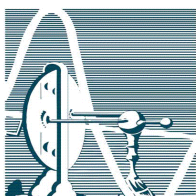


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**

**BRUNO MOULIN DE ANDRADE**

**Papel da cinase ativada por AMP sobre a  
capacidade da célula tireóidea em captar iodeto e glicose**



**Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho  
Universidade Federal do Rio de Janeiro  
2010**



# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**BRUNO MOULIN DE ANDRADE**

**Papel da cinase ativada por AMP sobre a  
capacidade da célula tireóidea em captar iodeto e glicose**

TESE SUBMETIDA A UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE  
JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM  
CIÊNCIAS

**ORIENTADORA:** Prof<sup>ª</sup>. Denise Pires de Carvalho

Rio de Janeiro

2010

Andrade, Bruno Moulin

Papel da cinase ativada por AMP na capacidade da células tireóidea em captar iodeto e glicose/ Bruno Moulin de Andrade. Rio de Janeiro, UFRJ, 2010.

xvii:82 f

Tese de Doutorado para Obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas (Fisiologia), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2010.

Orientadora: Denise Pires de Carvalho

1. AMPK. 2. Captação de iodeto. 3. Co-transportador sódio-iodeto. 4. Captação de glicose. 5. Glândula tireóidea

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia Endócrina Doris Rosenthal do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob a orientação da professora Denise Pires de Carvalho, com apoio financeiro das seguintes instituições:

**Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro;**  
**(FAPERJ);**

**Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior;**  
**(CAPES);**

**Programa de Apoio a Núcleos de Excelência;**  
**(PRONEX-MCT);**

**Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.**  
**(CNPq).**

*Dedico esta tese para minha mãe, pai (em memória), irmã e sobrinhas Lana e Maitê.*

“O que me interessa são as relações entre as artes, a ciência e a filosofia. Não há nenhum privilégio de uma dessas disciplinas em relação a outra. Cada uma delas é criadora.”

“[...] trata-se da constituição de modos de existência, ou da invenção de possibilidades de vida que também dizem respeito à morte, a nossas relações com a morte: não a existência como sujeito, mas como obra de arte. Trata-se de inventar modos de existência, segundo regras facultativas, capazes de resistir ao poder bem como se furta ao saber, mesmo se o saber tenta penetrá-los e o poder tenta apropriar-se deles. Mas os modos de existência ou possibilidades de vida não cessam de se recriar, e surgem novos.”

Gilles Deleuze.

“É preciso saber perder-se quando queremos aprender algo das coisas que nós próprios não somos.”

“Dizeis que acreditais em Zaratustra? Mas que importa Zaratustra! Sois meus crentes; mas que importam todos os crentes!

Ainda não vois haveis procurado a vós mesmos: então me achastes. Assim fazem todos os crentes; por isso, valem tão pouco todas as crenças.

Agora, eu vos mando perder-vos e achar-vos a vós mesmos; e somente depois que todos me tiverdes renegado, eu voltarei a vós.

Em verdade, com outros olhos, meus irmãos, procurarei, então, os que perdi; com outro amor, então, vos amarei”.

Friedrich Nietzsche

“Tudo já foi dito. Mas é preciso dizer novamente...”

Andre Gide.

## Agradecimentos

Gostaria de iniciar agradecendo a minha orientadora Denise Pires de Carvalho pela confiança e oportunidade para realização deste trabalho. Ressalto a maneira como conduziu a orientação, sempre respeitando meu tempo e capacidade para repetir, refletir e seguir em frente e dando toques sutis mas que mudavam completamente a maneira de interpretar os dados. Admiro sua capacidade de realizar mais de 8.000 tarefas ao mesmo tempo. Posso dizer que sob sua orientação saio desse processo de doutorado diferente do que entrei, muito obrigado.

À professora Doris Rosenthal que colaborou com esta tese, revisando-a com muita rapidez e competência. Agradeço ainda por toda sua contribuição ao longo do meu desenvolvimento acadêmico dentro do laboratório.

Às professoras Tamar Frankenfeld e Vânia Costa, pelos conselhos e idéias que foram dados durante esses anos no laboratório.

À professora Andrea Ferreira por toda idéias, conselhos (foram muitas discussões sobre os mais variados temas, da ciência a culinária italiana) e pela primeira revisão ao texto desse trabalho. Andreiia, obrigado!

Ao camarada Álvaro Souto Padrón por toda ajuda nos experimentos e nos ensinamentos de como jogar o jogo...Obrigado também pela caipiras e Ana Luzia nos eventos fora do laboratório.

À Elaine de Souza por toda ajuda com as células em cultura e nos experimentos de captação e western. Tudo começou com nossa parceria para ter uma sala de cultura...Foi ótimo saber que, no final, minha tese complementa a sua, principalmente porque a AMPK parece controlar a mTOR...

Aos alunos de iniciação Fabio Hecht e Juliana Menezes que a partir de agora serão os mais dedicados e estudiosos de toda a universidade no desenvolvimento das perspectivas futuras desse trabalho.

Aos companheiros de laboratório, Maria Carolina dos Santos, Mariana Lopes e William Braga pela preciosa ajuda no cultivo das células PCCL3

Aos demais amigos de laboratório, Alba Cenélia, Ana Lúcia Rocha, Carlos Frederico Gonçalves, Daniele Inácio (Ta cheia da marra hein?), Felipe Mousovich (braço), Luciene Cardoso (Professora Luciene), Mônica Mühlbauer, Monique Leandro (bocó), Rodrigo Fortunado, Ricardo Cortez, Thiago Pantalão (meu querido!), agradeço por todos os anos de convívio.



Aos técnicos do laboratório, Advaldo Nunes (o mestre), que nunca me deixou na mão. Muito obrigado. Norma de Araújo e José Humberto Tavares (Beto), por todo o apoio técnico de excelente qualidade.

Ao companheiro Wagner que tem o dom de transformar os ambientes, as pessoas e os acontecimentos como em um filme “em busca da terra do nunca”. Obrigado pelos enémeros dias de diversão e brincadeiras dentro do laboratório. Que holda esteja com você!!

Ao pesquisador Rolando Cedida pela sua contribuição no desenvolvimento desse trabalho realizado em parceria no seu laboratório na Universidade York - Canadá.

Aos meus familiares, em especial minha mãe Angela e irmã Erika, as quais dedico esse trabalho, pela compreensão e força que me deram durante esses anos de doutorado.

À minha Reee (Renata Lopes Araujo), que mudou completamente minha vida e participou de todas as etapas de elaboração desse trabalho. Não há nada mais especial nessa tese do que o toque sutil da sua presença em cada experimento e em cada parte desse texto. Muito obrigado, sem você eu não teria conseguido...

## ***Lista de figuras***

**Figura 1** - Esquema representativo da biossíntese dos hormônios tireóideos. Página 5

**Figura 2** - Figura esquemática mostrando a estrutura secundária do NIS. Página 8

**Figura 3** - Desenho esquemático mostrando a ativação da AMPK por fosforilação da treonina-172 pelas cinases LKB1, CaMKK $\beta$ , TAK1. Página 17

**Figura 4** - Expressão da subunidade  $\alpha$  da AMPK no músculo solear, na glândula tireóidea e na linhagem de células foliculares de tireóide PCCL3. Página 33

**Figura 5** - Efeito dose resposta de AICAR sobre a expressão das enzimas AMPK e ACC nas formas total e fosforilada e sobre a captação de iodeto nas células PCCL3. Página 35

**Figura 6** - Efeito do inibidor da AMPK, composto C na presença ou não do AICAR sobre (A) a expressão das enzimas AMPK e ACC nas formas total e fosforilada (B) sobre a captação de iodeto nas células PCCL3 em diferentes tempos. Página 36

**Figura 7** - Efeito da administração de uma única dose de AICAR sobre a expressão das enzimas AMPK e ACC nas formas total e fosforilada e sobre a captação de iodeto. Página 38

**Figura 8** - Efeito do composto C, na presença e ausência do TSH sobre a expressão das enzimas AMPK e ACC nas formas total e fosforilada sobre a captação de iodeto nas células PCCL3. Página 41

**Figura 9** - Efeito da retirada do TSH por 48h na presença ou ausência de composto C, H89 e Foscrolina sobre a expressão da enzima AMPK nas formas total e fosforilada nas células PCCL3. Página 42

**Figura 10** - Efeito da retirada do TSH por 48h sobre a expressão da enzima LKB1 nas células PCCL3. Página 43

**Figura 11** - Efeito do tratamento com AICAR em diferentes tempos e na presença ou ausência de composto C, sobre a expressão do NIS nas células PCCL3. Página 44

