RAQUEL SALDANHA CAMPELLO

17 β -ESTRADIOL AUMENTA A EXPRESSÃO DE *Slc2a4*/GLUT4
EM ADIPÓCITOS 3T3-L1 VIA ESR1

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
2012

RAQUEL SALDANHA CAMPELLO

17 β -ESTRADIOL AUMENTA A EXPRESSÃO DE *Slc2a4*/GLUT4
EM ADIPÓCITOS 3T3-L1 VIA ESR1

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

Orientador: Prof. Dr. Ubiratan Fabres
Machado

Versão original

São Paulo
2012

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

Campello, Raquel Saldanha.

17 β estradiol aumenta a expressão de *Slc2a4*/GLUT4 em adipócitos 3T3-L1 via ESR1 / Raquel Saldanha Campello. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Metabolismo e endocrinologia.

Versão do título para o inglês: 17 β estradiol increases *Slc2a4*/GLUT4 expression in 3T3-L1 adipocytes via ESR1.

1. Adipócito 2. 17 β -estradiol 3. *Slc2a4* 4. GLUT4 5. ESR1
6. Nuclear Factor- κ B I. Machado, Prof. Dr. Ubiratan Fabres II.
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0182/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Raquel Saldanha Campello.

Título da Tese: 17 β estradiol aumenta a expressão de Slc2a4/GLUT4 em adipócitos 3T3-L1 via ESR1.

Orientador(a): Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado.

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) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 294, referente ao projeto intitulado: *“Regulação da expressão do gene do GLUT4 pelo estrógeno: Papel dos receptores Era e ERB “* sob a responsabilidade de **Raquel Saldanha Campello**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 24 de março de 2009.

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

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

RESUMO

CAMPELLO, R. S. **17 β -estradiol aumenta a expressão de *Slc2a4*/GLUT4 em adipócitos 3T3-L1 via ESR1.** 2012. 75 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A resistência à insulina (RI) manifesta-se como uma reduzida capacidade dos tecidos sensíveis à insulina responderem a níveis normais do hormônio. Nestes tecidos, o transportador de glicose GLUT4 (gene *Slc2a4*) é responsável pela captação de glicose estimulada pela insulina, e alterações na expressão deste transportador estão relacionadas à RI. Sabe-se que o estradiol (E2) está envolvido na regulação de genes, sendo que seu mecanismo de ação envolve a sua ligação aos seus receptores (ESR1 e ESR2), modulando a expressão de genes através de sua ligação direta ao DNA ou através da interação com fatores transcricionais, dentre eles o NF- κ B (Nuclear Factor- κ B), sugerido como um regulador negativo do *Slc2a4*. A literatura demonstra que variações na concentração de E2 estão relacionadas a RI e diminuição na expressão de *Slc2a4*/GLUT4, entretanto, o papel de cada um dos receptores neste mecanismo ainda não está completamente elucidado. Com isso, avaliou-se em células adiposas da linhagem 3T3-L1 a regulação da expressão de *Slc2a4*/GLUT4 e da captação de glicose pelo E2, o papel de cada um dos receptores nesta regulação, bem como a participação de NF- κ B neste mecanismo. Para tanto, adipócitos 3T3-L1 foram tratados por 1 dia com diferentes concentrações de 17 β -estradiol e avaliou-se a localização subcelular de ESR1 e ESR2 por imunofluorescência. Também se verificou a expressão de *Slc2a4*/GLUT4 (real time PCR e Western blotting, respectivamente) e a atividade de ligação de NF- κ B na região promotora do gene *Slc2a4* (EMSA). Adicionalmente, avaliou-se a captação de glicose pelas células. A participação de cada receptor nos mecanismos acima descritos foi avaliada a partir da exposição dos adipócitos à agonistas seletivos de ESR1 (PPT: 1,3,5-tris(4-hydroxyphenyl)-4-propyl-1H-pyrazole) e ESR2 (DPN: 2,3-bis(4-Hydroxyphenyl)-propionitrile) e antagonistas seletivos de ESR1 (MPP: 1,3-Bis(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-5-[4-(2-piperidinylethoxy)phenol]-1H-pyrazole dihydrochloride) e ESR2 (PHTPP: 4-[2-Phenyl-5,7-bis(trifluoromethyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]phenol) na ausência ou presença de E2. Na presença de 0,1 e 10 nM de E2 houve um aumento na expressão de *Slc2a4*/GLUT4 (20-50%) e na captação de glicose pelas células (~30%). Observou-se que ambos os receptores estão co-localizados em núcleo, com predominância de ESR1 e, após tratamento com 10 nM de E2, houve translocação deste receptor para a membrana plasmática. A atividade de ligação de NF- κ B foi reduzida (~25%) na presença de 0,1 nM de hormônio. O tratamento com PPT aumentou a expressão de *Slc2a4*/GLUT4 (~30%) na ausência ou presença de E2 e diminuiu a atividade de ligação de NF- κ B (~50%), enquanto o MPP, na presença de E2, diminuiu a expressão de *Slc2a4*/GLUT4 (~20-40%) e aumentou a atividade de ligação de NF- κ B (~30%). Além disso, o PHTPP aumentou a expressão de *Slc2a4* (~40%) e diminuiu a atividade de ligação de NF- κ B (~70%) na ausência ou presença de E2. Todas as alterações do GLUT4 foram acompanhadas por variações paralelas na captação de glicose. Os resultados apresentados demonstram que o ESR1 aumenta enquanto que o ESR2 diminui a expressão de *Slc2a4*/GLUT4, efeitos estes pelo menos parcialmente mediados por NF- κ B e resultam em alteração na captação de glicose.

Palavras-chave: Adipócito. 17 β -estradiol. *Slc2a4*. GLUT4. ESR1. ESR2. NF- κ B.

ABSTRACT

CAMPELLO, R. S. **17 β -estradiol increase *Slc2a4*/GLUT4 expression in adipocytes 3T3-L1 via ESR1.** 2012. 75 p. Ph. D. (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Insulin resistance (IR) is the reduced ability of insulin sensitive tissues to respond to regular levels of the hormone. In these tissues, the glucose transporter GLUT4 (*Slc2a4* gene) is in charge of the insulin stimulated glucose uptake, and altered expression of this transporter is related to IR. It is known that estradiol (E2) regulates gene expression and its mechanism of action involves binding to ESR1 and ESR2 receptors to modulate the expression of target genes, either directly binding to DNA or interacting with transcriptional factors such as NF- κ B (Nuclear Factor- κ B), which has been suggested as a negative regulator of *Slc2a4* gene. It has been demonstrated that altered E2 concentrations are related to IR and decreased *Slc2a4*/GLUT4 expression. However, the role of each E2 receptor in this effect is not completely clarified. Considering all the above, the *Slc2a4*/GLUT4 expression and glucose uptake were studied in E2 treated 3T3-L1 adipose cells. The participation of each receptor in the regulation of these responses as well as the involvement of NF- κ B in these mechanisms was also investigated. For this purpose, 3T3-L1 adipocytes were treated for 1 day with different concentrations of 17 β -estradiol. Then, subcellular localization of ESR1 and ESR2 (immunofluorescence), *Slc2a4*/GLUT4 expression (real time PCR and Western blotting, respectively) and the NF- κ B binding to the *Slc2a4* promoter sequence (EMSA) were evaluated. Glucose uptake was also evaluated. The contribution of each receptor was investigated by means of exposing the adipocytes to selective ESR1 agonist (PPT: 1,3,5-tris(4-hydroxyphenyl)-4-propyl-1Hpyrazole) and selective ESR2 agonist (DPN: 2,3-bis(4-Hydroxyphenyl)-propionitrile) as well as selective ESR1 antagonist (MPP: 1,3-Bis(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-5-[4-(2-piperidinylethoxy)phenol]-1H-pyrazole dihydrochloride) and selective ESR2 antagonist (PHTPP: 4-[2-Phenyl-5,7-bis(trifluoromethyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]phenol) in the absence or presence of E2. There was an increase in *Slc2a4*/GLUT4 expression (20-50%) and glucose uptake (~30%) in the presence of 0.1 e 10 nM E2. Both receptors co-localized inside the nucleus although ER1 predominated over ER2. After 10nM E2, ESR1 translocated to plasma membrane. NF- κ B binding activity was reduced (~25%) by 0.1 nM E2. PPT increased *Slc2a4*/GLUT4 expression (~30%) either in the absence or presence of E2 and decreased NF- κ B binding (~50%), while MPP decreased *Slc2a4*/GLUT4 expression (~20-40%) and increased NF- κ B binding (~30%) in the presence of E2. PHTPP increased *Slc2a4* expression (~40%) and decreased NF- κ B binding (~70%) in the absence or presence of E2. All changes in GLUT4 expression were accompanied by parallel variations in glucose uptake. Our results show ESR1 increases while ESR2 decreases *Slc2a4*/GLUT4 expression, and such effects which are at least in part mediated by NF- κ B.

Key words: 17 β -estradiol, *Slc2a4*/GLUT4, ESR1, ESR2, NF- κ B.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVO	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Cultura de células	16
3.2 Tratamento das células	17
3.2.1 Tratamento com 17 β -estradiol solúvel em água (E2)	17
3.2.2 Tratamento com agonista seletivo de ESR1 (PPT: 1,3,5-Tris(4-hydroxyphenyl)-4-propyl-1H-pyrazole	17
3.2.3 Tratamento com antagonista seletivo de ESR1 (MPP: 1,3-Bis(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-5-[4-(2-piperidinyloxy)phenol]-1H-pyrazole dihydrochloride	17
3.2.4 Tratamento com agonista seletivo de ESR2 (DPN: 2,3-bis(4-Hydroxyphenyl)-propionitrile	17
3.2.5 Tratamento com antagonista seletivo de ESR2 (PHTPP: 4-[2-Phenyl-5,7-bis(trifluoromethyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]phenol	18
3.2.6 Tratamento com veículo	18
3.3 Quantificação da proteína GLUT4 por Western Blotting	18
3.3.1 Extração protéica	18
3.3.2 Determinação da concentração de proteínas	18
3.4 Quantificação da expressão do gene <i>Slc2a4</i>	20
3.5 Avaliação da expressão e localização subcelular dos receptores ESR1 e ESR2 por imunofluorescência	22
3.6 Quantificação da fosforilação de AKT por Western Blotting	23
3.6.1 Extração protéica	24
3.7 Quantificação dos receptores ESR1 e ESR2 por Western Blotting	25
3.8 Quantificação da atividade de ligação de NF-kappa B e dos receptores ESR1 e ESR2 à região promotora do gene <i>Slc2a4</i>	27
3.9 Captação de glicose	29
4 RESULTADOS	30
4.1 Quantificação da proteína GLUT4	30

4.2	Quantificação da expressão do gene <i>Slc2a4</i>	32
4.3	Captação de glicose	33
4.4	Expressão e localização subcelular dos receptores	34
4.5	Fosforilação de AKT	39
4.6	Quantificação dos receptores de estrógeno (ESR1 e ESR2)	40
4.7	Quantificação da proteína GLUT4 após tratamento com agonistas e antagonistas	41
4.8	Quantificação da expressão do gene <i>Slc2a4</i> após tratamento com agonistas e antagonistas	43
4.9	Captação de glicose após tratamento com agonistas e antagonistas	45
4.10	Avaliação da atividade de ligação de NF-κB ao promotor do gene <i>Slc2a4</i>	47
4.11	Avaliação da atividade de ligação de NF-κB ao promotor do gene <i>Slc2a4</i> após tratamento com agonistas e antagonistas	50
4.12	Análise da ligação das proteínas nucleares a oligonucleotídeo contendo potencial sítio ERE no promotor do <i>Slc2a4</i> de camundongo	53
5	DISCUSSÃO	56
6	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS*	65

1 INTRODUÇÃO

De acordo com estimativas e projeções internacionais, o número de pessoas acometidas pelo diabetes mellitus (DM) será de aproximadamente 366 milhões até o ano 2030 (WILD et al., 2004). Tendo em vista esta perspectiva, são necessárias estratégias para monitorar, prevenir e controlar o DM, principalmente o diabetes tipo 2 (DM2). O DM2 é uma síndrome de etiologia múltipla, com o envolvimento de fatores ambientais e genéticos, e acredita-se que a resistência à insulina seja o principal fator fisiopatológico que altera a homeostasia glicêmica (BJORNHOLM; ZIERATH, 2005).

A resistência à insulina (RI) manifesta-se como uma reduzida capacidade dos tecidos sensíveis à insulina, no que diz respeito à captação de glicose, responderem a níveis normais do hormônio (SAVAGE et al., 2007). Tais tecidos (muscular e adiposo) expressam duas isoformas de proteínas transportadoras de glicose, o GLUT1, responsável pelo transporte deste substrato no estado basal, e o GLUT4 (MACHADO, 1998; RYDER et al., 2001), responsável pela captação de glicose estimulada pela insulina, bem como pela contração muscular (SILVA et al., 2005; ZHAO; KEATING, 2007; ZORZANO et al., 2005; WATSON; PESSIN, 2001).

Em adipócitos não estimulados pela insulina, a maior proporção do GLUT4 encontra-se no compartimento intracelular, todavia, após a ligação do hormônio ao seu receptor, com consequentes fosforilações intracelulares (CARVALHEIRA et al., 2002; SALTIEL; KANH, 2001), ocorre a translocação de vesículas contendo o GLUT4 em direção à membrana plasmática, aumentando agudamente a captação de glicose. Com a redução nos níveis circulantes de insulina, o transportador é rapidamente internalizado, retornando ao *pool* intracelular (ISHIKI; KLIP, 2006; MACHADO; SCHAAN; SERAPHIM, 2006). Sabe-se que redução na expressão gênica, e consequente redução na densidade do GLUT4 translocável para a membrana plasmática, reduz a captação de glicose, o que se relaciona com diminuição na sensibilidade à insulina (THORENS et al., 1990).

Conforme mencionado, inúmeros fatores podem levar ao desenvolvimento de RI, sendo proposto que o estradiol (E2), um importante hormônio envolvido na fisiologia e reprodução feminina, também esteja envolvido na modulação da sensibilidade à insulina e, consequentemente, no controle da homeostasia glicêmica (NILSSON et al., 2001). Estudos demonstrando que variações na concentração de E2 (fase do ciclo, gestação, síndrome dos

ovários policísticos, menopausa) podem se acompanhar por resistência à insulina reforçam as evidências do envolvimento do E2 no controle da homeostasia glicêmica (CASE; REID, 2001; DUNAIF et al., 1989; KAAJA; GREER, 2005; SOLOMON et al., 2001; SPENCER et al., 1997). Esta relação entre E2 e sensibilidade à insulina também foi demonstrada em camundongos *knockout* para a enzima aromatase (ArKO), que não produzem E2, e que apresentam aumento de adiposidade, intolerância à sobrecarga glicídica e resistência à insulina, podendo evoluir para DM (FISHER et al., 1998; JONES et al., 2000; TAKEDA et al., 2003).

Observa-se acima que tanto condições de hiperestrogenismo, como de ausência de estrógeno induzem RI podendo evoluir para DM (diabetes gestacional e diabetes do ArKO), evidenciando a complexidade da participação do estrógeno na regulação da sensibilidade à insulina.

