laurindo FR, et al. Thyroid hormone stimulates NO production via activation of the PI3K/Akt pathway in vascular myocytes. Cardiovasc Res. 2010;85(3):560-70.

148. Furuya F, Hanover JA, Cheng SY. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling by a mutant thyroid hormone beta receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(6):1780-5.

149. Verga Falzacappa C, Patriarca V, Bucci B, Mangialardo C, Michienzi S, Moriggi G, et al. The TRbeta1 is essential in mediating T3 action on Akt pathway in human pancreatic insulinoma cells. J Cell Biochem. 2009;106(5):835-48.

150. Gordon A, Swartz H, Shwartz H. 3,5,3' Triiodo-L-thyronine stimulates 2-deoxy-D-glucose transport into L6 muscle cells through the phosphorylation of insulin receptor beta and the activation of PI-3k. Thyroid. 2006;16(6):521-9.

151. Lin Y, Sun Z. Thyroid hormone promotes insulin-induced glucose uptake by enhancing Akt phosphorylation and VAMP2 translocation in 3T3-L1 adipocytes. J Cell Physiol. 2011;226(10):2625-32.

152. Ramirez-Zacarias JL, Castro-Munozledo F, Kuri-Harcuch W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. Histochemistry. 1992;97(6):493-7.

153. Wick AN, Drury DR, Nakada HI, Wolfe JB. Localization of the primary metabolic block produced by 2-deoxyglucose. J Biol Chem. 1957;224(2):963-9.

154. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259):680-5.

155. Rasband WS. ImageJ. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA: http://imagej.nih.gov/ij/; 1997-2014.

156. Huveneers S, van den Bout I, Sonneveld P, Sancho A, Sonnenberg A, Danen EH. Integrin alpha v beta 3 controls activity and oncogenic potential of primed c-Src. Cancer Res. 2007;67(6):2693-700.

157. Moeller LC, Broecker-Preuss M. Transcriptional regulation by nonclassical action of thyroid hormone. Thyroid Res. 2011;4 Suppl 1:S6.

158. Psarra AM, Solakidi S, Sekeris CE. The mitochondrion as a primary site of action of steroid and thyroid hormones: presence and action of steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. Mol Cell Endocrinol. 2006;246(1-2):21-33.

159. Kato H, Fukuda T, Parkison C, McPhie P, Cheng SY. Cytosolic thyroid hormone-binding protein is a monomer of pyruvate kinase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86(20):7861-5.

160. Cheng SY, Gong QH, Parkison C, Robinson EA, Appella E, Merlino GT, et al. The nucleotide sequence of a human cellular thyroid hormone binding protein present in endoplasmic reticulum. J Biol Chem. 1987;262(23):11221-7.

161. Brunetto EL. Efeito do hormônio tireoideano sobre a expressão gênica e a translocação do GLUT4 no músculo esquelético e cardíaco. [dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2006.

162. Teixeira SS. Mecanismos envolvidos na ação não genômica do hormônio tireoidiano sobre a expressão e translocação da isoforma 4 do transportador de glicose (GLUT4) : estudo no tecido muscular esquelético e adiposo. [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2010.

163. MacDougald OA, Lane MD. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. Annu Rev Biochem. 1995;64:345-73.

164. Garcia de Herreros A, Birnbaum MJ. The acquisition of increased insulin-responsive hexose transport in 3T3-L1 adipocytes correlates with expression of a novel transporter gene. J Biol Chem. 1989;264(33):19994-9.

165. Reed BC, Kaufmann SH, Mackall JC, Student AK, Lane MD. Alterations in insulin binding accompanying differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977;74(11):4876-80.

166. Resh MD. Development of insulin responsiveness of the glucose transporter and the (Na+,K+)-adenosine triphosphatase during in vitro adipocyte differentiation. J Biol Chem. 1982;257(12):6978-86.

167. Khan AH, Pessin JE. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. Diabetologia. 2002;45(11):1475-83.

168. Lei J, Mariash CN, Bhargava M, Wattenberg EV, Ingbar DH. T3 increases Na-K-ATPase activity via a MAPK/ERK1/2-dependent pathway in rat adult alveolar epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2008;294(4):L749-54.

169. Lin Y, Rao J, Zha XL, Xu H. Angiopoietin-like 3 induces podocyte F-actin rearrangement through integrin alpha(V)beta(3)/FAK/PI3K pathway-mediated Rac1 activation. Biomed Res Int. 2013;2013:135608.

170. Yu CH, Law JB, Suryana M, Low HY, Sheetz MP. Early integrin binding to Arg-Gly-Asp peptide activates actin polymerization and contractile movement that stimulates outward translocation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(51):20585-90.

171. Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. Ligand binding to integrins. J Biol Chem. 2000;275(29):21785-8.

172. Suh HN, Han HJ. Fibronectin-induced VEGF receptor and calcium channel transactivation stimulate GLUT-1 synthesis and trafficking through PPARgamma and TC10 in mouse embryonic stem cells. Stem Cell Res. 2013;10(3):371-86.

173. Cao X, Kambe F, Yamauchi M, Seo H. Thyroid-hormone-dependent activation of the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade requires Src and enhances neuronal survival. Biochem J. 2009;424(2):201-9.

174. Semiz S, Park JG, Nicoloro SM, Furcinitti P, Zhang C, Chawla A, et al. Conventional kinesin KIF5B mediates insulin-stimulated GLUT4 movements on microtubules. Embo J. 2003;22(10):2387-99.

175. Omata W, Shibata H, Li L, Takata K, Kojima I. Actin filaments play a critical role in insulin-induced exocytotic recruitment but not in endocytosis of GLUT4 in isolated rat adipocytes. Biochem J. 2000;346 Pt 2:321-8.

176. Kanzaki M, Watson RT, Hou JC, Stamnes M, Saltiel AR, Pessin JE. Small GTP-binding protein TC10 differentially regulates two distinct populations of filamentous actin in 3T3L1 adipocytes. Mol Biol Cell. 2002;13(7):2334-46.

177. Somwar R, Kim DY, Sweeney G, Huang C, Niu W, Lador C, et al. GLUT4 translocation precedes the stimulation of glucose uptake by insulin in muscle cells: potential activation of GLUT4 via p38 mitogen-activated protein kinase. Biochem J. 2001;359(Pt 3):639-49.