**Figura 12** - Efeito dose resposta de AICAR sobre a captação de glicose nas células PCCL3. Página 45

**Figura 13** - Efeito tempo dependente do tratamento com AICAR, composto C ou ambos sobre a captação de glicose nas células PCCL3. Página 46

**Figura 14** - Efeito do tratamento com AICAR, composto C ou ambos sobre a expressão de GLUT1 e GLUT 4 nas células PCCL3. Página 47

**Figura 15** - Efeito do tratamento com AICAR, composto C ou ambos sobre a expressão de AS160 nas células PCCL3. Página 48

**Figura 16** – Efeito do tratamento com AICAR por 4 dias sobre a massa corporal, ingestão e concentração séricas dos hormônios T4, T3 e TSH em ratos Wistar machos. Página 49

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**ACC** - Acetil-coA carboxilase

**AICAR** - 5-aminoimidazole-4-carboxamida-1- $\beta$ -D-ribofuranosida

**AG** - ácido graxo

**AGCL** - ácidos graxos livres

**ADP** - adenosina difosfato

**AMP** - adenosina monofosfato

**ATP** - adenosina trifosfato

**AMPc** – adenosina monofosfato cíclico

**AMPK** - cinase ativada por AMP

**Composto C** - (6-[4-(2-piperidina-1-yl-etoxil)-fenil]-3-piridina-4-yl-pirrazolo[1,5-a] pirimidina)

**CPM** - contagem por minuto

**DMEM** - meio de cultura essencial modificado dubeco

**F12** - meio de cultura modificado ham

**h** - hora

**HT** - hormônios tireóideos

**i.p.** - intraperitoneal

**Jak** – via de sinalização Janus-cinase

**Jak-STAT** – via de transdução de sinal Jak-STAT

**m.c.** – massa corporal

**NADPH** – nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato

**NIS** – co-transportador  $\text{Na}^+/\text{I}^-$

**RIE** - radioimunoensaio

**RNAm** – ácido ribonucléico mensageiro

**SEM** – erro padrão da média

**SFB** – soro fetal bovino

**SNC** – sistema nervoso central

**STAT** – sinal ativador de transcrição e tradução

**T3** – 3, 5, 3' triiodotironina

**T4** – 3, 5, 3', 5 tetraiodotironina ou tiroxina

**TAM** – tecido adiposo marrom

**TPO** – tireoperoxidase

**TRH** – hormônio liberador de tireotrofina

**TSH** – hormônio estimulador da tireóide ou tireotrofina

**TSH-R** – receptor de TSH

## Resumo

A regulação da captação de iodeto e de glicose pelas células tireóides é fundamental para a biossíntese dos hormônios tireóides, e para o diagnóstico do câncer de tireóide. Avaliamos o papel da cinase ativada por AMP (AMPK), sobre a regulação da captação de iodeto e glicose nas células PCCL3, e na glândula tireóide de ratos Wistar. Demonstramos que a AMPK está expressa na glândula tireóide de ratos e nas células PCCL3. A incubação com ativador da AMPK, AICAR, causa redução significativa na captação de iodeto de maneira dose e tempo dependentes. O inibidor da AMPK, composto C, não somente reverte os efeitos do AICAR sobre a captação de iodeto, quanto aumenta este processo acima dos níveis do grupo controle. O mecanismo pelo qual a AMPK diminui a captação se dá pela redução da expressão do co-transportador  $\text{Na}^+/\text{I}^-$ . Observamos que uma única dose de AICAR em ratos foi suficiente para ativar a AMPK e inibir a captação de iodeto *in vivo*. A incubação com AICAR aumenta a captação de glicose de maneira dose e tempo dependentes, enquanto que o composto C reverte esse efeito. O mecanismo pelo qual esse efeito acontece não está relacionado a expressão dos transportadores de glicose GLUT1/4, nem com a fosforilação da proteína AS160. A via de sinalização do TSH mediada por PKA inibe a ativação da AMPK, em um processo que independe da cinase LKB1. Em conclusão, AMPK está presente na glândula tireóide e participa da regulação da captação de iodeto e glicose.

## **Abstract**

The regulation of iodide and glucose uptake is a very important step in the synthesis of thyroid hormones and in the diagnostic of thyroid cancer. Therefore, we evaluate the role of AMP-activated protein kinase (AMPK), on the regulation of iodide and glucose uptake in PCCL3 cells and on thyroid gland of male Wistar rats. We showed for the first time that AMPK is expressed in the thyroid gland and its activation through AICAR induces a significant decrease of iodide uptake in a dose and time dependent manner. The AMPK inhibitor, compound C, not only completely prevented AICAR-induced inhibition of iodide uptake, but also increased this variable over control values. The mechanism by which these alterations occur is related with a significant decrease in the expression of the sodium-iodide transporter. We also, showed that one injection of AICAR decreased the iodide uptake in vivo. The incubation with AICAR increased glucose uptake in a dose and time dependent manner, and compound C completely reverted this effect. The mechanism behind these effects is not related to the expression of glucose transporters, GLUT 1/4, or increased in phosphorylated or total protein AS160. The intracellular pathway of TSH effect driven by PKA inhibits AMPK activation independently of LKB1 expression. In conclusion, AMPK is present in the thyroid gland and regulates iodide and glucose uptake.

## **SUMÁRIO**

Lista de figuras	ix
Lista de abreviaturas	xi
Resumo	xiii
Abstract	xiv
Sumário	xv
<b>1 – INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 – TRANSPORTE DE IODETO	5
1.1.1 - Regulação da Expressão do NIS	8
1.1.2 - Controle pós-transcricional do NIS	11
1.2 – METABOLISMO INTERMEDIÁRIO DO TIREÓCITO	12
1.3– CINASE ATIVADA POR AMP	15
1.3.1 - Controle da captação de glicose pela AMPK	18
1.4 - RELAÇÃO ENTRE AMPK E A GLÂNDULA TIREÓIDE	19
<b>2 – OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
2.1 – OBJETIVO GERAL	21
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
<b>3 - MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>22</b>
3.1 – MATERIAIS	22
3.2 – <u>ESTUDO 1</u> : EFEITO DA ATIVAÇÃO E INIBIÇÃO	23



FARMACOLÓGICA DA AMPK SOBRE A CAPTAÇÃO DE GLICOSE NAS CÉLULAS PCCL3 E DE IODETO NA GLÂNDULA TIREÓIDE E NAS CÉLULAS PCCL3	
3.2.1 – Cultivo Celular	23
3.2.2 - Tratamento das células PCCL3 com AICAR, composto C, H89 e forskolina	23
3.2.3 – Ensaio de captação de iodeto pelas células PCCL3	24
3.2.4 - Ensaio de captação de iodeto pelas células PCCL3	25
3.2.5 - Análise da expressão das proteínas AMPK, ACC, AS160, GLUT1/4, LKB1 e NIS por <i>Western Blot</i>	26
3.2.6 - Animais	27
3.2.7 - Administração de AICAR	27
3.2.8 - Captação de radioiodo pela glândula tireóide	28
3.3 - <u>ESTUDO 2</u> : EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE AICAR POR 4 DIAS SOBRE A FUNÇÃO TIREÓIDEA EM RATOS WISTAR	28
3.3.1 - Administração de AICAR	28
3.3.2 - Sacrifício dos Animais	29
3.3.3 - Dosagem do TSH sério	29
3.3.4 - Dosagem de T3 e T4 sérios	30
3.4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
<b>4 – RESULTADOS</b>	<b>32</b>

4.1 – <u>ESTUDO 1</u> : EFEITO DA ATIVAÇÃO E INIBIÇÃO	32
FARMACOLOGICA DA AMPK SOBRE A CAPTAÇÃO DE GLICOSE NAS CÉLULAS PCCL3 E DE IODETO NA GLÂNDULA TIREÓIDE E NAS CÉLULAS PCCL3	
4.1.1 – Expressão das subunidades $\alpha 1$ e $\alpha 2$ da AMPK na glândula tireóide e nas células PCCL3	32
4.1.2 – Efeito do AICAR e composto C sobre a fosforilação da AMPK e ACC e captação de iodeto <i>in vitro</i>	33
4.1.3 – Efeito do AICAR sobre a fosforilação da AMPK e ACC e captação de iodeto <i>in vivo</i>	37
4.1.4 – Efeito do TSH sobre a ativação da AMPK	39
4.1.5 - Mecanismo pelo qual o TSH suprime a ativação da AMPK nas células PCCL3	42
4.1.6 - Mecanismo pelo qual a ativação da AMPK inibe a captação de iodeto nas células PCCL3	43
4.1.7 - Efeito do AICAR e composto C sobre captação de glicose e expressão dos GLUT1, GLUT4 e AS160 nas células PCCL3	44
4.2 – <u>ESTUDO 2</u> : EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE AICAR POR 4 DIAS SOBRE FUNÇÃO TIREÓIDEA EM RATOS WISTAR	48
<b>5 – DISCUSSÃO</b>	50
<b>6 – CONCLUSÃO</b>	57
<b>7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	58

## **1. INTRODUÇÃO**

Uma das principais características dos mamíferos é a capacidade de transformar a energia proveniente dos alimentos em energia metabólica, necessária para manutenção das mais diversas funções fisiológicas (ERECINSKA & WILSON, 1982). Igualmente importante é a capacidade de equilibrar as taxas de gasto e produção de energia, que pode ser ilustrada pela chamada balança energética, na qual de um lado temos a ingestão alimentar e do outro o gasto de energia do organismo (ROTHWELL & STOCK, 1981).