Buscando entender a interação entre E2 e resistência à insulina, pesquisadores avaliaram a expressão da proteína GLUT4 em condições de alteração de níveis de estrógeno. Em tecido adiposo, observou-se redução no conteúdo de GLUT4 em gestantes, sendo que tal redução foi mais pronunciada nas gestantes com diabetes mellitus gestacional (OKUNO et al., 1995). Além disso, outro estudo relatou que não apenas a expressão, mas também a distribuição subcelular do GLUT4 foi alterada em pacientes com diabetes mellitus gestacional (GARVEY et al., 1993). Pesquisa realizada em nosso laboratório demonstrou que em ratas castradas o GLUT4 aumenta em músculo esquelético, e que o tratamento destas ratas com E2, induzindo níveis circulantes semelhantes aos observados durante a gestação, diminui a expressão do gene *Slc2a4*, o que pode ser um fator importante para a resistência à insulina induzida pela gestação (BARROS et al., 2008).

Tais resultados confirmam a relação entre E2 e sensibilidade à insulina, evidenciada por alterações na proteína GLUT4 nos tecidos sensíveis à insulina. Entretanto, o exato mecanismo pelo qual o E2 exerce tal regulação ainda não está claro.

Sabe-se que o mecanismo clássico de ação do estradiol envolve a ligação aos seus receptores (ERs), os quais podem ser responsáveis por diferentes efeitos biológicos ou, ainda, por efeitos opostos sobre um mesmo fenômeno (HELGUERO et al., 2005). Atualmente são conhecidas duas isoformas de receptor (ESR1 e ESR2), primeiramente conhecidos como ER α e ER β , respectivamente. Essas proteínas são codificadas pelos genes *ESR1* e *ESR2*, os quais estão incluídos na subfamília de receptores nucleares (NRS) 3 grupo A, sendo então também referidos

como genes *NRS3A1* e *NRS3A2*, de acordo com HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee).

Na década de 60, Jensen e colaboradores reportaram a presença de uma proteína de ligação ao estradiol, sugerindo então que os efeitos do E2 eram mediados por este receptor que, posteriormente, foi clonado e denominado ER (GREEN et al., 1986; GREENE et al., 1986). Entretanto, após três décadas, um segundo receptor de estrógeno foi clonado a partir de próstata de rato, sendo este novo receptor denominado ER β e consequentemente o receptor inicialmente clonado, ER α (KUIPER et al., 1996).

Os ERs pertencem a uma família de receptores hormonais que, após a ligação ao hormônio sofrem uma alteração conformacional, dissociação das proteínas de choque térmico, resultando em homo ou heterodimerização e subsequente ativação (DeMAYO et al., 2002). Os receptores ativados passam então a agir como fatores transcricionais, ligando-se diretamente a regiões específicas do DNA, denominadas elementos de resposta ao estrógeno (ERE), presentes em regiões promotoras de genes-alvo. Após a ligação aos EREs, os receptores atuam modulando a transcrição de vários genes-alvo (COWLEY et al., 1997; KOEHLER et al., 2005).

Este mecanismo de ação, conhecido por sinalização genômica, ou ação genômica, é considerado o mecanismo clássico de ação dos ERs. Além disso, tais receptores podem modular a expressão gênica através de outro mecanismo, no qual eles interagem com fatores de transcrição, por um processo referido como transativação de fator de transcrição. Assim, os receptores são capazes de alterar a expressão de genes que não possuem ERE (GIELEN et al., 2007; KALAITZIDIS; GILMORE, 2005), o que também é uma ação genômica.

Por outro lado, a regulação da transcrição de genes não explica os efeitos induzidos pelo estradiol após segundos ou minutos de exposição ao hormônio (abertura de canais de Ca⁺², ativação de proteínas citoplasmáticas). Estes efeitos rápidos, que ocorrem fora do núcleo, têm início na membrana plasmática, ou próximo dela, ocorrem após a interação do E2 com seus receptores clássicos (ESR1 e ESR2) ou com o GPER (G-protein coupled estrogen receptor), e são propostos como efeitos não genômicos ou de sinalização intracelular (SONG et al., 2005; SONG; SANTEN, 2006). Vale ressaltar que o GPER, um receptor acoplado à proteína G, cuja nomenclatura anterior era GPR-30, foi detectado em vários tecidos (placenta, mama, fígado, ovário, próstata), mas foi classificado como receptor órfão, pois não se conhecia o seu ligante. (CARMECI et al., 1997; O'DOWD et al., 1998). Entretanto, pesquisadores demonstraram a

ativação desse receptor pelo E2 e, além disso, que tal ativação independe da presença de ESR1 ou ESR2 (FILARDO et al., 2000).

Os receptores de estradiol são constituídos por domínios funcionais distintos: o domínio amino-terminal A/B, onde se encontra a função de ativação da transcrição AF-1; o domínio de ligação ao DNA (DBD); o domínio D (região de dobradiça), que contém o sinal para a localização nuclear; e o domínio de ligação ao ligante (LBD) ou carboxi-terminal, que contém a função de ativação da transcrição AF-2 (HALL; COUSE; KORACH, 2001; HELDRING et al., 2007; NILSSON; GUSTAFSSON, 2011). Vale ressaltar que os receptores são altamente homólogos em seu DBD (97% de identidade entre os aminoácidos), entretanto essa homologia cai para 56% no seu domínio de ligação ao ligante (LBD), conferindo certa diferença entre os dois receptores no que diz respeito a sua seletividade a determinados ligantes (KRAICHELY et al., 2000; MALAMAS et al., 2004; STAUFFER et al., 2000).

Em humanos, ESR1 e ESR2 exibem características distintas quanto a sua distribuição, sendo a isoforma 1 expressa predominantemente em útero, fígado e osso, enquanto que o ESR2 tem sua expressão mais pronunciada na próstata, glândula salivar, testículo, endotélio vascular e trato urinário. Alguns tecidos, tais como glândula mamária, tecido esquelético, ovário e sistema cardiovascular, expressam ambos ERs, com predominância de uma ou outra isoforma (BARROS; MACHADO; GUSTAFSSON, 2006a; KOEHLER et al., 2005).

Com relação aos tecidos sensíveis à insulina, já foi demonstrada a expressão das duas isoformas do receptor em adipócitos, tanto em humanos quanto em roedores, sendo evidente a predominância de ESR1 (DIEUDONNÉ et al., 2004; RODRIGUEZ-CUENCA et al., 2005). Além disso, a co-localização das duas isoformas em núcleo também foi demonstrada (BARROS et al., 2009). Em músculo gastrocnêmio de ratos, Barros et al. (2006b) relataram não só a presença de ESR1 e ESR2, como também a co-localização desses receptores no núcleo, o que foi posteriormente observado também em célula muscular L6 (BARROS et al., 2008).

Além dos diferentes padrões de distribuição dos ERs, sabe-se que estes receptores também exercem diferentes funções biológicas e, quando co-expressos no mesmo tecido, pode ocorrer uma inter-relação entre as isoformas. Através de estudos *in vitro* e *in vivo*, pesquisadores verificaram que, em algumas ocasiões, as duas isoformas do receptor podem desencadear respostas opostas na presença de E2 (LINDBERG et al., 2003; PETTERSSON et al., 2000).

O melhor entendimento das diferentes funções de cada um dos ERs ocorreu a partir do desenvolvimento de camundongos *knockouts*, nos quais uma das isoformas do receptor não é expressa (*Esr1*^{-/-} e *Esr2*^{-/-}) (KREGGE et al., 1998; LUBAHN et al., 1993). Com relação ao controle glicêmico, estudos constataram que os animais que não expressavam a isoforma 1 (*Esr1*^{-/-}) desenvolveram obesidade, intolerância à glicose e resistência à insulina (BARROS et al., 2009; COOKE et al., 2001). Por outro lado, fêmeas *Esr1*^{-/-} ovariectomizadas (praticamente sem a ação de E2 sobre ESR2), apresentaram redução de peso e melhora na sensibilidade à insulina, indicando que as alterações observadas nos animais *Esr1*^{-/-} decorriam de um efeito do E2 sobre a isoforma 2 do receptor (NAAZ et al., 2002).

No que diz respeito à modulação da expressão do GLUT4 pelas diferentes isoformas de ER nosso grupo fez importantes contribuições. Em músculo esquelético, demonstrou-se que animais *Esr1*^{-/-} praticamente não expressam GLUT4, sugerindo um efeito repressor de ESR2 sobre a expressão do transportador (BARROS et al., 2006b). Adicionalmente, em animais ArKO (com ambos os receptores, mas sem estrógeno), observou-se um aumento da expressão do GLUT4, indicando que o estrógeno, quando presente, desempenha um efeito basal de repressão sobre a expressão do gene do GLUT4 (BARROS et al., 2006b). Compatível com essas interpretações foram os resultados observados em miotubos L6 em cultura, nos quais se verificou diminuição da expressão do mRNA *Slc2a4* e da proteína GLUT4 na presença de estradiol (BARROS et al., 2008). Resultados interessantes também foram observados em tecido adiposo, no qual animais *Esr2*^{-/-}, quando tratados com tamoxifeno (antagonista competitivo do E2), apresentaram redução da proteína GLUT4, fato este que revela a importância de ESR1 como indutor da expressão do *Slc2a4* também neste tecido (BARROS et al., 2009).

Uma questão importante que precisa ser esclarecida concerne ao mecanismo de ação desses ERs sobre a modulação do gene *Slc2a4*. Conforme mencionado anteriormente, além do modelo clássico de alteração da expressão gênica por E2, no qual os receptores se ligam diretamente a EREs, sabe-se que o estradiol pode também regular a expressão de genes que não apresentam EREs (MATTHEWS et al., 2006), através da interação dos ERs com outros fatores transcricionais, aumentando ou diminuindo a transcrição gênica (NILSSON et al., 2001). Dentre estes fatores destaca-se o Fator Nuclear-κB (NF-κB) (BISWAS et al., 2005; GALIEN; GARCIA, 1997).

O NF- κ B é uma família, composta por 5 membros: Rel A (p65), NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), c-Rel e RelB. Na sua forma inativa, localiza-se no citoplasma como um heterodímero, associado a um fator inibidor, o I κ B que, quando fosforilado pelo complexo I κ B cinase (IkK), torna-se susceptível à ação da ubiquitina, sendo então degradado e desligado do complexo com NF- κ B. Em geral, a forma ativa do NF- κ B é um heterodímero composto pela subunidade p65 associada à p50 ou p52 que, após a dissociação de seu fator inibidor (I κ B) transloca para o núcleo atuando então no controle da expressão de genes (WANG T et al., 2002; WELLEN et al., 2005).

A região promotora do gene *Slc2a4* possui sítios para a ligação ao NF- κ B, e alguns estudos já propuseram que este fator transcricional seja um importante inibidor da expressão deste gene (FURUYA et al., 2010; RUAN et al., 2002; SILVA et al., 2005). Sabendo-se que os ERs podem interagir com o NF- κ B, impedindo a sua ligação à região promotora de genes alvos (GUZELOGLU-KAYISLI et al., 2008), no caso do *Slc2a4* isto levaria a uma diminuição do efeito inibitório do NF- κ B, resultando em aumento da expressão gênica do transportador. Esta hipótese já foi discutida por nosso grupo (BARROS; MACHADO; GUSTAFSSON, 2006a), no entanto ainda carece de experimentos comprobatórios.

Além disso, não se pode descartar a possibilidade de o estrógeno agir de forma clássica, por meio da ligação dos ERs diretamente no DNA de seus genes-alvo. Uma análise da região promotora do GLUT4 nos evidencia a presença de um sítio com alta homologia com os domínios de ligação já descritos para o ER. No entanto, a possibilidade do ER ligar-se no promotor do GLUT4 nunca foi investigada.

2 OBJETIVO

Investigar em células adiposas da linhagem 3T3-L1 a regulação da expressão de *Slc2a4*/GLUT4 pelo E2, o papel dos ERs nesta regulação, e potenciais mecanismos moleculares envolvidos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de células

Fibroblastos de camundongo da linhagem 3T3-L1, obtidos do *American Type Culture Collection*, Rio de Janeiro Cell Bank, Rio de Janeiro, RJ, Brazil (ATCC® Number: CL-173TM), foram propagados e diferenciados em ambiente umidificado composto por 95% de O₂ e 5% de CO₂. Os fibroblastos foram propagados em meio DMEM (Cultilab, Campinas, SP, Brasil [25 mM de glicose]) contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e 100 U/mL de penicilina e estreptomicina até atingirem confluência. Os fibroblastos foram diferenciados em adipócitos maduros, submetendo-os a meio contendo soro fetal bovino (10%) suplementado com 0,83 μ M de insulina, 0,25 μ M de dexametasona e 0,5 mM de isobutilmetilxantina por 6 dias, e depois retornando ao meio DMEM/SFB. As células foram utilizadas para os experimentos após 9 a 11 dias de diferenciação, quando pelo menos 95% das mesmas apresentaram fenótipo de adipócito com acúmulo de gotas de lipídeos, confirmado através da coloração por *oil red* (figura 1). Para esta coloração, as células foram lavadas com PBS, fixadas com paraformaldeído (10%) diluído em PBS por 30 minutos e incubadas com *oil red* (0,5%) por 20 minutos.

Após a diferenciação, o meio foi substituído por DMEM sem vermelho de fenol acrescido de soro fetal bovino tratado com carvão dextrana, por 24 horas. Em seguida, iniciaram-se os tratamentos.

Figura 1- Adipócitos 3T3-L1 exibindo acúmulo de lipídeo após coloração por *oil red*

3.2 Tratamento das células

As células 3T3-L1 foram tratadas conforme descrito a seguir:

3.2.1 Tratamento com 17 β -estradiol solúvel em água (E2)

(Sigma [E4389], St Louis, MO, USA) diluído em água.

Dose: 0,1 nM (concentração fisiológica: CHEN et al., 2006; DOS SANTOS et al., 2002), 1 nM, 10 nM e 100 nM, acrescido de 0,1% de DMSO

Tempo de tratamento: 1 e 2 dias.

3.2.2 Tratamento com agonista seletivo de ESR1 (PPT: 1,3,5-Tris(4-hydroxyphenyl)-4-propyl-1H-pyrazole

(Sigma, St Louis, MO, USA) diluído em DMSO (0,1%).

Dose: 10 nM (HELGUERO et al., 2005; MURAKI; OKUYA; TANIZAWA, 2006).

Tempo de tratamento: 1 dia

3.2.3 Tratamento com antagonista seletivo de ESR1 (MPP: 1,3-Bis(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-5-[4-(2-piperidinylethoxy)phenol]-1H-pyrazole dihydrochloride

(Tocris, St. Louis, MO, USA) diluído em água.

Dose: 1000 nM (BEN-JONATHAN et al., 2006; MURAKI; OKUYA; TANIZAWA, 2006), acrescido de 0,1% de DMSO.

Tempo de tratamento: 1 dia.

3.2.4 Tratamento com agonista seletivo de ESR2 (DPN: 2,3-bis(4-Hydroxyphenyl)-propionitrile

(Tocris, St. Louis, MO, USA) diluído em DMSO (0,1%).