No âmbito fisiológico, o sistema neuro-endócrino é o principal responsável pela regulação precisa do balanço energético do organismo. A glândula tireóide desempenha papel fundamental nessa regulação através da produção dos hormônios tireóideos (tiroxina - T<sub>4</sub>; 3,3'-5- triiodotironina - T<sub>3</sub>) (TATA et al 1962; HULBERT, 2000; KIM, 2008).

No âmbito celular, a relação ATP/ADP é a que melhor representa o equilíbrio entre gasto e produção de energia. As principais vias de produção de energia nas células são a glicólise e a fosforilação oxidativa mitocondrial, sendo esta última responsável por mais de 80% da produção de ATP (ERECINSKA & WILSON, 1982).

A glândula tireóide é um dos maiores órgãos endócrinos do corpo, chegando a pesar até 20g em adultos. Ela é composta de dois lobos interligados por uma estrutura chamada de istmo. A unidade funcional da tireóide é chamada de foliculo e é composto por uma única camada de células tireóideas, organizadas em forma esféricas. No centro dessa estrutura encontra-se uma substância rica em proteína chamada de colóide. O principal constituinte do colóide é a proteína

tireoglobulina, que é sintetizada pela célula folicular, secretada no colóide e utilizada como precursora dos hormônios tireóideos (HT), T4 e T3 (Larsen *et al*, 2002).

A célula epitelial do folículo tireóideo é polarizada, contendo a membrana apical, voltada para o colóide, onde estão localizadas as enzimas tireoperoxidase e NADPH oxidase, fundamentais para iodação da tireoglobulina e síntese hormonal, e a membrana basolateral que está em contato com a corrente sanguínea e onde se encontram o co-transportador  $\text{Na}^+/\text{I}^-$ , a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, o receptor do hormônio tireotrófico (TSH), entre outras proteínas (CAPENN 1996; ROSS *et al* 1993) (**Figura 1**).

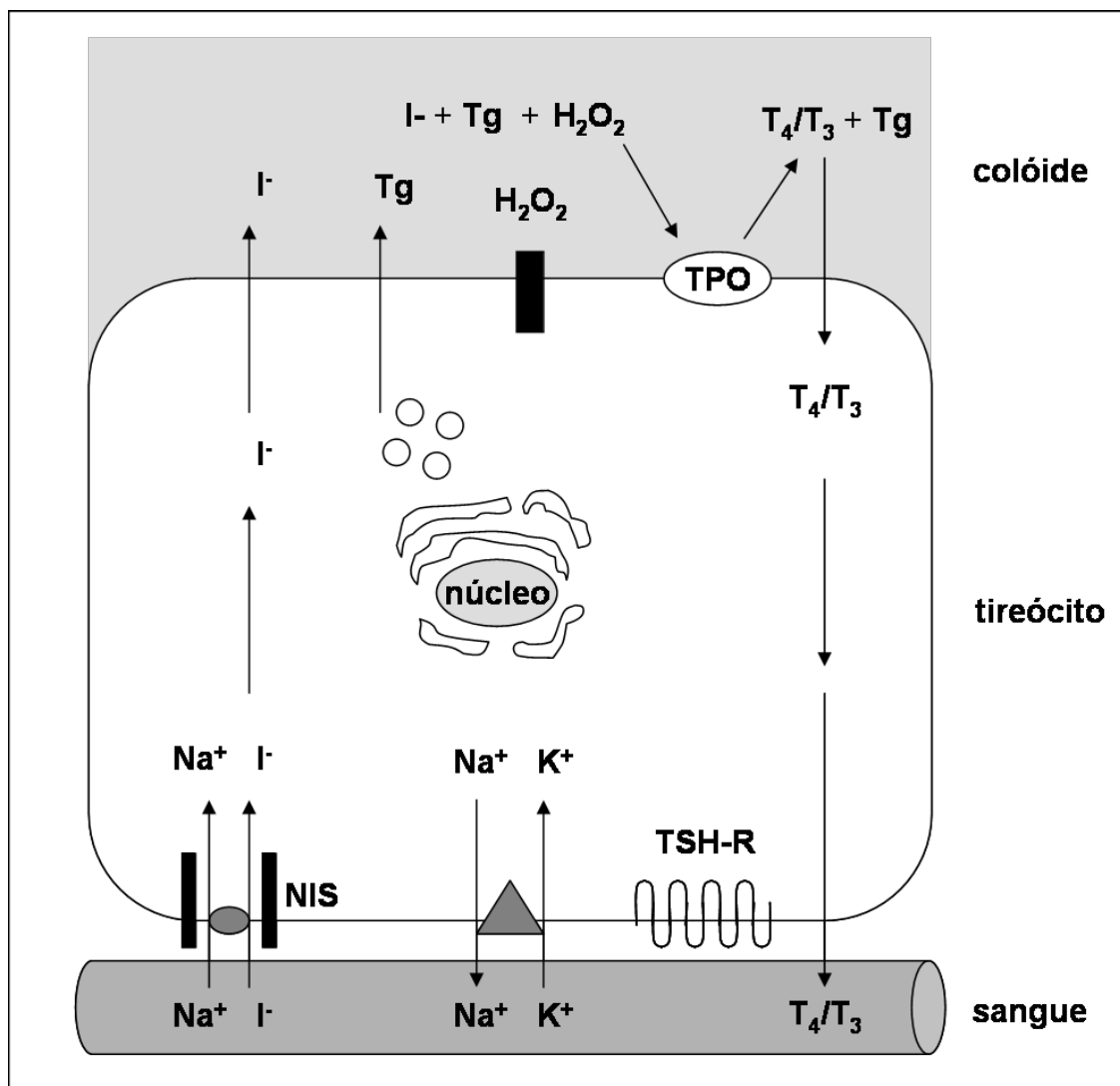
O metabolismo e a função das células foliculares, está sob regulação do eixo hipotálamo-adenohipófise. A função de todo esse complexo é regulada por um modelo básico de retroalimentação negativa envolvendo o hormônio liberador de tireotrofina (TRH), produzido pelo hipotálamo, o hormônio tireotrófico, produzido pela hipófise, e os hormônios tireóideos, produzidos pelas células foliculares da tireóide. O TSH, produzido por células da adenohipófise denominadas de tireotrofos, é o principal regulador da função tireóidea (LARSEN *et al* 2002). Esse hormônio possui duas cadeias peptídicas, alfa e beta, e exerce seus efeitos através da ligação com seu receptor que pertence à superfamília dos receptores acoplados a proteína G: Gs e Gq (RASPE & DUMONT, 1991). Assim, quando o TSH se liga ao seu receptor na membrana basolateral das células foliculares, ocorre dissociação do trímero da proteína Gs e a subunidade Gas induz a ativação da enzima adenilato ciclase que aumenta a síntese de AMP-cíclico desencadeando uma cascata de sinalização intracelular. Já foi demonstrado também, que em altas concentrações, a ligação do TSH ao seu

receptor leva a ativação da fosfolipase C, através da proteína Gq, que induz a produção de inositol-3-fosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG) desencadeando uma outra cascata de sinalização intracelular. Como consequência, ocorre uma série de modificações no metabolismo do tireócito, ocorrendo estímulo de todas as etapas de síntese e secreção hormonal, além da proliferação celular (LARSEN *et al*, 2002; CORVILAIN *et al* 1994).

A célula tireóidea, utiliza predominantemente ácidos graxos para a produção de energia necessária para as suas funções como transporte de iodeto, síntese e secreção hormonal (BERBEROF-VAN-SANDE *et al* 1972). Outro substrato importante é a glicose que, apesar de contribuir pouco na produção de ATP através da glicólise, tem um papel fundamental na via das pentoses produzindo NADPH, necessário para a síntese dos HT. O TSH estimula a utilização de ATP na célula tireóidea através do estímulo de todas as etapas de síntese e secreção hormonais. Dessa forma, com o gasto de ATP, há uma diminuição da relação ATP/ADP na célula, o que aumenta o fluxo das vias de produção de ATP restabelecendo a relação (BERBEROF-VAN-SANDE *et al* 1972).

A captação de iodeto é uma das principais etapas na produção dos HT e é diretamente influenciada pela relação ATP/ADP. Esse processo é realizado pelo co-transportador sódio-iodeto (NIS) e depende da manutenção do gradiente eletroquímico do sódio, mantido pela  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase na membrana basal (LARSEN *et al* 2002). Já foi demonstrado que, na presença de inibidores da respiração mitocondrial, a captação de iodeto é drasticamente reduzida. Em parte, o mecanismo para tal inibição parece estar relacionado à diminuição na atividade da  $\text{Na}/\text{K}$  ATPase. Porém vias de sinalização reguladas pela relação ATP/ADP também podem estar envolvidas (WOLFF, 1964).

A cinase ativada por AMP (AMPK) tem sido descrita como um importante integrador de sinais que controla o balanço energético celular. A AMPK é um dos componentes de uma cascata de proteínas cinases, e é ativada por modificações na relação AMP:ATP, atuando assim como “sensor energético” intracelular (KAHN et al 2005). Nos tecidos periféricos, a AMPK está relacionada a importantes efeitos no metabolismo, participando das vias de regulação de moléculas responsáveis pelo controle da captação de glicose e ácidos graxos, bem como do armazenamento e utilização desses substratos no músculo esquelético, tecido adiposo, fígado, coração e células  $\beta$  do pâncreas (STEINBERG & KEMP, 2009). No entanto, apesar de poucos estudos terem avaliado a relação entre as ações dos HT sobre o metabolismo energético e a modulação da expressão e da atividade da AMPK em diversos tecidos, o papel da AMPK na tireóide ainda é desconhecido. Devido a sua forma de ativação, postulamos que a AMPK possa influenciar tanto processos que consomem energia como a captação de iodeto, quanto da regulação de utilização de substratos energéticos, como a glicose.



**Figura 1** - Esquema representativo da biossíntese dos hormônios tireóideos. Tg: tireoglobulina, TPO: tireoperoxidase, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio; I<sup>-</sup>: iodeto; T<sub>4</sub>: tiroxina; T<sub>3</sub>: triiodotironina; TSH-R: receptor do hormônio tireotrófico; NIS: co-transportador de Na<sup>+</sup> e I<sup>-</sup>, Δ Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> ATPase: enzima sódio potássio ATPase (Adaptado de FILETTI *et al*, 1999).

### 1.1 Transporte de Iodeto

A glândula tireóidea possui importante papel no controle do metabolismo intermediário, da taxa metabólica basal, da ingestão alimentar, além de ser fundamental para o desenvolvimento do sistema nervoso central no feto e neonato (LARSEN *et al* 2002; TATA *et al* 1962). Toda essa gama de efeitos da

tireóide é desempenhado pelos hormônios tireóideos triiodotironina (T3) e tiroxina (T4), os únicos hormônios que possuem iodo em sua estrutura em todos os vertebrados. O iodeto ( $I^-$ ), é portanto, um constituinte essencial para os HT de modo que toda a função tireóidea depende de um aporte adequado desta molécula (LARSEN et al 2002). Dessa forma, um sistema especializado está presente na glândula tireóide para garantir que grande parte do  $I^-$ , ingerido na dieta se acumule na tireóide para ser utilizado na síntese dos HT (LA VIEJA et al 2000). A relevância desse sistema se torna mais aparente quando constatamos que o  $I^-$  é escasso no ambiente. O bócio endêmico e o cretinismo, causados principalmente por uma insuficiência na ingestão de  $I^-$ , é um grande problema de saúde pública em diversos países afetando milhões de pessoas em todo o mundo (LA VIEJA et al 2000).

O estudo da captação de iodeto pela glândula tireóide se tornou de grande importância também para o diagnóstico através da cintilografia, utilizando iodeto radioativo, bem como no tratamento para destruir células tireóideas hiperfuncionantes como na doença de Graves (RIESCO-EIZAGUIRRE & SANTISTEBAN, 2006; FILETTI et al 1999).

A capacidade das células tireóideas em concentrar iodo foi primeiramente descrita em 1915. Devido a essa capacidade, a glândula tireóide acumula de 20-40 vezes mais iodeto do que sua concentração plasmática. Dessa forma, a presença de um transportador específico foi sugerida e diversas características desse transporte foram descobertas antes da clonagem do co-transportador  $Na^+/I^-$  (NIS) em 1996 (WOLFF, 1964). Assim, o acúmulo de iodeto na tireóide é um processo ativo secundário, dependente da  $Na^+ - K^+$  ATPase, estimulado pelo TSH



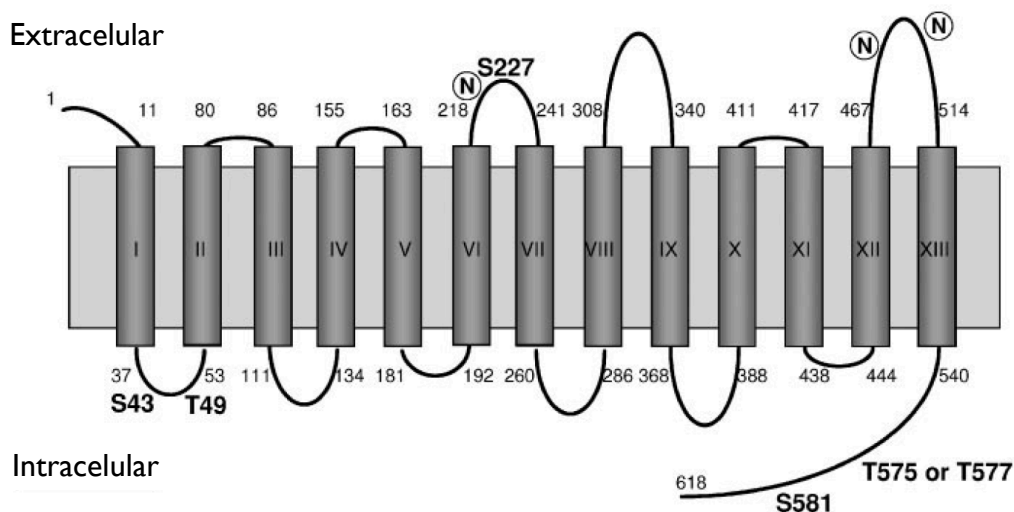
e inibido competitivamente pelos ânions tiocianato e perclorato (LA VIEJA et al 2000).

O gene humano do NIS está localizado no cromossomo 19p12-13.2 e codifica uma glicoproteína integral de membrana que possui 618 aminoácidos, com massa de 70-90 kDa. O gene compreende 15 exons interrompidos por 14 íntrons e uma sequência de leitura de 1929 nucleotídeos (LA VIEJA et al 2000). Devido à sua característica funcional, o NIS faz parte da família dos transportadores de soluto 5A (SLC5A). Em todos os membros dessa família, o transporte do soluto (no caso do NIS o iodeto) depende do gradiente eletroquímico do sódio como força propulsora, ou seja, através da força do gradiente eletroquímico do sódio, o iodeto é transportado contra seu gradiente eletroquímico. A atividade da  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase restabelece o gradiente eletroquímico do sódio para que este possa ser novamente utilizado no transporte de iodeto. Durante um ciclo de transporte, são deslocados 2 íons de sódio e 1 iodeto para dentro da célula (BIZHANOVA & KOPP, 2009).

A estrutura do NIS prevê 13 domínios transmembrana, com a região N-terminal voltada para o meio extracelular e a região COOH-terminal voltada para o citosol. A proteína madura possui 3 sítios de glicosilação, ainda que estes não pareçam estar envolvidos na estabilidade, atividade e endereçamento para a membrana basal. Foi demonstrado que a região COOH-terminal possui diversos sítios de fosforilação, porém o significado fisiológico deste achado ainda tem que ser esclarecido (LA VIEJA et al 2000; VADYSIRISACK et al 2007) (**Figura 2**).