Dose: 100 nM (HELGUERO et al., 2005; LAHM et al., 2008).

Tempo de tratamento: 1 dia.

3.2.5 Tratamento com antagonista seletivo de ESR2 (PHTPP: 4-[2-Phenyl-5,7-

bis(trifluoromethyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]phenol

(Tocris, St. Louis, MO, USA) diluído em DMSO (0,1%).

Dose: 100 nM (BEN-JONATHAN et al., 2006).

Tempo de tratamento: 1 dia.

3.2.6 Tratamento com veículo

DMSO: 0,1%

3.3 Quantificação da proteína GLUT4 por Western Blotting

3.3.1 Extração protéica

As amostras foram homogeneizadas em 1mL de tampão de homogeneização (Tris HCl 10 mM; EDTA 1,0 mM; sacarose 250 mM) e submetidas à centrifugação a 1.000 x g/ 10 minutos a 4 °C . O sobrenadante obtido foi submetido a subsequente ultracentrifugação a 150.000 x g, por 75 minutos a 4 °C. O precipitado final, correspondendo ao conjunto de proteínas de membranas totais, foi ressuspendido em tampão de homogeneização e estocado a -20 °C.

3.3.2 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas nas amostras foi determinada pelo método de Bradford (Biorad, CA, USA).

3.3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

Conhecidas as concentrações proteicas das amostras, quantidades iguais de proteínas foram submetidas à separação eletroforética em gel de poliacrilamida.

Foi utilizado o método desenvolvido por Laemmli e modificado por Garfin (GARFIN, 1990), o qual envolve um sistema descontínuo de dois géis contíguos, mas diferentes: o gel de empacotamento (*stacking gel*) e o gel de separação (*resolving gel*).

Para a aplicação no gel, as amostras foram solubilizadas em tampão de Laemmli (glycerol 15%, Tris 0,5 M, bromofenol blue 0,05%, SDS 9%, com 6% de 2-mercaptoetanol, 1:1), e fervidas por 3 minutos. Também foi aplicado um marcador de peso molecular (MultiMark Multi-Colored Standard, Invitrogen, USA).

Após a aplicação das amostras, teve início a eletroforese em tampão Tris HCl 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1%, EDTA 2 mM, pH 8,3, com voltagem constante para o gel de empacotamento (75 mV) e corrente constante para o gel de separação (60 mA).

3.3.4 Transferência eletroforética

A transferência eletroforética das proteínas para membrana de nitrocellulose Hybond-ECL (Amersham, UK) foi realizada sob corrente constante de 40 mA, durante 16 horas, a 4 °C, em tampão Tris-HCl 12,5 mM, glicina 95 mM, metanol 20%, pH 8,3.

3.3.5 Imunodeteção por quimioluminescência (ECL – “Enhanced Chemoluminescence”)

- a) bloqueio de reações inespecíficas com PBS acrescido de leite em pó desnatado (5%), por 2 horas à temperatura ambiente;
- b) incubação com anticorpo específico (rabbit anti-GLUT4 polyclonal antibody, Millipore, Billerica, MA) em PBS/BSA 8% (1:4000), por 3 horas a 37°C sob agitação constante;
- c) série de lavagens com solução de lavagem TBS –T (Tris-HCl 1% (0,01 M), NaCl 3% (0,05 M), Tween-20 0,05%);
- d) incubação com anticorpo secundário (Amersham ECL Anti-rabbit IgG, GE Healthcare) conjugado com enzima peroxidase-HRP (1:10.000) em TBS-T + leite desnatado 1%, por 1 hora, sob agitação e temperatura ambiente;
- e) lavagens com TBS-T;
- f) incubação da membrana com os reagentes de luminescência por 1 minuto.

3.3.6 Autoradiografia e densitometria óptica

A membrana foi exposta a filme de RX (Hyperfilm – Amersham, UK), durante 1-5 minutos. O filme foi revelado e fixado com as soluções GBX (Kodak Brasileira, BR).

A intensidade dos “*blots*” foi quantificada por densitometria óptica (*software* Image Master 1D Prime, Pharmacia Biotech, SW) e o resultado numérico foi expresso em unidades arbitrárias (UA).

3.3.7 Normalização por β -actina

Após análise do GLUT4, as membranas foram incubadas com anticorpo específico anti β -actina (monoclonal anti β -actina AC-74, A2228, Sigma-Aldrich) (1:3000). Então, seguiu-se a imunodeteção por quimioluminescência conforme descrito anteriormente.

3.3.8 Expressão dos resultados

Após a normalização por β -actina, a média do grupo controle em cada membrana foi considerada como 100 e os resultados foram expressos como unidades arbitrárias (UA).

3.4 Quantificação da expressão do gene *Slc2a4*

As amostras foram processadas para extração de RNA total, utilizando o método Trizol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA), conforme as instruções do fabricante.

3.4.1 Avaliação da concentração de RNA total

O RNA total isolado foi quantificado por espectrometria a 260 nm, e o grau de pureza pela razão A_{260}/A_{280} . A integridade do RNA das amostras foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,0%, contendo formaldeído a 2,2 M e tampão MOPS [MOPS a 20 mM (pH 7,0), acetato de sódio 8 mM e EDTA 1 mM (pH 8,0)] preparado com água esterilizada tratada com DEPC (Sigma, Saint Louis, MO, EUA), por 60 min a 100V. O gel foi corado com brometo de

etídio 0,5 mg/mL e examinado sobre luz UV em transiluminador, utilizando-se como referência um marcador de RNA (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad/CA, EUA). Os resultados foram documentados pelo sistema de captura de imagem ChemilmagerTM 4400 (v. 5.5) parte integrante do sistema de digitalização de imagens MultimageTM Light Cabinet (AlphaInnotech, San Leandro, CA, EUA).

3.4.2 Análise da expressão gênica pela RT-PCR em tempo real

Após a extração, o RNA foi tratado com DNase I (Invitrogen) e a reação de transcrição reversa foi realizada a partir de 1µg de RNA total (ImProm-IITM Reverse Transcriptase, Promega Co, Madison, USA). A amplificação do cDNA foi realizada utilizando-se Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen) no aparelho Rotor Gene 3000 (Corbett Research, Sydney, Australia). Os primers para amplificação dos genes *Slc2a4* e gliceraldeído- 3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*) foram desenhados com o auxílio do programa Primer 3 v.0.4.0 (SourceForge, Geeknet Inc.) e as sequências estão descritas na tabela 1.

Tabela 1 – Primers utilizados para amplificação da expressão dos genes avaliados

Primer	Sequência (5' → 3')	Tamanho do produto (bp)
<i>Slc2a4</i> <i>Forward</i>	CTGTGCCATCTTGATGACCGTG	196
<i>Slc2a4</i> <i>Reverse</i>	GTTGGAGAAACCAGCGACAGC	196
<i>Gapdh</i> <i>Forward</i>	GAAGGTCGGTGTGAACGGATT	294
<i>Gapdh</i> <i>Reverse</i>	AAGACACCAGTAGACTCCACGA	294

As condições do Real-time PCR foram ajustadas no laboratório. Os experimentos foram realizados em duplicatas para cada amostra e a média do Ct foi utilizada para calcular a

expressão do gene usando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A medida da expressão do gene *Slc2a4* foi obtida em relação ao gene constitutivo (*Gapdh*) e os valores finais foram relatados como alteração da expressão gênica relativa ao grupo controle (calculada como $2^{-\Delta\Delta Ct}$), sendo que a média do grupo controle foi considerada 1.

3.5 Avaliação da expressão e localização subcelular dos receptores ESR1 e ESR2 por imunofluorescência

Fibroblastos de camundongo da linhagem 3T3-L1 foram propagados e diferenciados sobre lamínulas revestidas com gelatina (0,1%). Após a diferenciação, as células permaneceram durante 1 dia em meio DMEM sem vermelho de fenol acrescido de soro fetal bovino tratado com carvão dextrana. Em seguida, iniciou-se o tratamento com 17β -estradiol (0 nM, 0,1 nM e 10 nM) por 1 dia. Após este tempo, o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS e fixadas em paraformaldeído (2%) por 20 minutos em temperatura ambiente. Então, foram lavadas com PBS contendo 0,1M de glicina, permeabilizadas com saponina (0,01%) e bloqueadas com PBS contendo BSA (1%) por 10 minutos em temperatura ambiente. Após o bloqueio, as células foram incubadas com um dos seguintes anticorpos: rabbit anti-ESR1 e goat anti-ESR2 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) (1:50), diluídos em PBS + saponina (0,01%) + BSA (1%) por 1 hora à temperatura ambiente. Após, as células foram lavadas com PBS contendo saponina (0,01%) e BSA (1%) e incubadas com anticorpo secundário anti-rabbit IgG (GE Healthcare) ou anti-goat (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) (1:300) conjugados com Alexa Fluor 594 (vermelho) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), diluídos em PBS + saponina (0,01%), por 30 minutos em temperatura ambiente. Após, foram lavadas com PBS e incubadas por 20 minutos com DAPI (1:500) (Sigma, St Louis, MO, USA) diluído em PBS + saponina (0,01%), para marcação do núcleo.

Para ensaios de dupla marcação (co-localização), depois de fixadas com paraformaldeído (2%), lavadas e bloqueadas, as células foram incubadas com anticorpo rabbit anti-ESR1 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA), nas mesmas condições especificadas acima. Após, as células foram lavadas 2 vezes com PBS + saponina (0,01%), 1 vez com PBS + BSA (1%) + saponina (0,01%) e 1 vez com PBS + saponina (0,01%) e incubadas com anticorpo secundário anti-rabbit (1:300) conjugado com Alexa Fluor 488 (verde) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) diluído em PBS + saponina (0,01%), por 30 minutos em temperatura

ambiente. Após a série de lavagens, as células foram incubadas com anticorpo goat anti-ESR2 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA), nas mesmas condições especificadas acima. Seguiu-se a série de lavagens e incubou-se com anticorpo secundário anti-goat (1:300) conjugado com Alexa Fluor 594 (vermelho) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) nas mesmas condições especificadas acima.

Para os ensaios de localização subcelular de ESR1, após o tratamento com E2 por 1 dia, o meio foi removido e as células foram lavadas, fixadas, permeabilizadas com saponina e bloqueadas conforme descrito anteriormente. Após o bloqueio, seguiu-se incubação com marcador WGA (*Wheat Germ Agglutinin*; Molecular Probes®, Eugene, OR, USA), 5 µg/mL por 10 minutos à temperatura ambiente, diluído em PBS + saponina (0,01%), para marcação de membrana. Após, as células foram incubadas com o anticorpo rabbit anti-ESR1 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) (1:50) por 1 hora à temperatura ambiente. No término da incubação, as células foram lavadas com PBS contendo saponina (0,01%) e BSA (1%) e incubadas com anticorpo secundário anti-rabbit IgG (GE Healthcare) (1:300) conjugados com Alexa Fluor 594 (vermelho) (Molecular Probes®, Eugene, OR, USA), diluídos em PBS + saponina (0,01%), por 30 minutos em temperatura ambiente. Após, foram lavadas com PBS e incubadas por 20 minutos com DAPI (1:500) (Sigma, St Louis, MO, USA) diluído em PBS + saponina (0,01%), para marcação do núcleo.

Após, as células foram lavadas e montadas em lâminas e a imunofluorescência foi analisada por microscopia confocal, utilizando microscópio Nikon E800.

3.6 Quantificação da fosforilação de AKT por Western Blotting

As células foram tratadas com E2 por 1 dia conforme descrito anteriormente, sendo que nas últimas 3 horas de tratamento, o soro foi retirado do meio de cultura com o intuito de evitar o efeito da insulina presente no soro. Então, as células foram estimuladas com (17 nM) ou sem insulina (Humulin® R, Eli Lilly Brasil, São Paulo, Brasil) nos últimos 20 minutos antes de completar as 24 horas de tratamento.

3.6.1 Extração protéica

As amostras foram homogeneizadas em 500 µL de tampão de lise (Tris HCl 20 mM; NaCl 50 mM; NaF 50 mM; Na₂H₂P₂O₇ 5 mM; sacarose 250 mM; Triton-X100 1%) acrescido de DTT 1M, Benzamidina 300 mM, PMSF 0,1M, leupeptina 2 mg/mL e aprotinina 2 mg/mL e submetidas à centrifugação a 12.000 x g/ 10 minutos a 4 °C . No sobrenadante obtido, realizou-se a dosagem de proteínas por Bradford (Biorad, CA, USA) e, conhecidas as concentrações proteicas das amostras, quantidades iguais de proteínas foram submetidas a separação eletroforética em gel de poliacrilamida (8%). Tanto a eletroforese quanto a transferência eletroforética foram realizadas conforme previamente descrito (quantificação da proteína GLUT4).

Após a transferência, a membrana contendo as proteínas foi submetida à imunodeteção por quimioluminescência:

- a) bloqueio de reações inespecíficas com TBS-T (Tris-HCl 1% (0,01M), NaCl 3% (0,05M), Tween-20 0,1%) acrescido de 10% de leite em pó desnatado, por 3 horas à temperatura ambiente;
- b) série de lavagens com TBS-T (0,1%);
- c) incubação com anticorpo específico (rabbit anti-pAKT 1/2/3 Ser473, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA,EUA) em TBS-T (0,1%) + 5% de leite em pó desnatado (1:500), overnight, sob agitação constante, 4°C;
- d) série de lavagens com solução de lavagem TBS –T (0,1%);
- e) incubação com anticorpo secundário (anti-rabbit IgG, GE Healthcare, conjugado com enzima peroxidase-HRP) (1:10000) por 1 hora, sob agitação em temperatura ambiente;
- f) lavagens com TBS-T (0,1%);
- g) incubação da membrana com os reagentes para luminescência por 1 minuto.

3.6.2 Autoradiografia e densitometria óptica

A membrana foi exposta a filme de RX (Hyperfilm – Amersham, UK), durante 1-5 minutos. O filme foi revelado e fixado com as soluções GBX (Kodak Brasileira, BR).

A intensidade dos “*blots*” foi avaliada por densitometria óptica (*software* Image Master 1D Prime, Pharmacia Biotech, SW).

3.6.3 Normalização por AKT total

Após análise da pAKT, as membranas foram incubadas com anticorpo específico anti AKT 1/2/3 (H-136) (Santa Cruz Biotechnology) (1:1000). Então, seguiu-se a imunodeteção por quimioluminescência conforme descrito anteriormente.

Após a normalização por AKT total, a média do grupo controle de cada membrana foi considerada como 100 e cada valor individual, normalizado em relação a 100. Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias (UA).

3.7 Quantificação dos receptores ESR1 e ESR2 por Western Blotting

Células 3T3-L1 foram lavadas com PBS gelado e homogeneizadas em solução contendo: PBS+ EDTA (1 nM) + inibidores de protease (aprotinina 1 µg/ml; leupeptina 1 µg/ml; pepstatina A 1 µg/ml; PMSF 1 mM). Foram então submetidas à centrifugação 2050 x g/10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O pellet resultante foi ressuspenso em tampão de lise gelado (Tris HCL 50 mM; NaCl 150 mM; deoxicolato de sódio 0,05%; NP-40 1%; EDTA 1 mM; SDS 0,1%; aprotinina 1 µg/ml; leupeptina 1 µg/ml; pepstatina A 1 µg/ml; PMSF 1 mM; pH 8,0) e mantido no gelo por 30 minutos. Após, as amostras foram centrifugadas a 11.200 x g /30 minutos a 4 °C. No sobrenadante obtido, correspondendo ao conjunto de proteínas totais (neste caso citosólicas e nucleares), realizou-se a dosagem de proteínas por Bradford (Biorad, CA, USA) e, conhecidas as concentrações proteicas das amostras, quantidades iguais de proteínas (40 µg para ESR1 e 60 µg para ESR2) foram submetidas a separação eletroforética em gel de poliacrilamida (7,5%).

Para a aplicação no gel, as amostras foram solubilizadas em tampão contendo: glicerol 40%, Tris 375 mM, bromofenol blue 0,05%, SDS 12%, EDTA 120 mM, DTT 300 mM e 2-mercaptoetanol 30%, 1:1), e mantidas em temperatura ambiente por 1 hora. Também foi aplicado um marcador de peso molecular (MultiMark Multi-Colored Standard, Invitrogen, USA).

A transferência eletroforética das proteínas para membrana de PVDF (ImmobilonP; Millipore, Bedford, MA) foi realizada sob corrente constante de 40 mA, durante 16 horas, a 4 °C, em tampão Tris-HCl 12,5 mM, glicina 95 mM, metanol 20%, pH 8,3.

Após a transferência, a membrana contendo as proteínas foi submetida à imunodeteção por quimioluminescência:

- a)** bloqueio de reações inespecíficas com TBS-T (Tris-HCl 1% (0,01M), NaCl 3% (0,05M), Tween-20 0,1%) acrescido de 10% de leite em pó desnatado, por 1 hora à temperatura ambiente;
- b)** série de lavagens com TBS-T (0,1%);
- c)** incubação com anticorpo específico (rabbit anti-ESR1 e goat anti-ESR2, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) em TBS-T (0,1%) + 10% de leite em pó desnatado (1:200), overnight, sob agitação constante, 4 °C;
- d)** série de lavagens com solução de lavagem TBS –T (0,1%);
- e)** incubação com anticorpo secundário (ESR1: anti-rabbit IgG, GE Healthcare, conjugado com enzima peroxidase-HRP e ESR2: anti-goat, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) em TBS-T (0,1%) (1:3000) por 1 hora, sob agitação em temperatura ambiente;
- f)** lavagens com TBS-T (0,1%);
- g)** incubação da membrana com os reagentes para luminescência por 1 minuto.

A membrana foi exposta a filme de RX (Hyperfilm – Amersham, UK), durante 1-5 minutos. O filme foi revelado e fixado com as soluções GBX (Kodak Brasileira, BR).

A intensidade dos “*blots*” foi avaliada por densitometria óptica (*software* Image Master 1D Prime, Pharmacia Biotech, SW).

Após a normalização por β -actina (conforme previamente descrito), a média do grupo controle de cada membrana foi considerada como 100 e cada valor individual, normalizado em relação a 100. Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias (UA).

3.8 Quantificação da atividade de ligação de NF-kappa B e dos receptores ESR1 e ESR2 à região promotora do gene *Slc2a4*

3.8.1 Ensaio de Mobilidade Eletroforética ou Gel de Retardo (*Eletrophoretic Mobility Shift Assay* - EMSA) e Ensaio de Competição com anticorpo específico anti-ESR1 e anti-ESR2

Este ensaio consiste na reação de ligação de proteínas de extrato nuclear com uma sequência específica de nucleotídeos para o fator de transcrição, sendo esta previamente marcada com ^{32}P pela T_4 polinucleotídeo quinase. Quando o meio de reação é submetido a uma eletroforese em gel de poliacrilamida, a sonda livre (oligonucleotídeo) migra mais que a sonda ligada ao fator nuclear (banda de retardo).

3.8.2 Extração de proteínas nucleares de adipócitos 3T3-L1

Baseado no método descrito por Xing et al. (1997), resumidamente, após o tratamento, as células foram lavadas com 1 mL de tampão fosfato-salina gelado (PBS: NaCl 137 mM; KCl 2,68 mM; KH_2PO_4 1,27 mM; Na_2HPO_4 8,06 mM), centrifugadas (2.000 g, 4°C, 5 min) e então ressuspensas em 1 mL de tampão A [HEPES (pH 7,9) 10 mM, KCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, 10 µg/ml leupeptina, e 25 µg/ml aprotinina] gelado. As amostras foram incubadas em gelo por 15 min, seguido da adição de 25 µl de Nonidet P-40 10% e agitação vigorosa por 30 s. Após centrifugação (12.000 g, 4 °C, 20 min), o sobrenadante foi descartado e o pellet (contendo os núcleos) foi ressuspendido em 100 µl de tampão de extração [HEPES (pH 7.9) 20 mM, NaCl 0,4 M, glycerol 10%, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, 10 µg/ml leupeptina, and 25 µg/ml aprotinina] e incubado (20 minutos) em gelo. O lisado nuclear foi centrifugado (12.000 g, 4 °C, 20 min) e o sobrenadante contendo proteínas nucleares foi recolhido. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (Biorad, CA, USA).

3.8.3 Marcação da Sonda

Para o estudo da atividade de ligação de NF- κ B foi utilizada sonda específica para a região de ligação do NF- κ B no promotor do gene *Slc2a4*. A sequência da sonda está descrita a seguir:

- Sonda para NF- κ B, específica da região promotora do gene *Slc2a4* (FURUYA et al., 2008):

5'-GTGAAGGGCGTGTCTATGGCG-3' (-83/-60)

Para o estudo da atividade de ligação de ESR1 e ESR2 foi utilizada sonda potencialmente capaz de ligar ER, específica da região promotora do gene *Slc2a4* (ERE-*Slc2a4*):

5'-GAGGGTGGTGTGACTGGCGTG-3' (-733/-712)

As sondas foram marcadas com a adição de 4 μ l γ -³²P ATP (3 Ci/mmol), utilizando T4 polimerase quinase (1 U/ μ l) (Invitrogen™, Gaithersburg, EUA) conforme recomendado pelo fabricante. A atividade das sondas foi determinada usando no ensaio aproximadamente 100.000 cpm/ μ l.

3.8.4 Reação de ligação e corrida do gel

Em um tubo de microcentrífuga contendo 5 μ l de tampão de ligação 3X (HEPES 60 mM pH 7,6; glicerol 10%; KCl 150 mM; EDTA 0,6 mM); BSA 1,93 mg/mL; DTT 2,3 mM; Poly DiDc 0,25 μ g/ μ L) e 4 μ g de proteína de extrato nuclear, foi adicionado a sonda marcada. Para ensaio de competição, foi adicionado oligonucleotídeo não marcado em excesso. Ainda, para ensaios de competição com anticorpos anti-ESR (0,2 μ g) (anti-ESR1 ou anti-ESR2, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) foram adicionados à reação antes ou depois da adição da sonda marcada, e submetidos a incubação por 30 minutos a temperatura ambiente, para posterior aplicação no gel de poliacrilamida 4% [acrilamida/bisacrilamida (30,8:1)], não desnaturante.

O gel foi submetido a uma pré-corrida a 90 V por 1 hora em tampão TBE 0,5 X (TBE1X= Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 1 mM). Ao final dessa pré-corrida, o tampão de corrida foi substituído por um novo e as amostras foram aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada por volta de 2 horas a 150 V. Ao final da corrida, o gel foi cuidadosamente transferido para um filtro de papel Whatman, seco a vácuo por 1 hora a 80 °C e exposto ao filme RX em cassete a – 70 °C.

3.8.5 Expressão dos resultados

A média do grupo controle de cada gel foi considerada como 100. A intensidade relativa de ligação (%) foi calculada com base nestes valores.

3.9 Captação de glicose

As células foram tratadas por 1 dia conforme descrito, sendo que nas últimas 3 horas de tratamento, o soro foi retirado do meio de cultura com o intuito de evitar o efeito da insulina presente no soro. Então, as células foram estimuladas com (17 nM) ou sem insulina (Humulin® R, Eli Lilly Brasil, São Paulo, Brasil) nos últimos 20 minutos antes de completar as 24 horas de tratamento. Após, as células foram imediatamente lavadas com PBS e a solução com 2-deoxy-[1,2- ³H]-D-glucose (Perkin Elmer, USA) foi adicionada por 5 minutos. Em seguida, as células foram rapidamente lavadas com salina gelada a fim de cessar o transporte. Os resultados foram calculados conforme Sweeney et al., (1999) e expressos como pmol/mg proteína/min.

4 RESULTADOS

4.1 Quantificação da proteína GLUT4

Verificou-se o efeito do tempo e de diferentes concentrações de 17β -estradiol sobre a expressão da proteína GLUT4 em células adiposas 3T3-L1. Observou-se diferença significativa após 1 e 2 dias de tratamento com diferentes concentrações de E2. Após 1 dia de tratamento, observou-se um aumento progressivo na expressão da proteína GLUT4 na presença de 0,1, 1 e 10 nM de hormônio (Figura 2).

Após 2 dias de tratamento, houve um aumento significativo no conteúdo de GLUT4 em células incubadas com 0,1 nM de estradiol quando comparadas às concentrações 1 nM, 10 nM e 100 nM (resultados não mostrados).

Figura 2- Conteúdo da proteína GLUT4 em células 3T3-L1 tratadas por 1 dia com diferentes concentrações de 17β -estradiol.

Os valores são média $\pm$ EPM de experimentos independentes (n=4). ANOVA *One-Way*, pós-teste *Student-Newman-Keuls*. *** P <0,001 vs. 0E2; ## P <0,01 vs. 0,1E2; § P <0,05 vs. 10E2 e 100E2.

4.2 Quantificação da expressão do gene *Slc2a4*

Para confirmar tempo e concentração em que melhor se caracterizam as ações do estradiol sobre a expressão de *Slc2a4*, avaliou-se a expressão do gene *Slc2a4* após 1 dia de tratamento com E2. Observou-se um aumento no conteúdo de *Slc2a4* após exposição dos adipócitos a 0,1, 1 e 10nM de hormônio (Figura 3).

Figura 3- Expressão do gene *Slc2a4* em células 3T3-L1 tratadas por 1 dia com diferentes concentrações de 17 β -estradiol.

Os valores são média $\pm$ EPM de experimentos independentes (n=6). ANOVA *One-Way*, pós-teste *Student-Newman-Keuls*. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ vs. 0E2; § $P < 0,05$ vs. 1E2 e 10E2.

4.3 Captação de glicose

Para verificar se as alterações na expressão da proteína GLUT4 observadas após o tratamento com E2 foram acompanhadas por variação na captação de glicose, avaliou-se a captação de glicose após tratamento com E2.

Houve aumento significativo na captação de glicose após 1 dia de tratamento com E2 (0,1 nM e 10 nM) (Figura 4).

Figura 4- Captação de glicose em células 3T3-L1 tratadas por 1 dia com 17 β -estradiol.

Os valores são média $\pm$ EPM de experimentos independentes (n=5). O efeito estatisticamente significativo da insulina ($P < 0,05$) foi confirmado por teste *t Student* para as diferentes concentrações de E2 (resultado não mostrado). Nenhuma diferença foi observada entre os grupos sem estímulo insulínico (-) (ANOVA *One-Way*). Nos grupos que receberam o estímulo (+), houve alteração significativa na captação de glicose (ANOVA *One-Way*, pós-teste *Student-Newman-Keuls*). * $P < 0,05$ vs. 0E2 (+).

4.4 Expressão e localização subcelular dos receptores

Para avaliar a provável atividade transcricional dos ERs, tanto a presença, quanto a co-localização dos receptores ESR1 e ESR2 em núcleo foram avaliadas por imunofluorescência. As imagens demonstram a presença das duas isoformas em núcleo de células tratadas com o veículo (0E2) (Figuras 5A e 6A) e com E2 (0,1 nM) (Figuras 5B e 6B). Após a adição de 10 nM de hormônio (10E2), observou-se uma evidente redução na marcação nuclear de ESR1 (Figura 5C). O mesmo não ocorreu com ESR2 (Figura 6C).

Tendo em vista a redução na marcação nuclear de ESR1 após tratamento com 10 nM de E2, avaliou-se a localização sub celular do receptor através de imunofluorescência com marcador de membrana plasmática (WGA). Observou-se uma evidente marcação de ESR1 em membrana na presença de 10 nM de E2, conforme verificado após sobreposição com WGA (Figura 7C).

A figura 8 demonstra a co-localização dos receptores em núcleo de células tratadas com o veículo (0E2). Vale ressaltar a predominância da isoforma 1, tendo em vista que em alguns núcleos houve a marcação apenas de ESR1 (seta branca).

Figura 5- Imunomarcacão de ESR1 em núcleo de células 3T3-L1. Em **A**: células tratadas por 1 dia com veículo (0E2); em **B**: células tratadas por 1 dia 0,1 nM de estradiol (0,1E2); em **C**: células tratadas por 1 dia com 10 nM de estradiol (10E2).

Figura 6- Imunomarcacão de ESR2 em núcleo de células 3T3-L1. Em **A**: células tratadas por 1 dia com veículo (0E2); em **B**: células tratadas por 1 dia 0,1 nM de estradiol (0,1E2); em **C**: células tratadas por 1 dia com 10 nM de estradiol (10E2).

Figura 7- Imunomarcação de ESR1 em núcleo e membrana plasmática de células 3T3-L1. Em **A:** células tratadas por 1 dia com veículo (0E2); em **B:** células tratadas por 1 dia 0,1 nM de estradiol (0,1E2); em **C:** células tratadas por 1 dia com 10 nM de estradiol (10E2).

Figura 8- Co-localização dos receptores em núcleo. Em **A**: imunomarcagem específica de ESR1; em **B**: imunomarcagem específica de ESR2; em **C**: sobreposição de ESR1 e ESR2.

4.5 Fosforilação de AKT

A figura 9 mostra o conteúdo de AKT fosforilada após estímulo com insulina (17 nM) por 20 minutos em células 3T3-L1 tratadas com E2 (0, 0,1 e 10 nM) por 1 dia. Verificou-se um aumento significativo na fosforilação da proteína após tratamento com 10 nM de E2 quando comparado aos grupos 0E2 e 0,1E2.

Figura 9- Fosforilação de AKT após estímulo com insulina (17 nM) por 20 minutos em células 3T3-L1 tratadas por 1 dia com 17 β estradiol .

Os valores são média $\pm$ EPM de experimentos independentes (n=5). O gráfico representa o conteúdo de AKT fosforilada após estímulo com insulina (17 nM) por 20 minutos. ANOVA *One-Way*, pós-teste *Student-Newman-Keuls*. *** P <0,001 vs. 0E2; §§ P <0,01 vs. 0,1E2.