Além da glândula tireóide, o NIS é expresso em diversos outros tecidos como na glândula salivar, glândula mamária em lactação e na mucosa gástrica. A expressão do NIS nesses tecidos confere a eles a habilidade de transportar iodeto

desempenhando importante papel fisiológico, como a capacidade de transmitir iodeto para o recém nato através do leite materno (BIZHANOVA & KOPP, 2009).



**Figura 2** - Figura esquemática mostrando a estrutura secundária do NIS com 13 domínios transmembrana e os sítios de fosforilação. Adaptado de VADYSIRISACK et al 2008).

### **1.1.1 Regulação da Expressão do NIS**

O TSH é o principal regulador da síntese de NIS na tireóide, aumentando significativamente o conteúdo de iodeto na glândula. A partir da ligação do hormônio, ocorre tanto ativação da cascata de sinalização envolvendo adenilato cinase - AMPc,-PKA, quanto ativação de uma subunidade Gq levando a ativação da fosfolipase C. Antes da caracterização da proteína NIS em 1996, diversos estudos demonstraram que o TSH estimulava a captação de iodeto na tireóide em um processo que era dependente de AMPc e de síntese de proteína (WEISS et al 1984). Após a clonagem do NIS, os estudos revelaram que existem pelo menos dois mecanismos de regulação do NIS pelo TSH: o primeiro, e mais óbvio, é o

aumento na transcrição e tradução do gene do NIS, estimulada diretamente pela via do AMPc. O segundo envolve a regulação pós-traducional do NIS que será discutida mais adiante (RIEDEL et al 2001; WEISS et al 1984).

A regulação da expressão os NIS pela via TSH-TSHR-AMPc-PKA, parece ser um consenso na literatura, apesar de já ter sido demonstrado que o aumento do AMPc estimula a síntese de NIS independentemente da ativação da PKA . Foi postulado que a via das cinases ativadas por mitógeno MEK-ERK esta envolvida na estimulação que independe da PKA, porém não há consenso sobre a participação desta via no estímulo à síntese do NIS (RIESCO-EIZAGUIRRE & SANTISTEBAN, 2006; LA VIEJA et al 2000) .

Pelo menos 2 fatores de transcrição têm sido relacionados com o controle da expressão do NIS e de outras proteínas tireóide específicas: TITF-1 e PAX-8 (BARATTA et al, 2009). TITF-1 é um fator de transcrição, envolvido no desenvolvimento tireóideo, que possui sítios responsivos na região promotora do gene do NIS, ainda que o significado fisiológico para este achado tenha que ser melhor esclarecido. O fator com domínio-pareado 8, PAX-8, também possui sítios de ligação em um elemento responsivo à montante, necessário para a transcrição do NIS, sendo considerado o principal fator de transcrição que regula a expressão do NIS (ZABALLOS et al, 2008). De fato, já foi demonstrado que a ativação de PAX-8 pela via TSHR-PKA é fundamental para a expressão do NIS em células tireóideas que foram de-diferenciadas induzindo-se a expressão do oncogene Ras (BARATTA et al, 2009).

Recentemente, foram descritas vias de sinalização capazes de inibir a síntese de NIS. A ligação do TSH ao seu receptor, causa a dissociação da subunidade G $\alpha$ s da subunidade G $\beta\gamma$ . Enquanto a subunidade G $\alpha$ s leva ao

aumento do AMPc e à ativação da transcrição do NIS, ZABALLOS et al (2008) demonstraram que a subunidade G $\beta$ y inibe a expressão do NIS ao ativar a via da PI3K-Akt. O mecanismo para essa inibição está relacionado a uma diminuição da ligação ao PAX-8 com o promotor do NIS. O mesmo mecanismo é atribuído à sinalização desencadeada por TGF- $\beta$ /SMAD que também inibe a síntese de NIS estimulada por TSH. Dessa forma, o TSH simultaneamente estimula e inibe a expressão do NIS, o que pode representar um importante mecanismo de controle da função tireóidea.

Além do TSH, o iodeto é um outro importante regulador da expressão do NIS nas células tireóideas. WOLFF e CHAIKOFF, em 1948, descreveram o fenômeno no qual uma inibição na função tireóidea era observada a partir de determinada concentração de iodeto administrado a ratos. Esses autores descreveram que 2 dias após essa inibição, algum mecanismo de adaptação ocorria, o que permitia que os níveis de organificação e síntese hormonal fossem restaurados levando a normalização da função tireóidea. Esse fenômeno constitui um sistema de autoregulação especializado que protege a glândula do excesso de iodeto, regulando a entrada deste nas células tireóideas.

Apesar do mecanismo de adaptação ao fenômeno WOLFF-CHAIKOFF não ser totalmente compreendido, com a clonagem do gene do NIS, foi possível observar que 6 horas após a administração de altas doses de iodo, há diminuição na expressão do RNAm do NIS com posterior redução da proteína NIS em 24 horas (ENG et al 1999). Esses resultados demonstram que o mecanismo de adaptação ao efeito WOLFF-CHAIKOFF envolve a regulação da expressão do NIS pelo iodeto. Ainda não foi esclarecido se o mecanismo de inibição da expressão do NIS envolve a diminuição da interação do PAX-8 com o promotor do

NIS, bem como se o mediador desses efeitos é a molécula de iodo ou algum composto associado ao iodeto, como proposto por alguns autores (LA VIEJA et al 2000; FERREIRA et al 2005).

### **1.1.2 Controle pós-traducional do NIS**

Estudos recentes demonstram que o TSH, além de regular a transcrição do NIS, também modula sua atividade através de mecanismos pós-traducionais. Em cultura de linhagem de células de tireóide, a retirada do TSH do meio de cultura leva à diminuição na meia-vida do NIS de 5 para 3 dias, e um rápido declínio na captação de iodo. Entretanto, RIEDEL et al (2001) avaliaram a captação de iodeto em vesículas intracelulares, após a retirada do TSH, demonstrando que o NIS, apesar de não estar localizado na membrana basolateral do tireócito, se encontra em vesículas intracelulares. Estes autores ainda demonstraram por imunofluorescência, que a retirada do TSH do meio de cultura leva a internalização do NIS de maneira tempo dependente.

Associado a descrição de vários sítios de fosforilação e da observação de que em outros transportadores a fosforilação modula a translocação para membrana, foi postulada a hipótese de que a via TSH-TSHR-AMPC-PKA controla a fosforilação do NIS e, conseqüentemente, a sua localização na membrana basolateral (RIEDEL et al 2001) (**Figura 2**). Essa hipótese é reforçada pela observação de que em outros tipos celulares a retirada da membrana de alguns transportadores é regulada por vias específicas, em um processo que é fundamental para o funcionamento celular. Podemos citar, por exemplo, os

transportadores de glicose tipo 4 (GLUT4) que são regulados por insulina através da fosforilação da proteína AS160, ou ainda, os transportadores de serotonina regulados diretamente por fosforilação (MATSUZU et al 2005; LAW et al 2000). Todavia, VADYSIRISACK et al (2007) identificaram diversos sítios de fosforilação do NIS e apesar da caracterização desses sítios como sendo capazes de regular o transporte do iodeto e a estabilidade da proteína, nenhuma alteração na localização e inserção do NIS na membrana foi encontrada quando esses sítios foram mutados. Devido a importância do transporte de iodeto para a síntese hormonal e para o tratamento do câncer de tireóide, a descoberta de mecanismos que controlam a translocação do NIS entre vesículas intracelulares e membrana basolateral é de grande interesse. Neste contexto, é surpreendente a observação de que, em certos tipos de câncer de tireóide, a eficiência do transporte de iodo é pequena apesar da demonstração de expressão do NIS. Assim, a regulação da localização subcelular desse transportador parece ser a chave para o entendimento da função tireóidea em diversas situações fisiológicas e patológicas (FILETE et al 1999).

## **1.2 Metabolismo intermediário na célula tireóidea**

A relação ATP/ADP no tireócito, além de alterar o transporte de iodeto através do NIS, é capaz de regular diversos processos celulares como a produção de espécies reativas de oxigênio, síntese de proteínas e o transporte de vesículas intracelulares, afetando diretamente a produção dos HT. Dessa forma, a utilização de substratos para produção de energia e de outros processos celulares é de

fundamental importância para manutenção do equilíbrio dinâmico do tireócito (BERBEROF-VAN SANDE et al 1972).

Encontramos uma grande lacuna na literatura nos últimos 30 anos a respeito da regulação do metabolismo intermediário na tireóide. A maioria dos estudos nessa área são das décadas de 60 e 70 e se limitam a descrição da utilização dos diversos substratos para a produção de energia, constituição celular e produção hormonal. Alguns estudos, entretanto, avaliaram a captação de glicose em células tireóideas em cultura (BERBEROF-VAN SANDE et al 1972; HOSAKA et al 1992; MATSUZU et al 2005; FINKELSTEIN et al 2007)

O transporte de glicose para dentro da célula é uma atividade essencial para todos os tipos celulares e é mediado pelas diferentes classes de transportadores de glicose (GLUTs) (MATSUZU et al 2005). Diferentes isoformas dos GLUT têm sido encontradas na células tireóideas nos diversos modelos de estudo, entre linhagem de células tireóideas *in vitro*, glândula tireóide de animais, glândula tireóide humana e no câncer de tireóide. Apesar de haver grande variação na predominância de determinada isoforma de GLUT entre esses modelos, parece ser um consenso que o GLUT1, 3, 4 e 10 são expressos na tireóide, sendo o GLUT1 o predominante na linhagem celular FRTL5, bem como nos diversos tipos de câncer de tireóide (MATSUZU et al 2005).

Diversas evidências demonstram que o TSH é o principal regulador da captação de glicose tanto no tecido tireóideo isolado, quanto em linhagens de células tireóideas (HOSAKA et al 1992; FILETE et al 1987). O mecanismo pelo qual esse hormônio controla a captação de glicose envolve tanto a transcrição, quanto a translocação de GLUTs para a membrana. SAMIH et al (2000) demonstraram que tanto o TSH quanto a insulina induzem a translocação de

GLUT1 para a membrana da linhagem de células de tireóide FRTL-5. Além disso, esse autores descrevem o papel fundamental da sinalização mediada por PI3K nesse aumento da captação de glicose. Ainda nesse estudo, foi caracterizado que o mecanismo de translocação do GLUT1 e o aumento na captação de glicose na célula tireóidea é independente da sinalização de PKA (ZABALLOS et al 2008). O mecanismo pelo qual a PI3K induz a translocação do GLUT1 para membrana ainda não foi completamente caracterizado, entretanto não parece envolver a glicosilação do GLUT1 (SAMIH et al 2000). Em células musculares, foi caracterizado que a translocação do GLUT4 para membrana está relacionada com diversas vias de sinalização intracelular como PI3k and AMPK que convergem na fosforilação da proteína AS160 aumentando a quantidade de GLUT4 na membrana. Entretanto, ainda não foi caracterizado se as células tireóideas possuem AS160 ou outro sistema de controle do deslocamento dos GLUTs para a membrana (SAKAMOTO & HOLMAN, 2008).

Recentemente, diversos estudos foram publicados avaliando o diagnóstico de câncer da tireóide a partir de uma tomografia de emissão de pósitron (PET) que se utiliza da captação de um análogo da glicose marcado com um radionucleotídeo emissor-de-pósitron chamado de fluor-18-deoxiglicose ( $^{18}\text{F}$ -FDG) (FINKELSTEIN et al 2007). Essa técnica se baseia no fato de que tumores apresentam aumento no metabolismo da glicose, o que favorece a precisa detecção da localização, extensão e metabolismo de células cancerosas. Utilizando o análogo da glicose  $^{18}\text{F}$ -FDG, BLÄSER et al (2006), confirmaram que a captação de glicose no tireócito é regulada pela sinalização de PI3K e independe da PKA. Interessantemente, este e outros estudos demonstram a relação inversa entre o aumento na captação desse análogo da glicose e o grau



de diferenciação das células tireóideas cancerosas. Particularmente importante, foi a observação da relação inversa entre a captação de iodeto (medida por cintilografia com  $^{133}\text{I}$ ) e a captação do análogo da glicose em certos tipos de câncer de tireóide (BLÄSER et al 2006; GRUNWALD et al 1996; DIETLEN et al 1997). Esses estudos são, no entanto, limitados pela falta de conhecimento acerca dos mecanismos que regulam tanto a captação de iodo, particularmente o posicionamento do NIS na membrana basolateral do tireócito, quanto a captação de glicose, em particular, a expressão e translocação dos GLUTs para a membrana. Dessa forma, é de grande relevância a caracterização das vias capazes de modular a captação de glicose e a captação de iodeto na tireóide. Um dos candidatos para essa sinalização é a cinase ativada por AMP (AMPK).

### **1.3 Cinase ativada por AMP**

A cinase ativada por AMP (AMPK) é uma enzima heterotrimérica formada por uma subunidade catalítica ( $\alpha$ ) e duas subunidades regulatórias ( $\beta$  e  $\gamma$ ). Existem diferentes isoformas de cada subunidade em mamíferos ( $\alpha 1, \alpha 2, \beta 1, \beta 2$  e  $\gamma 1, \gamma 2, \gamma 3$ ), cada uma codificada por um gene diferente (STEINBERG & KEMP 2009). A descrição inicial da AMPK era de uma cinase associada à regulação enzima acetil-CoA-carboxilase e HMG-CoA-redutase (porque foi descoberta por 2 grupos independentes simultaneamente), passos limitantes para a síntese de ácidos graxos e de colesterol respectivamente. Posteriormente observou-se que esses processos eram também inibidos por nucleotídeos, particularmente o AMP. Yeh et al (1980) e Daniel Atkinson foram os primeiros a descrever o conceito de que enzimas metabólicas podem ser controladas por nucleotídeos e pela razão

[ATP]/[ADP][AMP]. O nome AMPK somente foi aceito quando Carling et al (1989) descobriram que a cinase associada à acetil-CoA-carboxilase e à HMG-CoA-redutase era a mesma enzima (STEINBERG & KEMP 2009).

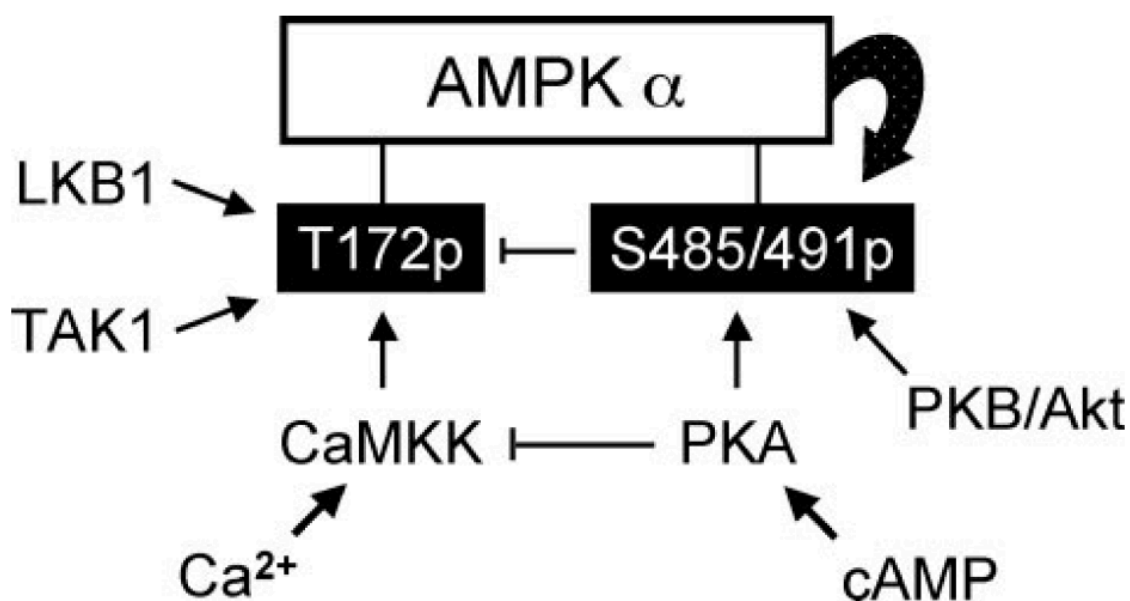
A visão clássica é que a AMPK é ativada sob condições de deficiência de energia e inibe vias anabólicas como síntese de ácidos graxos e de proteína, enquanto simultaneamente ativa vias catabólicas de produção de ATP. Apesar do papel como sensor energético ativado por AMP ter sido demonstrado em diversos sistemas fisiológicos, estudos recentes demonstram que a AMPK também é ativada pela cinase da cinase-dependente-de-calmodulina (CaMKK) independentemente da concentração de AMP intracelular (KAHN et al 2005).