4.6 Quantificação dos receptores de estrógeno (ESR1 e ESR2)

Para verificar se o tratamento com E2 exerceu algum efeito sobre a expressão de ESR1 e ESR2, o que poderia interferir nos efeitos do E2 sobre a expressão do *Slc2a4*, quantificou-se em fração de proteínas totais o conteúdo dos receptores após 1 dia de tratamento nas concentrações previamente definidas (0, 0,1 e 10 nM). Não houve alteração (Figura 10).

Figura 10- Conteúdo protéico dos receptores de estradiol em células 3T3-L1 tratadas por 1 dia com diferentes concentrações de 17-estradiol. Em **A**: conteúdo de ESR1; em **B**: conteúdo de ESR2.

Os valores são média $\pm$ EPM de experimentos independentes (n=6). ANOVA *One-Way*. $P > 0,05$.

4.7 Quantificação da proteína GLUT4 após tratamento com agonistas e antagonistas

Com o intuito de determinar a participação de cada receptor de estrógeno na regulação do GLUT4, avaliou-se o efeito da exposição à agonistas e antagonistas seletivos para as diferentes isoformas do receptor (ESR1 e ESR2). Os resultados estão apresentados na figura 11.

Após 1 dia de tratamento com agonista seletivo da isoforma 1 do receptor (PPT), houve um aumento significativo no conteúdo de GLUT4, comparado ao controle (0E2). Ao adicionar 0,1 nM de E2 ao tratamento com PPT, nenhuma alteração foi observada, em relação ao efeito isolado do PPT; porém ao adicionar 10 nM de E2 ao tratamento com PPT, houve um aumento adicional no conteúdo de GLUT4 (Figura 11A). Por outro lado, as células que foram expostas ao antagonista seletivo de ESR1 (MPP) apresentaram uma redução significativa no conteúdo do transportador quando comparadas ao controle (0E2) já na ausência de E2. Quando as células foram incubadas com MPP + E2 (0,1 nM e 10 nM), a redução no conteúdo de GLUT4 foi ainda maior (Figura 11B), evidenciando o efeito antagonista do MPP.

O tratamento com agonista seletivo da isoforma 2 (DPN) resultou em diminuição significativa no conteúdo de GLUT4 na ausência de E2. A adição de estradiol ao tratamento com DPN foi capaz de aumentar a expressão do transportador, quando comparado grupo 0E2+DPN, porém tal aumento não foi suficiente para superar os valores observados no grupo controle (Figura 11C). Após a incubação das células com o antagonista de ESR2 (PHTPP), não houve alteração no conteúdo da proteína, independentemente da presença de E2 (Figura 11D).

Figura 11- Conteúdo da proteína GLUT4 em células 3T3-L1 tratadas por 1 dia com agonistas e antagonistas seletivos de ESR1 e ESR2. Em **A**: células tratadas com agonista seletivo de ESR1 (PPT); em **B**: células tratadas com antagonista seletivo de ESR1 (MPP); em **C**: células tratadas com agonista seletivo de ESR2 (DPN); em **D**: células tratadas com antagonista seletivo de ESR2 (PHTPP).

Os valores são média $\pm$ EPM de experimentos independentes (n=6). ANOVA One-Way, pós-teste Student-Newman-Keuls. *P<0,05 vs. 0E2; **P<0,01 vs. 0E2; ***P<0,001 vs. 0E2; ###P<0,01 vs. 0E2+PPT; §§P<0,01 vs. 0E2+MPP; &P<0,05 vs. 0E2+DPN

4.8 Quantificação da expressão do gene *Slc2a4* após tratamento com agonistas e antagonistas

Os efeitos do tratamento com agonistas e antagonistas seletivos dos receptores de estradiol sobre a expressão de *Slc2a4* também foram avaliados (Figura 12).

Conforme observado na proteína, o tratamento com agonista seletivo de ESR1 (PPT) induziu um aumento significativo na expressão do gene *Slc2a4* em relação ao controle (Figura 12A), entretanto a adição de E2 10 nM não evidenciou claramente o efeito aditivo observado na proteína. Por outro lado, as células que foram expostas ao antagonista seletivo de ESR1 (MPP) apresentaram redução no conteúdo de *Slc2a4* quando comparadas ao controle (0E2), o que se exacerbou na presença de 10 nM de E2 (Figura 12B), conforme observado na proteína.

Após tratamento com DPN (Figura 12C), agonista seletivo da isoforma 2, observou-se diminuição significativa na expressão gênica de *Slc2a4* na ausência de E2; porém, a adição de E2 ao tratamento com DPN foi capaz de reverter essa diminuição (aumentou o conteúdo de *Slc2a4* em relação ao grupo 0E2+DPN), revelando o efeito do E2 sobre o ESR1. Tal aumento não foi suficiente para superar os valores observados no grupo controle. A exposição ao antagonista de ESR2 (Figura 12D) ocasionou um aumento na expressão do gene quando comparado ao grupo controle. Tal aumento também foi observado após a adição de estradiol (0,1 nM), porém desapareceu com 10 nM E2.

Figura 12- Expressão do gene *Slc2a4* em células 3T3-L1 tratadas por 1 dia com agonistas e antagonistas seletivos de ESR1 e ESR2. Em **A**: células tratadas com agonista seletivo de ESR1 (PPT); em **B**: células tratadas com antagonista seletivo de ESR1 (MPP); em **C**: células tratadas com agonista seletivo de ESR2 (DPN); em **D**: células tratadas com antagonista seletivo de ESR2 (PHTPP).

Os valores são média $\pm$ EPM de experimentos independentes (n=6). ANOVA *One-Way*, pós-teste *Student-Newman-Keuls*. * $P < 0,05$ vs. 0E2; ** $P < 0,01$ vs. 0E2; *** $P < 0,001$ vs. 0E2; §§ $P < 0,01$ vs. 0E2+MPP; ££ $P < 0,05$ vs. 0,1E2+MPP; & $P < 0,05$ vs. 0E2+DPN; ^f $P < 0,05$ vs. 0,1E2+PHTPP.

4.9 Captação de glicose após tratamento com agonistas e antagonistas

Para verificar se as alterações na expressão da proteína GLUT4 observadas após o tratamento com E2 foram acompanhadas por variação na captação de glicose, avaliou-se a captação de glicose após tratamento com E2 (figura 13).

Figura 13- Captação de glicose em células 3T3-L1 tratadas por 1 dia com agonistas e antagonistas seletivos de ESR1 e ESR2. Em **A**: células tratadas com agonista seletivo de ESR1 (PPT); em **B**: células tratadas com antagonista seletivo de ESR1 (MPP); em **C**: células tratadas com agonista seletivo de ESR2 (DPN); em **D**: células tratadas com antagonista seletivo de ESR2 (PHTPP).

Os valores são média $\pm$ EPM de experimentos independentes (n=5). O efeito estatisticamente significativo da insulina ($P < 0,05$) foi confirmado por teste *t Student* para todas as condições experimentais (resultado não mostrado). Nenhuma diferença foi observada entre os grupos sem estímulo insulínico (-) (ANOVA *One-Way*). Nos grupos que receberam o estímulo (+), houve alteração significativa na captação de glicose (ANOVA *One-Way*, pós-teste *Student-Newman-Keuls*) * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ and *** $P < 0,001$ vs. 0E2 (+); ## $P < 0,01$ vs. 0E2+PPT (+); $^{\epsilon\epsilon}$ $P < 0,05$ vs. 0,1E2+PPT (+); &&& $P < 0,001$ vs. 0E2+DPN (+); § $P < 0,05$ vs. 0,1E2+DPN (+).

4.10 Avaliação da atividade de ligação de NF- κ B ao promotor do gene *Slc2a4*

Para investigar a possível participação de NF- κ B na regulação do gene *Slc2a4* pelo estradiol, utilizou-se uma sonda específica para região promotora desse gene (NF- κ B -83/-64). O ensaio de mobilidade eletroforética revelou a formação de 3 complexos com as proteínas nucleares dos adipócitos 3T3-L1 (complexos A, B e C). A especificidade da ligação do oligonucleotídeo foi avaliada através de competição com oligonucleotídeo não marcado em excesso (30x e 100x) (Figura 14). No presente estudo, o complexo C permaneceu invariável e as alterações na intensidade de ligação após os tratamentos ocorreram de forma similar nos complexos A e B. Portanto, os resultados expostos referem-se a densitometria do complexo A, sendo que as imagens representativas mostram os dois complexos (A e B).

Após tratamento por 1 dia com E2 (0 nM, 0,1 nM e 10 nM) houve uma aparente redução na ligação do NF- κ B à região *Slc2a4* (-83/-64) no grupo 0,1E2, quando comparado aos demais grupos (0E2 e 10E2) (Figura 15).

Figura 14- Autoradiografia mostrando a formação de 3 complexos de proteínas nucleares (complexos A, B e C) ligados à sonda NF- κ B (-83/-64) (Lane 1). Competição com excesso de oligonucleotídeo não marcado 30x e 100x (Lanes 2 e 3, respectivamente).

Figura 15- Atividade de ligação de NF- κ B na região promotora do gene *Slc2a4* (-83/-60) em adipócitos 3T3-L1 tratados por 1 dia com E2 (0 nM, 0,1 nM e 10 nM).

Os valores são média $\pm$ EPM de experimentos independentes (n=6). ANOVA *One-Way*, pós-teste *Student-Newman-Keuls*. ** $P < 0,01$ vs. 0E2; ### $P < 0,001$ vs. 10E2.

4.11 Avaliação da atividade de ligação de NF- κ B ao promotor do gene *Slc2a4* após tratamento com agonistas e antagonistas

Os efeitos do tratamento com agonistas e antagonistas seletivos dos receptores de estradiol sobre a atividade de ligação de NF- κ B à região promotora do *Slc2a4* (-83/-60) foram avaliados (Figura 16).

Quando células 3T3-L1 foram tratadas com o agonista seletivo de ESR1 (PPT), observou-se uma diminuição significativa na atividade de ligação do NF- κ B à região promotora do *Slc2a4*, quando comparado ao grupo controle (0E2). Após a adição de estradiol (0,1 nM e 10 nM), houve um pequeno mas significativo aumento na atividade de ligação do fator transcricional (em relação ao grupo 0E2+PPT) que, entretanto, não foi suficiente para igualar aos valores do grupo controle (Figura 16A). Após a incubação dos adipócitos com o antagonista da isoforma 1 (MPP), não houve diferença significativa na atividade de ligação na ausência de E2; porém na presença concomitante do hormônio (0,1 nM e 10 nM), a atividade de ligação de NF- κ B aumentou significativamente em relação aos demais grupos (0E2 e 0E2+MPP) (Figura 16B).

O tratamento com agonista seletivo de ESR2 (DPN) não ocasionou nenhuma alteração na atividade de ligação do fator transcricional na ausência de E2 entretanto, redução significativa foi observada quando 0,1 nM e 10 nM de E2 foram adicionados ao DPN (Figura 16C). Após o tratamento com antagonista seletivo da isoforma 2 (PHTPP), houve redução significativa na atividade de ligação de NF- κ B na ausência de E2, e a adição de E2 ao tratamento exacerbou a redução na atividade de ligação do fator transcricional, sendo significativamente menor que o observado em 0E2 e 0E2+PHTPP (Figura 16D).

Figura 16- Intensidade de ligação de NF- κ B na região promotora do gene *Slc2a4* (-83/-60) em adipócitos 3T3-L1 tratados por 1 dia com agonistas e antagonistas seletivos de ESR1 e ESR2. Em **A**: células tratadas com agonista seletivo de ESR1 (PPT); em **B**: células tratadas com antagonista seletivo de ESR1 (MPP); em **C**: células tratadas com agonista seletivo de ESR2 (DPN); em **D**: células tratadas com antagonista seletivo de ESR2 (PHTPP).

Os valores são média $\pm$ EPM de experimentos independentes (n=6). ANOVA *One-Way*, pós-teste *Student-Newman-Keuls*. ** $P < 0,01$ vs. 0E2; *** $P < 0,001$ vs. 0E2; # $P < 0,05$ vs. 0E2+PPT; § $P < 0,05$ vs. 0E2+MPP; &&& $P < 0,001$ vs. 0E2+DPN; fff $P < 0,001$ vs. 0E2+PHTPP.

4.12 Análise da ligação das proteínas nucleares a oligonucleotídeo contendo potencial sítio ERE no promotor do *Slc2a4* de camundongo

Para avaliar a possível interação das proteínas contidas no extrato nuclear com o oligonucleotídeo ERE-*Slc2a4*, o qual contém sítio potencial de ligação de ERs no promotor do *Slc2a4* (5'-GAGGGTGGTGTGACTGGCGTG-3'), realizou-se o ensaio de mobilidade eletroforética (EMSA), no qual foi possível observar a formação de 3 complexos proteína/DNA (A, B e C). Após ensaio de competição realizado através da adição de oligonucleotídeo não marcado em excesso (10x e 100x mais), houve uma redução gradual na intensidade principalmente do complexo A (Figura 17). Na tentativa de identificar as proteínas nucleares que estão interagindo com o oligonucleotídeo foram adicionados ao extrato nuclear anticorpos anti-ESR1 e anti-ESR2. Com a adição de anticorpo anti-ESR1 antes da incubação com oligonucleotídeo marcado, também foi possível observar uma diminuição na intensidade do complexo A, mas também nos complexos B e C; a adição do anticorpo após a sonda não teve efeito algum (Figura 18A). O anticorpo anti-ESR2 colocado após a sonda também reduziu a intensidade do complexo A, e nada foi observado com a adição do anticorpo antes da sonda (Figura 18B). Tais resultados ainda carecem de mais experimentos com intuito de comprovar a ligação dos ERs diretamente ao promotor do gene *Slc2a4*.

Figura 17- Autoradiografia mostrando a formação de 3 complexos de proteínas nucleares (complexos A, B e C) ligados à dupla-fita contendo a sequência ERE potencial da região promotora do gene *Slc2a4* (Lane 1). Competição com excesso de oligonucleotídeo não marcado 10x e 100x (Lanes 2 e 3, respectivamente).

Figura 18- Identificação das proteínas nucleares que interagem com a sequência ERE da região promotora do gene *Slc2a4*. Em **A**: EMSA com adição de anticorpo anti-ESR1 ao extrato nuclear depois (Lane 2) e antes (Lane 3) do oligonucleotídeo marcado; em **B**: EMSA com adição de anticorpo anti-ESR2 ao extrato nuclear depois (Lane 2) e antes (Lane 3) do oligonucleotídeo marcado.

5 DISCUSSÃO

Atualmente, sabe-se que o estradiol, considerado um dos mais importantes hormônios envolvidos na fisiologia e reprodução femininas, também está envolvido na regulação de genes que controlam várias funções, tanto em homens quanto em mulheres, incluindo o controle da glicemia (BARROS; GUSTAFSSON, 2011; LOUET; LEMAY; MAUVAIS-JARVIS, 2004; SALPETER, 2006). Entretanto, os efeitos modulatórios do estradiol sobre a homeostasia glicêmica, bem como sobre a regulação do gene *Slc2a4* ainda não estão completamente elucidados.