O mecanismo mais conhecido de ativação da AMPK ocorre alostericamente pelo aumento da relação AMP/ATP. A ligação do AMP com a enzima, causa mudança conformacional expondo um sítio de fosforilação na treonina (Thr)-172. Essa fosforilação é fundamental para a ativação da AMPK e é catalisada pela cinase *upstream* LKB1 e pela cinase da cinase-dependente-de-calmodulina (CaMKK), enquanto a inibição ocorre por defosforilação da Thr-172 por proteínas fosfatase, particularmente pela proteína-fosfatase-1 (PP1) (STEINBERG & KEMP 2009). Uma outra via inibidora foi descrita por Hurley et al (2007) e envolve a sinalização mediada pelo aumento do AMPc e subsequente ativação da PKA. Esses autores demonstraram que a PKA além de diminuir a atividade da CaMKK $\beta$ , fosforilam a AMPK na serina-485/491 (da subunidade  $\alpha$ 1 e  $\alpha$ 2, respectivamente) o que inibe a ativação da AMPK, em células secretoras de insulina INS-1 (**Figura 3**).

Diversos estudos avaliam a função da AMPK através da administração de um fármaco conhecido como AICAR. Uma vez captado pelas células, o AICAR é

fosforilado formando um composto similar ao AMP, chamado de ZMP. Inversamente os diversos estudos tem utilizado o composto C como inibidor farmacológico da AMPK (STEINBERG & KEMP 2009).

Assim, um grande número de estressores fisiológicos, agentes farmacológicos e hormônios associados com o aumento da relação AMP/ATP, induzem aumento da atividade da AMPK nos diferentes tipos celulares (MINOKOSHI et al, 2004). Nos tecidos periféricos, a ativação dessa enzima promove a regulação por fosforilação de enzimas chave do metabolismo intermediário (DZANKO & STEINBERG, 2009).



**Figura 3** - Desenho esquemático mostrando a ativação da AMPK por fosforilação da treonina-172 pelas cinases LKB1, CaMKK $\beta$ , TAK1. O esquema também mostra a inibição da AMPK através da fosforilação da serina-485/491 pela PKA e PKB. Dessa forma, um aumento na concentração de AMPc induz ativação da PKA que tanto inibe a CaMKK $\beta$ , quanto fosforila o sítio inibitório da AMPK na serina-485/491 (adaptado de Hurley et al 2006).

No seu estado ativado, a AMPK fosforila os resíduos serina 79, 1200 e 1215 da enzima acetil-CoA carboxilase (ACC). Esta enzima promove a conversão de acetil-CoA em malonil-CoA, uma importante etapa da síntese *de novo* de ácidos

graxos (AG) no músculo e no tecido adiposo. A AMPK, através da fosforilação dos resíduos serina da ACC, leva a redução em 80-90% do  $V_{máx}$  desta enzima, sugerindo que a AMPK seja a cinase “reguladora fisiológica” da ACC. A ACC, por sua vez é uma enzima multifuncional que catalisa a conversão de acetil-CoA em malonil-CoA no seu estado ativado (desfosforilada), iniciando a síntese *de novo* de lipídeos na célula (THOMSON & WINDER, 2009).

O malonil-CoA é um potente inibidor da carnitina palmitoil transferase-1 (CPT-1), que é responsável por uma etapa limitante da entrada de ácidos graxos (AGs) na mitocôndria para que sejam oxidados. Quando a ACC está inativada (fosforilada), ocorre queda na concentração de malonil-CoA e diminuição da inibição da CPT-1, permitindo o transporte de ácidos graxos livres AGCL para a mitocôndria e sua subsequente oxidação. Portanto, o sistema AMPK-ACC tem um papel importante na regulação da homeostase de lipídeos na célula (THOMSON & WINDER, 2009; MINOKOSHI et al, 2004).

### **1.3.1 Controle da captação de glicose pela AMPK**

Além do metabolismo de lipídeos, diversos estudos demonstram que a AMPK possui papel importante na regulação de etapas fundamentais do metabolismo de glicose como sua captação e oxidação (TREEBACK & WOJTASZEWSKI, 2009). De fato, a demonstração de que o AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamida-1- $\beta$ -D-ribofuranosida), um ativador farmacológico da AMPK, aumenta a captação de glicose, independentemente da insulina, em células musculares, gerou grande interesse do ponto de vista do tratamento da resistência à insulina e do diabetes do tipo 2 (MERRIL et al 1997). Dessa forma,

já foi demonstrado que a AMPK aumenta a captação de glicose no músculo, tecido adiposo branco, coração e fígado (KAHN et al 2005; DAVAL et al 2006; HEATHER et al 2010) .

O mecanismo pelo qual a AMPK aumenta a captação de glicose no músculo é através da fosforilação da proteína AS160. No estado não fosforilado, a AS160 está associada à vesícula de GLUT4 impedindo seu deslocamento para a membrana celular. Quando fosforilada pela AMPK ou pela Akt (AS160 é um ponto de convergência entre a sinalização da insulina e a AMPK) ela se desprende da vesícula permitindo a inserção do GLUT4 na membrana e o aumento na captação de glicose (TREEAK et al 2006).

#### **1.4 Relação entre AMPK e a glândula tireóide**

Já foi demonstrado que nos estados patológicos de hiper- e hipotireoidismo há aumento e diminuição na expressão das subunidades da AMPK no músculo, respectivamente (PARK et al 2002). Nesse mesmo tecido, IRCHERR et al (2008) observaram ativação da AMPK no solear e gastrocnêmio 2h após uma única dose de T3, ainda que o significado fisiológico para essa rápida alteração tenha que ser melhor caracterizado. Interessantemente, o mecanismo para essa ativação parece estar relacionado com a CAMKK em uma ação dos HT. Dessa forma, foi demonstrado que T3 se liga ao seu receptor na linhagem de célula muscular C2C12 e ativa a CAMKK que por sua vez ativa a AMPK. Apesar disso, BRANVOLD et al (2008) demonstraram que a cinase ativadora da AMPK, LKB1,

também está ativada após o tratamento com T4 no músculo solear de rato. Isso sugere que existe mais de um mecanismo de ativação da AMPK pelos HT.

A ativação da AMPK não está restrita somente ao tecido muscular esquelético. Recentemente, foi demonstrado que o mecanismo pelo qual os HT aumentam a ingestão alimentar, é via ativação da AMPK no hipotálamo. Utilizando injeções intracerebroventricular do inibidor farmacológico da AMPK, o composto C, ISHIL et al (2008), observaram que a administração de T4 não mais induzia aumento da ingestão. No tecido muscular cardíaco de ratos hipertireóides, também foi demonstrada uma ativação significativa da AMPK, que parece mediar as várias alterações metabólicas dos HT neste tecido (HEATHER et al 2010). Nenhum trabalho entretanto se propôs a avaliar a expressão e o papel da AMPK na glândula tireóide.

Tendo em vista que a AMPK regula a distribuição subcelular dos transportadores de glicose em diversos tecidos e considerando que há correlação negativa entre a captação de glicose e de iodeto no câncer de tireóide, é possível que esta cinase esteja envolvida também na regulação da função do co-transportador sódio-iodeto na tireóide. Uma vez que a captação de iodeto pela tireóide é uma etapa fundamental para a biossíntese hormonal, além de ser de grande relevância clínica, tanto no diagnóstico como no tratamento de diversas doenças da tireóide, é de grande importância compreender melhor o efeito da ativação e da inibição da AMPK sobre a expressão, distribuição subcelular e função do NIS.

## **2- OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Investigar o papel da AMPK na regulação da função tireóidea.

### **2.2 Objetivos específicos**

- ◆ Determinar a expressão da enzima AMPK na glândula tireóide e na linhagem de células PCCL3;
- ◆ Avaliar o efeito da ativação e inibição farmacológica da AMPK sobre a captação de iodeto na glândula tireóidea e na linhagem de células PCCL3;
- ◆ Analisar o efeito da ativação e inibição farmacológica da AMPK sobre a expressão do co-transportador Na/I;
- ◆ Avaliar o efeito da ativação e inibição farmacológica da AMPK sobre a captação de glicose na linhagem de células PCCL3;
- ◆ Investigar o efeito da ativação e inibição farmacológica da AMPK sobre a expressão dos transportadores de glicose GLUT1 e 4 em linhagem de células PCCL3;
- ◆ Estudar a relação entre o TSH e a expressão e ativação da AMPK na linhagem de células PCCL3;
- ◆ Avaliar o efeito crônico da administração de AICAR sobre a função tireóidea em ratos Wistar.