Considerando estes aspectos, realizou-se inicialmente experimentos com o intuito de determinar o efeito de diferentes concentrações do E2, durante 1 e 2 dias, sobre a expressão do gene *Slc2a4* e da proteína GLUT4 em células 3T3-L1. Observou-se que 1 dia de tratamento resultou em aumento significativo no conteúdo da proteína GLUT4 e do mRNA *Slc2a4* nas doses de 0,1 nM, 1 nM e 10 nM. As concentrações de 0,1 nM e 10 nM foram então selecionadas para os estudos posteriores.

Em virtude de ESR1 e ESR2 apresentarem efeitos distintos quanto à expressão de seus genes-alvo e também, de estarem co-expressos em algumas células, a razão entre o conteúdo destes receptores se torna determinante para o tipo de efeito exercido pelo estradiol (BARROS et al., 2006b). No que concerne à regulação do conteúdo dos receptores, *in vivo*, altas concentrações de hormônio por um período de 4 dias foram capazes de reduzir o mRNA e a proteína da isoforma 1 em útero de ratas ovariectomizadas. (VARAYOUD et al., 2005). Por outro lado, um aumento significativo no mRNA desta mesma isoforma foi observado em células 3T3-L1 tratadas por 24 horas com E2 (100 nM) (RODRIGUEZ-CUENCA et al., 2005), e também em adipócitos humanos tratados por 48 horas com E2 (10 nM) foi descrito aumento no conteúdo proteico de ESR1 (ANWAR et al., 2000). No presente estudo, o tratamento com E2 não alterou o conteúdo proteico dos receptores ERs, quantificado por Western blotting, sugerindo, portanto, que as alterações de expressão de *Slc2a4*/GLUT4 não foram influenciadas por possíveis alterações na razão ESR1/ESR2.

Conforme mencionado anteriormente, já foi demonstrado em tecido adiposo que as duas isoformas de ER são expressas, com predominância de ESR1 e, além disso, que há co-localização dessas isoformas em núcleos (BARROS et al., 2009; DIEUDONNÉ et al., 2004;

RODRIGUEZ-CUENCA et al., 2005). No presente estudo, por meio de experimentos de imunofluorescência, foi possível demonstrar em adipócitos 3T3-L1 a presença dos dois receptores co-localizados em núcleo, e com predominância da isoforma 1. Vale ressaltar que a co-localização das duas isoformas em núcleo de células 3T3-L1 ainda não havia sido demonstrada e com isso, deve-se sempre ter em mente a provável interação entre ESR1 e ESR2 nos resultados aqui expostos.

Adicionalmente às observações da co-localização dos receptores por imunofluorescência, resultados interessantes foram obtidos após a adição de 10 nM de E2, quando o ESR1 foi translocado do núcleo para a membrana. De fato, a literatura relata a exportação dos ERs do núcleo (DAUVOIS; WHITE; PARKER, 1993; LUCAS et al., 2008; PEDRAM; RAZANDI; LEVIN, 2006; RAZANDI et al., 1999), porém, o exato mecanismo pelo qual ocorre tal exportação não está completamente elucidado (DEFranco, 2001). Pesquisas apontam que a translocação de ESR1 para a membrana plasmática é mediada por SRC (família de tirosina cinases) que, na presença de E2 é fosforilada, ligando-se à ESR1 e interagindo com receptores de membrana, tais como IGFR e EGFR, permitindo assim a ancoragem do ESR1 neste complexo localizado na membrana plasmática (FAN et al., 2007; LUCAS et al., 2008; RAZANDI et al., 2002; SONG; SANTEN, 2006).

Atualmente, sabe-se que além dos efeitos genômicos mediados pelos ERs, estes receptores exercem ações não-genômicas, iniciadas na superfície celular (KONIGAME et al., 2011; ROYER et al., 2012), sendo tais efeitos também denominados de ações rápidas, pois ocorrem após poucos minutos de exposição ao E2, levando à ativação de várias proteínas, tais como MAPK e PI3K/AKT (MANAVATHI; KUMAR, 2006). Neste sentido, demonstrou-se que a exposição de adipócitos 3T3-L1 ao E2 (10 nM) por 10 minutos resulta em aumento na fosforilação de AKT (KIM et al., 2012), e o tratamento de células endoteliais com 10 nM de E2 por 20 minutos ativa a PI3K através da interação ESR1/p85, com subsequente fosforilação de AKT (SIMONCINI; RABKIN; LIAO, 2003). Vale ressaltar que este efeito do E2, sobre a fosforilação de AKT via ESR1, também foi verificado em células MCF-7, mesmo após um período mais prolongado de exposição ao hormônio (1 dia) (LEE et al., 2005).

Tendo em vista tais evidências da literatura, os resultados apresentados no presente estudo sugerem que o ESR1, translocado para a membrana após tratamento com 10 nM de E2, possa

estar envolvido na modulação da fosforilação de AKT induzida por insulina, sendo que o efeito fisiológico desta alteração carece de maiores explicações.

No que diz respeito a expressão do GLUT4, estudos em animais *knockout* para as diferentes isoformas do receptor sugeriram que, em músculo esquelético, o ESR1 estimula, enquanto que o ESR2 reprime a expressão da proteína e, em tecido adiposo, o ESR1 também atua como estimulador, enquanto que o ESR2 não tem efeito (BARROS et al., 2006b e 2009). Porém, nestes estudos *in vivo*, a participação de outros mecanismos adaptativos não pode ser excluída.

Considerando a proposta de que ESR1 tenha efeito estimulador da expressão da proteína GLUT4, os resultados observados no presente estudo, no qual o E2 foi capaz de aumentar a expressão de *Slc2a4*/ GLUT4, reforçam a proposta de maior expressão de ESR1 em células adiposas. Por outro lado, existe também uma complexa regulação, no que diz respeito à modulação da expressão de genes alvos do E2, dependente não só da expressão de cada isoforma de receptor, mas também de suas atividades (CHANG et al., 2008). No que diz respeito à atividade de cada uma das isoformas, relata-se na literatura que a isoforma 2 pode atuar como repressor da atividade transcricional do ESR1 (HALL; McDONNEL, 1999; LINDBERG et al., 2003; PETTERSSON; DELAUNAY; GUSTAFSSON, 2000). Neste sentido, pesquisadores relatam que a inibição exercida pelo ESR2 é dependente da formação de homodímeros (ESR2/ESR2), os quais tem maior afinidade de ligação ao elemento responsivo a E2, deslocando a ligação de homodímeros ESR1/ESR1 (LI et al., 2004).

Visto que o tratamento com E2 aumentou a expressão do gene *Slc2a4* e, tendo em mente que a literatura propõe o ESR1 como estimulador da expressão deste gene, tais resultados não evidenciam a inibição da atividade transcricional do ESR1 pelo ESR2. Assim, pode-se sugerir que a regulação do gene *Slc2a4* observada, resulta da predominância da isoforma 1, seja como homodímero seja como heterodímero. Em relação ao heterodímero, que pode se formar quando ambos ERs co-expressam na mesma célula/núcleo, é importante destacar que já foi demonstrado que em heterodimerização é a isoforma 1 que define o padrão de efeito do E2 sobre a regulação de genes alvo (LI et al., 2004). Adicionalmente, não podemos descartar a possibilidade de que os resultados observados decorram da interação dos ERs com outros fatores transcricionais.

É interessante comentar que existem relatos na literatura a respeito da ativação seletiva de cada isoforma na dependência da concentração do ligante (CHANG et al., 2008). Assim, quando

a atividade desses receptores sobre seus genes-alvo foi avaliada, observou-se que o estímulo transcricional exercido pelo ESR1 tinha início na presença de baixas concentrações de estradiol ($<1\text{nM}$), enquanto que por ESR2, tal estímulo ocorria com concentrações mais elevadas do hormônio ($>1\text{nM}$) (PETTERSSON; DELAUNAY; GUSTAFSSON, 2000). Entretanto, no presente trabalho, esta modulação da atividade dos receptores em resposta à dose do ligante não foi evidente, tendo em vista que, mesmo em altas concentrações de E2 (até 10 nM), houve um aumento na expressão do gene *Slc2a4* e da proteína GLUT4, supondo uma maior participação de ESR1 em concentrações elevadas. Entretanto, é importante observar que nos estudos iniciais, quanto se testou o efeito do E2 até a concentração de 100 nM sobre a expressão do mRNA do *Slc2a4*, esta dose fez desaparecer o efeito estimulador das concentrações menores (1 e 10 nM), então sugerindo o aparecimento de um efeito repressor mediado pelo ESR2.

Tendo em vista a dificuldade na determinação do efeito de cada isoforma nos resultados observados, e, além disso, dos poucos relatos na literatura a respeito da inter-relação entre as isoformas em 3T3-L1, buscou-se esclarecer a real participação de cada ER sobre a expressão do *Slc2a4*/GLUT4 utilizando-se agonistas e antagonistas seletivos para cada isoforma.

O agonista PPT é um potente estimulador da atividade de ESR1, apresentando afinidade 410 vezes maior por essa isoforma e praticamente não exibe nenhuma ligação ao ESR2 (STAUFFER *et. al.*, 2000). Estudos *in vivo* utilizando este composto demonstraram efeitos similares aos observados com o agonista natural (E2), quando o efeito mediado por ESR1 é predominante (HARRIS; KATZENELLENBOGEN; KATZENELLENBOGEN, 2002).

No presente trabalho, o PPT aumentou a expressão do mRNA *Slc2a4* e da proteína GLUT4, confirmando, definitivamente, a proposta de que ESR1 seja um estimulador da expressão do GLUT4 (BARROS *et. al.*, 2006b e 2009). A regulação da expressão do GLUT4 pelo PPT aqui observada foi acompanhada por aumento na captação de glicose estimulada por insulina, nos grupos 0E2+PPT e 0,1E2+PPT, estando em concordância com a literatura, no qual células 3T3-L1 expostas ao agonista PPT (10^{-8}M) aumentaram captação de glicose (MURAKI; OKUYA; TANIZAWA, 2006). Vale ressaltar que apesar do aumento na expressão do GLUT4 no grupo 10E2+PPT não houve alteração na captação de glicose, sugerindo que o aumento na concentração de E2 prejudicou a translocação do GLUT4 para a membrana plasmática após estímulo insulínico, o que poderia ser um efeito mediado por ESR2, acionado pela alta concentração de E2.

De outra maneira, quando o antagonista desta isoforma foi utilizado (MPP), houve diminuição na expressão de *Slc2a4*/GLUT4, enfatizando o importante papel de ESR1 na modulação do GLUT4. Além disso, esta diminuição foi mais evidente após adição de E2 ao tratamento, provavelmente em virtude da maior ativação do ESR2. Vale ressaltar que a diminuição da expressão do GLUT4 após exposição ao MPP foi acompanhada por diminuição da captação de glicose sob estímulo insulínico. No trabalho anteriormente citado (MURAKI; OKUYA; TANIZAWA, 2006), o tratamento de adipócitos com MPP (10^{-6} M) reverteu o efeito estimulatório de E2 (10 nM) sobre a captação de glicose, com isso, os resultados obtidos no presente estudo estão em concordância com as evidências na literatura que demonstram a importante participação da isoforma 1 na captação de glicose pelo tecido adiposo e consequentemente na homeostasia glicêmica reguladas pelo E2.

Outra abordagem utilizada no presente estudo, para buscar esclarecer as ações de cada isoforma de ER sobre a expressão do GLUT4, foi a exposição dos adipócitos ao agonista de ESR2 (DPN). Esta droga, que possui 70 vezes mais afinidade pela isoforma 2 (MEYERS et al., 2001), exerceu um efeito negativo na expressão de *Slc2a4*/GLUT4 e na captação de glicose estimulada pela insulina. Barros et al. (2006), utilizando o mesmo agonista em animais *knockout* para a enzima aromatase (ARKO), observaram redução significativa da expressão de GLUT4 em músculo esquelético, já indicando o papel repressor de ESR2 sobre a expressão do gene *Slc2a4* neste tecido. No presente estudo, a adição de E2 ao tratamento com DPN fez o conteúdo de *Slc2a4* e da proteína GLUT4, bem como a captação de glicose (10E2+DPN) retornarem aos valores do grupo controle, provavelmente como resultado da ação positiva da isoforma 1.

Após tratamento com o antagonista da isoforma 2 (PHTPP), observou-se aumento na expressão do gene *Slc2a4* quando comparado ao grupo controle (0E2), e a adição de E2 (0,1 nM) ao tratamento tornou este aumento ainda mais evidente. Entretanto, após a adição de 10 nM de E2 ao tratamento com PHTPP, o conteúdo de *Slc2a4* retornou aos valores observados no grupo controle, provavelmente em virtude da translocação de ESR1 para a membrana, com consequente redução no conteúdo deste receptor no núcleo.

Evidências demonstrando que animais *knockout* para a enzima aromatase apresentam resistência à insulina menos grave, quando comparados aos animais *knockout* para ESR1 (JONES et al., 2000), demonstram o provável efeito negativo de ESR2 sobre a sensibilidade à insulina e, além disso, revelam o papel oposto entre as duas isoformas sobre a homeostasia

glicêmica. No mesmo sentido, Naaz et al. (2002) observaram que animais *knockout* para a isoforma 1, quando ovariectomizados, apresentaram redução de peso, diminuição da massa adiposa e melhora no controle glicêmico.

Conforme mencionado anteriormente, sabe-se que o estradiol é capaz de modular a expressão gênica por meio da interação dos seus receptores com outros fatores transcricionais (NILSSON et al., 2001), dentre eles o Fator Nuclear- κ B (NF- κ B) (GALIEN; GARCIA, 1997; BISWAS et al., 2005), descrito como um importante inibidor da expressão do gene *Slc2a4* (FURUYA et al., 2012; RUAN et al., 2002; SILVA et al., 2005).

A literatura revela que existem diversos mecanismos pelos quais os ERs são capazes de reduzir a atividade de NF- κ B, que incluem a regulação da degradação do fator transcricional, a competição por co-fatores nucleares e/ou a interação direta entre ER e NF- κ B (GUZELOGLU-KAYISLI et al., 2008; McKAY; CIDLOWSKI, 1999). Barros et al. (2006b) propuseram que a interação ESR1/NF- κ B impediria a ligação do NF- κ B à região promotora do gene do GLUT4, diminuindo assim o efeito inibitório deste fator transcricional sobre a expressão de *Slc2a4*.

No presente estudo, observou-se que o tratamento com E2 foi capaz de reduzir a atividade de ligação de NF- κ B à região promotora de *Slc2a4* na dose de 0,1 nM, porém este efeito desapareceu em 10 nM. Este resultado evidencia a importante participação de ESR1 sobre a inibição da ligação do fator transcricional à região promotora de *Slc2a4* em doses menores de E2. Em 10 nM de E2, tendo em vista os resultados de imunofluorescência, o ESR1 foi translocado para fora do núcleo, então fazendo desaparecer seu efeito na ligação de NF- κ B ao promotor do *Slc2a4*. A exposição aos agonistas e antagonistas de ERs também foi capaz de alterar a atividade de ligação do NF- κ B, sempre de forma inversamente proporcional ao observado na expressão do mRNA do *Slc2a4*. Após tratamento com PPT, houve uma redução na atividade de ligação do NF- κ B ao promotor do *Slc2a4*, sugerindo uma provável interação entre ESR1 e o fator transcricional, corroborando a hipótese proposta por Barros et al. (2006b). A adição de E2 ao tratamento, com o intuito de ativar concomitantemente a isoforma 2, ocasionou um aumento na ligação do fator transcricional quando comparado ao grupo tratado somente com PPT, indicando que o efeito repressor do ESR2 sobre o *Slc2a4* envolveria ativação do NF- κ B. Entretanto tal aumento não foi capaz de igualar os valores observados no grupo controle (0E2), supondo que a participação do ESR1 na regulação do gene *Slc2a4*, por meio de seu efeito inibidor da atividade de NF- κ B, foi preponderante sobre os efeitos do ESR2.

Outra evidência do mecanismo pelo qual o ESR1 estimula a expressão gênica de *Slc2a4* é o resultado da atividade de ligação de NF-κB após tratamento com o antagonista desta isoforma. Após a inibição de ESR1 por MPP, na ausência de E2, não houve alteração na ligação do fator transcricional, entretanto, quando E2 foi adicionado e, portanto, somente a isoforma 2 passou a agir, significativo aumento na ligação de NF-κB foi observado.

Também foram interessantes os resultados obtidos com o tratamento com agonista de ESR2 (DPN), quando, na ausência de E2, não houve aumento na atividade de ligação de NF-κB. Com isso, pode-se supor que a isoforma 1 seja capaz de exercer algum efeito constitutivo sobre NF-κB, agindo mesmo na ausência de ligante, dificultando a ligação do fator transcricional à região promotora do gene *Slc2a4*. Neste sentido, em linhagem de células de câncer de mama, pesquisadores relataram a capacidade de ESR1 de interagir com NF-κB independente de E2 (NAKSHATRI et al., 1997). Os resultados após a adição de E2 ao tratamento com DPN estão em concordância com a literatura, tendo em vista que o efeito da ativação de ESR1 por E2 se sobrepôs ao efeito da ativação de ESR2 por DPN, ocasionando uma diminuição na ligação de NF-κB ao promotor. Conforme observado, os efeitos da isoforma 1 estão sempre se sobrepondo aos da isoforma 2, sendo este um resultado da predominância de ESR1 no modelo experimental utilizado e/ou da formação de heterodímeros.

Semelhantes resultados foram observados após tratamento com antagonista de ESR2 (PHTPP), no qual houve redução na atividade de ligação do NF-κB, evidenciando, mais uma vez a participação da isoforma 1, mesmo na ausência de ligante. Após adição de E2 ao tratamento com PHTPP, ocorreu uma redução mais pronunciada na ligação do fator transcricional ao promotor, efeito este exercido por ESR1.

Vale destacar que, até o presente momento, não há estudos na literatura comprovando a participação do NF-κB na regulação do gene *Slc2a4* pelo E2, tornando promissores os resultados obtidos até o presente momento, no que concerne ao esclarecimento dos mecanismos moleculares envolvidos nesta modulação.

Sabendo da importante regulação da expressão de genes pelos ERs, e tendo em mente que a região promotora o gene *Slc2a4* contém sítios semelhantes à sequência consenso do ERE, avaliou-se a possível ligação dos receptores diretamente ao promotor do *Slc2a4*.

Através de adição de oligonucleotídeo frio (sem marcação com ³²P) em excesso para ensaio de competição (10x e 100x), foi possível observar uma redução gradual na intensidade de um

dos complexos formados (complexo A), e, além disso, após incubação das proteínas nucleares com anticorpos específicos para as duas isoformas houve também uma redução na intensidade do mesmo complexo, sugerindo que este possa representar uma ligação específica dos ERs presentes no extrato nuclear ao oligonucleotídeo utilizado. Entretanto, conforme mencionado anteriormente, tais resultados ainda necessitam de mais experimentos que comprovem a ligação dos ERs diretamente ao promotor do gene *Slc2a4*.

Em suma, a partir dos resultados acima discutidos, fica evidente a regulação da expressão gênica de *Slc2a4* por E2 em células 3T3-L1, porém os mecanismos envolvidos nesta regulação parecem ser bastante complexos. Os resultados indicam o ESR1 como um ativador da transcrição do gene *Slc2a4* e como principal modulador do efeito induzido por E2, o que envolve uma inibição da atividade de ligação do NF- κ B no promotor do *Slc2a4*. Em contrapartida, o ESR2 age como um inibidor do gene *Slc2a4*, também envolvendo o fator de transcrição NF- κ B. Além disso, os achados obtidos quanto à ligação dos receptores diretamente ao promotor do gene *Slc2a4*, apesar de preliminares, são muito promissores, tendo em vista que a regulação da expressão deste gene diretamente pelos ERs nunca foi demonstrada.

6 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados demonstram que o 17β -estradiol regula a expressão de *Slc2a4*/GLUT4 em adipócitos 3T3-L1, sendo que o ESR1 atua como estimulador e o ESR2, repressor de tal expressão. Além disso, estes efeitos são parcialmente mediados por NF- κ B e resultam em alteração na captação de glicose.

REFERÊNCIAS*

- ANWAR, A.; MCTERNAN, P. G.; ANDERSON, L. A.; ASKAA, J.; MOODY, C. G.; BARNETT, A. H.; EGGO, M. C.; KUMAR, S. Site-specific regulation of oestrogen receptor- α and - β by oestradiol in human adipose tissue. *Diabetes Obes. Metab.*, v. 3, p. 338-349, 2001.
- BARROS, R. P.; MACHADO, U. F.; GUSTAFSSON, J. A. Estrogen receptors: new players in diabetes mellitus. *TRENDS Mol. Med.*, v. 12, n. 9, p. 425-431, 2006a.
- BARROS, R. P.; MACHADO, U. F.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J. A. Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ER β and ER α . *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 103, p. 1605-1608, 2006b.
- BARROS, R. P.; MORANI, A.; MORISCOT, A.; MACHADO, U. F. Insulin resistance of pregnancy involves estrogen-induced repression of muscle GLUT4. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v. 295, p. 24-31, 2008.
- BARROS, R. P.; GABBI, C.; MORANI, A.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J. A. Participation of ER α and ER β in glucose homeostasis in skeletal muscle and white adipose tissue. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v. 297, p. 124-133, 2009.
- BARROS, R. P.; GUSTAFSSON, J. A. Estrogen receptors and the metabolic network. *Cell. Metab.*, v. 14, n. 3, p. 289-299, 2011.
- BEN-JONATHAN, N.; CHEN, S.; DUNCKLEY, J. A.; LAPENSEE, C.; KANSRA, S. Estrogen Receptor- α Mediates the Epidermal Growth Factor-Stimulated Prolactin Expression and Release in Lactotrophs. *Neuroendocrinology*, v. 150, p. 795-802, 2009.
- BISWAS, D. K.; SINGH, S.; SHI, Q.; PARDEE, A. B.; DIRK IGLEHART, J. Crossroads of estrogen receptor and NF- κ B signaling. *Sci. STKE.*, v. 14, n. 288, p. 1-4, 2005.
- BJORNHOLM, M.; ZIERATH, J. R. Insulin signal transduction in human skeletal muscle: identifying the defects in Type II diabetes. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 33, n. 2, p. 354-357, 2005.
- CARMECI, C.; THOMPSON, D. A.; RING, H. Z.; FRANCKE, U.; WEIGEL, R. J. Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics*, v. 45, p. 607-617, 1997.
- CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. Vias de sinalização da insulina. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v. 46, p. 419-425, 2002.

*De acordo com:

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

CASE, A. M.; REID, R. L. Menstrual cycle effects on common medical conditions. *Compr. Ther.*, v. 27, n. 1, p. 65-71, 2001.

CHANG, E. C.; CHARN, T. H.; PARK, S. H.; HELFERICH, W. G.; KOMM, B.; KATZENELLENBOGEN, J. A.; KATZENELLENBOGEN, B. S. Estrogen Receptors alpha and beta as determinants of gene expression: influence of ligand, dose, and chromatin binding. *Mol. Endocrinol.*, v. 22, n. 5, p. 1032-1043, 2008.

CHEN, Y. H.; LEE, M. J.; CHANG, H. H.; HUNG, P. F.; KAO, Y. H. 17 beta-estradiol stimulates resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes via the estrogen receptor, extracellularly regulated kinase, and CCAAT/enhancer binding protein-alpha pathways. *Endocrinology*, v. 147, p. 4496-4504, 2006.

COOKE, P. S.; HEINE, P. A.; TAYLOR, J. A.; LUBAHN, D. B. The role of estrogen and estrogen receptor- α in male adipose tissue. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v. 178, p. 147-154, 2001.

COWLEY, S. M.; HOARE, S.; MOSSELMAN, S.; PARKER, M. G. Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *J. Biol. Chem.*, v. 272, p. 19858-19862, 1997.

DAUVOIS, S.; WHITE, R.; PARKER, M. G. The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *J. Cell. Sci.*, v. 106, p. 1377-1388, 1993.

DEFranco, D. B. Nuclear export: DNA-binding domains find a surprising partner. *Curr. Biol.*, v. 11, p. 1036-1037, 2001.

DEMAYO, F. J.; ZHAO, B.; TAKAMOTO, N.; TSAI, S. Y. Mechanisms of action of estrogen and progesterone. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 955, p. 48-59, 2002.

DIEUDONNÉ, M. N.; LENEVEU, M. C.; GIUDICELLI, Y.; PECQUERY, R. Evidence for functional estrogen receptors α and β in human adipose cells: regional specificities and regulation by estrogens. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, v. 286, p. 655-661, 2004.

DUNAIF, A.; SEGAL, K. R.; FUTTERWEIT, W.; DOBRJANSKY, A. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes*, v. 38, n. 9, p. 1165-1174, 1989.

DOS SANTOS, E. G.; DIEUDONNE, M. N.; PECQUERY, R.; LE MOAL, V.; GIUDICELLI, Y.; LACASA, D. Rapid nongenomic E2 effects on p42/p44 MAPK, activator protein-1, and cAMP response element binding protein in rat white adipocytes. *Endocrinology*, v. 43, p. 930-940, 2002.

FAN, P.; WANG, J.; SANTEN, R. J.; YUE, W. Long-term treatment with tamoxifen facilitates translocation of estrogen receptor α out of the nucleus and enhances its interaction with EGFR in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.*, v. 67, p. 1352-1360, 2007.

FILARDO, E. J.; QUINN, J. A.; BLAND, K. I.; FRACKELTON JR, A. R. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF *Mol. Endocrinol.*, v. 14, p. 1649-1660, 2000.

FISHER, C. R.; GRAVES, K. H.; PARLOW, A. F.; SIMPSON, E. R. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the *cyp19* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 95, p. 6965-6970, 1998.

FURUYA, D. T.; POLLETO, A. C.; FAVARO, R.; MARTINS, J. O.; ZORN, T. M.; MACHADO, U. F. Anti-inflammatory effect of atorvastatin ameliorates insulin resistance in monosodium glutamate-treated obese mice. *Metabolism*, v. 59, n. 3, p. 395-399, 2010.

FURUYA, D. T.; POLETO, A. C.; FREITAS, H. S.; MACHADO, U. F. Inhibition of cannabinoid CB1 receptor upregulates Slc2a4 expression via nuclear factor- κ B and sterol regulatory element-binding protein-1 in adipocytes. *J. Mol. Endocrinol.*, v. 49, n. 2, p. 97-106, 2012.

GALIEN, R.; GARCIA, T. Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF-kappaB site. *Nucleic Acids Res.*, v. 25, n. 12, p. 2424-2429, 1997.

GARFIN, D. E. One-dimensional gel electrophoresis. *Methods Enzymol.*, v. 182, p. 425-441, 1990.

GARVEY, W. T.; MAIANU, L.; ZHU, J. H.; HANCOCK, J. A.; GOLICHOWSKI, A. M. Multiple defects in the adipocyte glucose transport system cause cellular insulin resistance in gestational diabetes. Heterogeneity in the number and a novel abnormality in subcellular localization of GLUT4 glucose transporters. *Diabetes*, v. 42, p. 1773-1785, 1993.

GIELEN, S. C.; SANTEGOETS, L. A.; KÜHNE, L. C.; VAN IJCKEN, W. F.; BOERS-SIJMONS, B.; HANIFI-MOGHADDAM, P.; HELMERHORST, T. J.; BLOK, L. J.; BURGER, C. W. Genomic and nongenomic effects of estrogen signaling in human endometrial cells: involvement of the growth factor receptor signaling downstream AKT pathway. *Reprod. Sci.*, v. 14, p. 646-654, 2007.

GREEN, S.; WALTER, P.; KUMAR, V.; KRUST, A.; BORNERT, J. M.; ARGOS, P.; CHAMBON, P. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erbA. *Nature*, v. 320, p. 134-139, 1986.

GREENE, G. L.; GILNA, P.; WATERFIELD, M.; BAKER, A.; HORT, Y.; SHINE, J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science*, v. 231, p. 1150-1154, 1986.

GUZELOGLU-KAYISLI, O.; HALIS, G.; TASKIRAN, S.; KAYISLI, U.A.; ARICI, A. DNA-binding ability of NF-kappaB is affected differently by ERalpha and ERbeta and its activation results in inhibition of estrogen responsiveness. *Reprod. Sci.* v. 15, p. 493-505, 2008.

HALL, J. M.; McDONNELL, D. P. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology*, v. 140, p. 5566-5578, 1999.

HALL, J. M.; COUSE, J. F.; KORACH, K. S. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J. Biol. Chem.*, v. 276, p. 36869-36872, 2001.

HARRIS, H. A.; KATZENELLENBOGEN, J. A.; KATZENELLENBOGEN, B. S. Characterization of the biological roles of the estrogen receptors, ERalpha and ERbeta, in estrogen target tissues in vivo through the use of an ERalpha-selective ligand. *Endocrinology*, v. 143, n. 11, p. 4172-4177, 2002.

HELDING, N.; PIKE, A.; ANDERSSON, S.; MATTHEWS, J.; CHENG, G.; HARTMAN, J.; TUJAGUE, M.; STRÖM, A.; TREUTER, E.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J. A. Estrogen Receptors: How do they signal and what are their targets. *Physiol. Rev.*, v. 87, p. 905-931, 2007.

HELGUERO, L. A.; FAULDS, M. H.; GUSTAFSSON, J. A.; HALDOSÉN, L. A. Estrogen receptors alfa (ER α) and beta (ER β) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11. *Oncogene*, v. 24, p. 6605-6616, 2005.

ISHIKI, M.; KLIP, A. Minireview: Recent Developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: New signals, locations, and partners. *Endocrinology*, v. 146, n. 12, p. 5071-5078, 2006.

JENSEN, E. V.; JACOBSON, H. I. Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Progress Horm. Res.*, v. 18, p. 387-414, 1962.

JONES, M. E.; THORBURN, A. W.; BRITT, K. L.; HEWITT, K. N.; WREFORD, N. G.; PROIETTO, J.; OZ, O. K.; LEURYI, B. J.; ROBERTSON, K. M.; YAO, S.; SIMPSON, E. R. Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 97, n. 23, p. 12735-12740, 2000.

KAAJA, R. J.; GREER, I. A. Manifestation of chronic disease during pregnancy. *Jama*, v. 294, n. 21, p. 2751-2757, 2005.

KALAITZIDIS, D.; GILMORE, T. D. Transcription factor cross-talk: the estrogen receptor and NF-kappaB. *Trends. Endocrinol. Metab.*, v. 16, p. 46-52, 2005.

KIM, J. Y.; JO, K. J.; KIM, B. J.; BAIK, H. W.; LEE, S. K. 17 β -estradiol induces an interaction between adenosine monophosphate-activated protein kinase and the insulin signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Int. J. Mol. Med.*, v. 18, 2012 [Epub ahead of print].

KOEHLER, K. F.; HELGUERO, L. A.; HALDOSÉN, L. A.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J. A. Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor β . *Endocr. Rev.*, v. 26, n. 3, p. 465-478, 2005.

KONIGAME, V. C.; SIU, E. R.; ROYER, C.; LUCAS, T. F.; PORTO, C. S.; ABDALLA, F. M. Estrogen receptors mediate rapid activation of phospholipase C pathway in the rat endometrium. *Steroids*, v. 20, p. 1582-1589, 2011.

KRAICHELY, D.M.; SUN, J.; KATZENELLENBOGEN, J. A.; KATZENELLENBOGEN, B. S. Conformational changes and coactivator recruitment by novel ligands for estrogen receptor- α and estrogen receptor- β : correlations with biological character and distinct differences among SRC coactivator family members. *Endocrinology*, v. 141, n. 10, p. 3534–3545, 2000.

KREGE, J. H.; HODGIN, J. B.; COUSE, J. F.; ENMARK, E.; WARNER, M.; MAHLER, J. F.; SAR, M.; KORACH, K. S.; GUSTAFSSON, J. A.; SMITHIES, O. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor β . *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 95, p. 15677–15682, 1998.

KUIPER, G. G.; ENMARK, E.; PELTO-HUIKKO, M.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J. A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 93, p. 5925–5930, 1996.

LAHM, T.; CRISOSTOMO, P. R.; MARKEL, T. A.; WANG, M.; WANG, Y.; TAN, J.; MELDRUM, D. R. Selective estrogen receptor- α and estrogen receptor- β agonists rapidly decrease pulmonary artery vasoconstriction by a nitric oxide-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v. 295, n. 5, p. 1486-1493, 2008.

LEE, Y. R.; PARK, J.; YU, H. N.; KIM, J. S.; YOUN, H. J.; JUNG, S. H. Up-regulation of PI3K/Akt signaling by 17 β -estradiol through activation of estrogen receptor- α , but not estrogen receptor- β , and stimulates cell growth in breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 336, n. 4, p. 1221-1226, 2005.

LI, X.; HUANG, J.; YI, P.; BAMBARA, R. A.; HILF, R.; MUYAN, M. Single-chain estrogen receptors (ERs) reveal that the ER α /ER β heterodimer emulates functions of the ER α dimer in genomic estrogen signaling pathways. *Mol. Cell. Biol.*, v. 24, p. 7681-7694, 2004.

LINDBERG, M. K.; MOVÉRARE, S.; SKRTIC, S.; GAO, H.; DAHLMAN-WRIGHT, K.; GUSTAFSSON, J. A.; OHLSSON, C. Estrogen receptor (ER)- β reduces ER- α regulated gene transcription, supporting a “Ying Yang” relationship between ER α and ER β in mice. *Mol. Endocrinol.*, v. 17, n. 2, p. 203–208, 2003.

LOUET, J. F.; LEMAY, C.; MAUVAIS-JARVIS, F. Antidiabetic actions of estrogen: insight from human and genetic mouse models. *Curr. Atheroscler. Rep.*, v. 6, n. 3, p. 180-185, 2004.

LUBAHN, D. B.; MOYER, J. S.; GOLDING, T. S.; COUSE, J. F.; KORACH, K. S.; SMITHIES, O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 90, n. 23, p. 11162-11166, 1993.

LUCAS, T. F.; SIU, E. R.; ESTEVES, C. A.; MONTEIRO, H. P.; OLIVEIRA, C. A.; PORTO, C. S.; LAZARI, M. F. 17beta-estradiol induces the translocation of the estrogen receptors ESR1 and ESR2 to the cell membrane, MAPK3/1 phosphorylation and proliferation of cultured immature rat Sertoli cells. *Biol. Reprod.*, v. 78, p. 101-114, 2008.

MACHADO, U. F. Transportadores de glicose. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v. 42, n. 6, p. 413-421, 1998.

MACHADO, U. F.; SCHAAN, B. D.; SERAPHIM, P. M. Transportadores de glicose na síndrome metabólica. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v. 50, n. 2, p. 177-189, 2006.

MALAMAS, M. S.; MANAS, E. S.; MCDEVITT, R. E.; GUNAWAN, I.; XU, Z. B.; COLLINI, M. D.; MILLER, C. P.; DINH, T.; HENDERSON, R. A.; KEITH, J. C. JR.; HARRIS, H. A. Design and synthesis of aryl diphenolic azoles as potent and selective estrogen receptor-beta ligands. *J. Med. Chem.*, v. 47, n. 21, p. 5021-5040, 2004.

MANAVATHI, B.; KUMAR, R. Steering estrogen signals from the plasma membrane to the nucleus: two sides of the coin. *J. Cell. Physiol.*, v. 207, n. 3, p. 594-604, 2006.

MATTHEWS, J.; WIHLÉN, B.; TUJAGUE, M.; WAN, J.; STRÖM, A.; GUSTAFSSON, J. A. Estrogen receptor (ER) β modulates ER α -mediated transcriptional activation by altering the recruitment of c-Fos and c-Jun to estrogen-responsive promoters. *Mol. Endocrinol.*, v. 20, n. 3, p. 534-543, 2006.

MCKAY, L. I.; CIDLOWSKI, J. A. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr. Rev.*, v. 20, p. 435-459, 1999.

MEYERS, M. J.; SUN, J.; CARLSON, K. E.; MARRINER, G. A.; ATZENELLENBOGEN, B. S.; KATZENELLENBOGEN, J. A. Estrogen receptor- β potency-selective ligands: structure-activity relationship studies of diarylpropionitriles and their acetylene and polar analogues. *J. Med. Chem.*, v. 44, p. 4230-4251, 2001.

MURAKI, K.; OKUYA, S.; TANIZAWA, Y. Estrogen receptor α regulates insulin sensitivity through IRS-1 tyrosine phosphorylation in mature 3T3-L1 adipocytes. *Endocr. J.*, v. 53, n. 6, p. 841-851, 2006.

NAAZ, A.; ZAKROCZYMSKI, M.; HEINE, P.; TAYLOR, J.; SAUNDERS, P.; LUBAHN, D.; COOKE, P. S. Effect of ovariectomy on adipose tissue of mice in the absence of estrogen receptor alpha (ERalpha): a potential role for estrogen receptor beta (ERbeta). *Horm. Metab. Res.*, v. 34, p. 758-763, 2002.

NAKSHATRI, H.; BHAT-NAKSHATRI, P.; MARTIN, D. A.; GOULET, R. J. JR.; SLEDGE, G. W. JR. Constitutive Activation of NF-kB during Progression of Breast Cancer to Hormone-Independent Growth. *Mol. Cell. Biol.*, v. 17, p. 3629-3639, 1997.

NILSSON, S.; MÄKELÄ, S.; TREUTER, E.; TUJAGUE, M.; THOMSEN, J.; ANDERSSON, G.; ENMARK, E.; PETTERSSON, K.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J. A. Mechanisms of estrogen action. *Physiol. Rev.*, v. 81, n. 4, p. 1535-1565, 2001.

NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J. A. Estrogen receptors: Therapies targeted to receptor subtypes. *Clin. Pharmacol. Ther.*, v. 89, p. 44-55, 2011.

O'DOWD, B. F.; NGUYEN, T.; MARCHESE, A.; CHENG, R.; LYNCH, K. R.; HENG, H. H.; KOLAKOWSKI JR, L. F.; GEORGE, S. R. Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics*, v. 47, p. 310-313, 1998.

OKUNO, S.; AKAZAWA, S.; YASUHI, I.; KAWASAKI, E.; MATSUMOTO, K.; YAMASAKI, H.; MATSUO, H.; YAMAGUCHI, Y.; NAGATAKI, S. Decreased expression of the GLUT4 glucose transporter protein in adipose tissue during pregnancy. *Horm. Metab. Res.*, v. 27, p. 231-234, 1995.

PEDRAM, A.; RAZANDI, M.; LEVIN, E. R. Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Mol. Endocrinol.*, v. 20, n. 9, p. 1996-2009, 2006.

PETTERSSON, K.; DELAUNAY, F.; GUSTAFSSON, J. A. Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling. *Oncogene*, v. 19, n. 43, p. 4970-4980, 2000.

RAZANDI, M.; PEDRAM, A.; GREENE, G.; LEVIN, E. R. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Endocrinol.*, v. 13, n. 2, p. 307-319, 1999.

RAZANDI, M.; OH, P.; PEDRAM, A.; SCHNITZER, J.; LEVIN, E. R. ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol. Endocrinol.*, v. 16, p. 100-115, 2002.

RYDER, J. W.; CHIBALIN, A. V.; ZIERATH, J. R. Intracellular mechanisms underlying increases in glucose uptake in response to insulin or exercise in skeletal muscle. *Acta. Physiol. Scand.*, v. 171, p. 249-257, 2001.

RODRIGUEZ-CUENCA, S.; MONJO, M.; PROENZA, A. M.; ROCA, P. Depot differences in steroid receptor expression in adipose tissue: possible role of the local steroid milieu. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v. 288, p. 200-207, 2005.

ROYER, C.; LUCAS, T. F.; LAZARI, M. F.; PORTO, C.S. 17Beta-Estradiol Signaling and Regulation of Proliferation and Apoptosis of Rat Sertoli Cells. *Biol. Reprod.*, v. 86, n. 4, p. 1-13, 2012.

RUAN, H.; HACOHEM, N.; GOLUB, T. R.; VAN PARIS, L.; LODISH, H. F. Tumor necrosis factor- α suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes. Nuclear factor- κ B activation by TNF- α is obligatory. *Diabetes*, v. 51, p. 1319-1336, 2002.

- SALPETER, S. R.; WALSH, J. M.; ORMISTON, T. M.; GREYBER, E.; BUCKLEY, N. S.; SALPETER, E. E. Meta-analysis: effect of hormone-replacement therapy on components of the metabolic syndrome in postmenopausal women. *Diabetes Obes. Metab.*, v. 8, p. 538–554, 2006.
- SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, v. 13, n. 414, p. 799–806, 2001.
- SAVAGE, D. B.; PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Disordered lipid metabolism and pathogenesis of insulin resistance. *Physiol. Rev.*, v. 87, p. 507–520, 2007.
- SILVA, J. L. T.; GIANNOCO, G.; FURUYA, D. T.; LIMA, G. A.; MORAES, P.; NACHEF, S.; BORDIN, S.; BRITTO, L. R.; NUNES, M. T.; MACHADO, U. F. NF- κ B, MEF2A, MEF2D and HIF1- α involvement on insulin and contraction-induced regulation of GLUT4 gene expression in soleus muscle. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v. 240, p. 82–93, 2005.
- SIMONCINI, T.; RABKIN, E.; LIAO, J. K. Molecular basis of cell membrane estrogen receptor interaction with phosphatidylinositol 3-kinase in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 23, n. 2, p. 198–203, 2003.
- SOLOMON, C. G.; HU, F. B.; DUNAIF, A.; RICH-EDWARDS, J.; WILLETT, W. C.; HUNTER, D. J.; COLDITZ, G. A.; SPEIZER, F. E.; MANSON, J. E. Long or highly irregular menstrual cycles as a marker for risk of type 2 diabetes mellitus. *Jama*, v. 286, n. 19, p. 2421–2426, 2001.
- SONG, R. X.; ZHANG, Z.; SANTEN, R. J. Estrogen rapid action via protein complex formation involving ER α and Src. *Trends Endocrinol. Metab.*, v. 16, p. 347–353, 2005.
- SONG, R. X.; SANTEN, R. J. Membrane initiated estrogen signaling in breast cancer. *Biol. Reprod.*, v. 75, p. 9–16, 2006.
- SPENCER, C. P.; GODSLAND, I. F.; STEVENSON, J. C. Is there a menopausal metabolic syndrome? *Gynecol. Endocrinol.*, v. 11, n. 5, p. 341–355, 1997.
- STAUFFER, S. R.; COLETTA, C. J.; TEDESCO, R.; NISHIGUCHI, G.; CARLSON, K.; SUN, J.; KATZENELLENBOGEN, B. S.; KATZENELLENBOGEN, J. Á. Pyrazole ligands: structure-affinity/activity relationships and estrogen receptor- α -selective agonists. *J. Med. Chem.*, v. 43, p. 4934–4947, 2000.
- SWEENEY, G.; SOMWAR, R.; RAMLAL, T.; VOLCHUK, A.; UEYAMA, A.; KLIP, A. An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase prevents insulin-stimulated glucose transport but not glucose transporter translocation in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes. *J. Biol. Chem.*, v. 274, n. 15, p. 10071–10078, 1999.
- TAKEDA, K.; TODA, K.; SAIBARA, T.; NAKAGAWA, M.; SAIKA, K.; ONISHI, T.; SUGIURA, T.; SHIZUTA, Y. Progressive development of insulin resistance phenotype in male mice with complete aromatase (CYP19) deficiency. *J. Endocrinol.*, v. 176, p. 237–246, 2003.

THORENS, B.; CHARRON, M. J.; LODISH, H. F. Molecular physiology of glucose transporter. *Diabetes Care*, v. 13, n. 3, p. 209-218, 1990.

VARAYOUD, J.; RAMOS, J. G.; MONJE, L.; BOSQUIAZZO, V.; MUNOZ-DE-TORO, M.; LUQUE, E. H. The estrogen receptor alpha sigma 3 mRNA splicing variant is differentially regulated by estrogen and progesterone in the rat uterus. *J. Endocrinol.*, v. 186, p. 51-60, 2005.

WANG, T.; ZHANG, X.; LI, J. J. The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses. *Int. Immunopharmacol.*, v. 2, p. 1509-1520, 2002.

WATSON R.; PESSIN J. Subcellular compartmentalization and trafficking of the insulin-responsive glucose transporter, Glut4. *Exp. Cell Research*. v. 271, p. 75-83, 2001.

WELLEN, K. E.; GÖKHAN, S. H. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest.*, v. 115, n. 5, p. 1111-1119, 2005.

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*, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.

XING, H.; NORTHROP, J. P.; GROVE, J. R.; KILPATRICK, K. E.; SU, J. L.; RINGOLD, G. M. TNF alpha-mediated inhibition and reversal of adipocyte differentiation is accompanied by suppressed expression of PPARgamma without effects on Pref-1 expression. *Endocrinology*, v. 138, n. 7, p. 2776-2783, 1997.

ZHAO, F.; KEATING, A. Functional Properties and Genomics of Glucose Transporters. *Curr. Genomics*. v. 8, p. 113-128, 2007.

ZORZANO, A.; PALACIN, M.; GUMÁ, A. Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.*, v. 183, p. 43-58, 2005.