### **3- MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 - Materiais**

AICAR foi adquirido por Toronto Research Chemicals, Inc. (Toronto, Ontario, Canada); “compound C” (6-[4-(2-piperidin-1-yl-etoxy)-phenyl]-3-pyridin-4-yl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidine) foi adquirido por Merck (Gibbstown, NJ, USA). ECL foi adquirido da Millipore (*Billerica, MA, USA*). [<sup>125</sup>I]Nal foi fornecido por PerkinElmer Life and Analytical Sciences (*Woodbridge, Ontario, Canada*).

Anticorpos específicos contra a forma total e fosforilada da AMPK (63 Kda), total da ACC (260 Kda), LKB1 (60 Kda), total e fosforilada da AS160 (160 Kda) e o anticorpo secundário conjugado com peroxidase foram adquiridos pela Cell Signaling Technology Inc. (*Beverly, MA, USA*). O anticorpo contra a forma fosforilada da ACC (260 Kda) foi adquirido por Upstate (Charlottesville, VA, USA). Já os anticorpos contra GLUT1 (55 Kda) e GAPDH (34 Kda) foram adquiridos por AbCAM (*Cambridge, MA, USA*). O anticorpo contra GLUT4 (45 Kda) foi adquirido por SantaCruz Biotechnology (*Santa Cruz, CA, USA*). O anticorpo contra o NIS (80 Kda) foi gentilmente cedido pela Dra Nancy Carrasco.

Foram utilizados, perclorato de potássio, TSH bovino, insulina bovina, apo.transferrina humana, hidrocortisona, somatostatina, fator de crescimento Gly-His-Lys e penicilina-estreptomicina, todos fornecidos pela Sigma (*Aldrich Corporation, St Louis, USA*).

O meio de cultura *Coon's Modified Ham's F12* (F12), *Dubeco's Modified Essencial Medium* (DMEM) e o soro fetal bovino (SFB), foram obtidos da Wisent (*Quebec city, Quebec, Canada*). As células PCCL-3 foram generosamente doadas pelo Dr. Roberto Di Lauro (*Università Federico II, Napoli, Itália*) e as células musculares L6 foram adquiridas através do banco de células (*ATCC, Manassas, MA, USA*).



## **3.2 Estudo 1: Efeito da ativação e inibição farmacológica da AMPK sobre a captação de glicose nas células PCCL3 e de iodeto na glândula tireóide e nas células PCCL3**

### **3.2.1 - Cultivo celular**

Foi utilizada a linhagem celular PCCL3, estabelecida a partir de células epiteliais da tireóide derivadas de ratos Fisher adultos de 18 meses, que mantém *in vitro* a maioria das características das células tireóideas diferenciadas. Dentre elas podemos citar a expressão e secreção de tireoglobulina, atividade da tireoperoxidase e desidase do tipo 1 e captação de iodeto. Apesar disso, essa linhagem é incapaz de produzir hormônios tireóides. A proliferação destas células é principalmente regulada por TSH e insulina (FUSCO *et al*, 1987). As células cresceram em monocamada, com meio de cultura F12 chamado de 6H, suplementado com 5% de SFB, e contendo: transferrina (5 µg/mL), insulina (10 µg/mL), hidrocortisona (10nM), somatostatina (6nM), gli-his-lis (2.5µM) e TSH (1 mU/mL). As células musculares L6 foram cultivadas em meio de cultura DMEM com 10% de SBF. As células cresceram em ambiente controlado contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

### **3.2.2 - Tratamento das células PCCL3 com AICAR, Composto C, H89 e Forskolina**

As células PCCL3 foram tratadas com AICAR e composto C para avaliar os efeitos da ativação e inibição farmacológica da AMPK, respectivamente. Para tanto,

as células eram plaqueadas,  $10^5$  por poço em placa de 24 poços ou  $2,5 \times 10^6$  por poço em placa de 6 poços, e tratadas com AICAR (nas doses indicadas), composto C ( $20 \mu\text{M}$ ) ou ambos por diferentes tempos como indicado. Tanto AICAR, quanto composto C eram dissolvidos em meio de cultura na presença ou ausência de TSH, como indicado. Quando as células eram incubadas na presença de composto C, a mesma quantidade de dimetilsulfóxido (DMSO) era colocado em todos os outros grupos. Para os poços que possuíam ambas as drogas, o composto C era colocado 1 h antes do AICAR. Após o período de incubação, as células plaqueadas em placa de 24 poços foram submetidas ao protocolo de captação de iodeto ou glicose, enquanto que as células plaqueadas em placa de 6 poços foram submetidas ao protocolo de *Western blot*.

Para análise da expressão da AMPK na presença ou ausência de H89 ( $10 \mu\text{M}$ ) e forskolina ( $10 \mu\text{M}$ ), as células foram plaqueadas em um placa de 6 poços (como descrito), tratadas com as respectivas drogas por 4h e submetidas ao protocolo de *Western blot*.

### **3.2.3 - Ensaio de captação de iodeto pelas células PCCL3**

A captação de iodo pelas células PCCL3 foi realizado conforme descrito previamente por VENKATARAMAN & COL (1999). Resumidamente, as células foram plaqueadas em uma placa de 24 poços a uma densidade de  $10^5$  células por poço. Após o respectivo tratamento, as células foram lavadas com 1 mL da solução HBSS (*Hank's balanced salt solution*) e incubadas por 45 minutos na mesma solução suplementada com  $0,2 \mu\text{Ci Na}^{[125\text{I}]}$  e  $0,1 \text{ mmol/L NaI}$ . Após esse período as células foram novamente lavadas com HBSS e lisadas com  $0,5 \text{ mL de NaOH } (0.1 \text{ mol/L})$ . Esse lisado foi então coletado e levado para contagem da radioatividade em

contador (1470 Wallac Wizard™ automatic gamma counter, Turku, Filand). Uma alíquota de cada poço foi coletada para a dosagem de proteína pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para obtenção da captação específica de iodeto, as contagens de radiação gamma foram subtraídas das contagens das células que foram tratadas nas mesmas condições porém incubadas com o inibidor competitivo da captação de iodeto,  $\text{KClO}_4$  (10  $\mu\text{M}$ ), e corrigidas pela quantidade de proteína correspondente. Os resultados foram expressos em % do grupo controle.

### **3.2.4 - Ensaio de captação de glicose pelas células PCCL3**

A captação de iodo pelas células PCCL3 foi realizado conforme descrito previamente por GAIDHU et al 2006. Resumidamente, as células foram plaqueadas em uma placa de 24 poços a uma densidade de  $10^5$  células por poço. Após o respectivo tratamento, as células foram lavadas com 1 mL da solução HBSS (*Hank's balanced salt solution*) e incubadas por 3 minutos na mesma solução suplementada com 0,5 mM 2-deoxi-D-glicose and 0,5  $\mu\text{Ci}$  of 2-[1,2- $^3\text{H}$ ]deoxi-D-glicose. Após esse período as células foram novamente lavadas com HBSS e lisadas com 0,5 mL de NaOH (0.1 mol/L). Esse lisado foi então coletado e levado para contagem da radioatividade em um cintilador (*Beckman, New York - USA*). Uma alíquota de cada poço foi coletada para a dosagem de proteína pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para o cálculo da captação específica de glicose, as contagens por minuto foram subtraídas das contagens das células que foram tratadas nas mesmas condições, porém incubadas com o inibidor específico da captação de glicose, citocalasina B (10  $\mu\text{M}$ ), e corrigidas pela quantidade de proteína correspondente. Os resultados foram expressos como  $\mu\text{mols}$  de glicose / mg de proteína / minuto.

### **3.2.5 - Análise da expressão das proteínas AMPK, ACC, AS160, GLUT1/4, LKB1 e NIS por Western Blot**

As células PCCL3, L6, músculo solear e a glândula tireóide de rato foram tratadas como indicado e homogeneizadas em tampão contendo NaCl 135 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, KCl 2,7 mM, Tris 20 mM (pH 8,0), Triton 1%, glicerol 10% e inibidores de proteases e de fosfatase (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0.5 mM, NaF 10 mM, leupeptina 1 µM, pepstatina 1µM, e PMSF 0,2 mM). Resumidamente, as células foram raspadas da placa de cultura e passadas por uma seringa de 1 mL por 5 vezes. Tanto o músculo solear quanto a glândula tireóide foram processados utilizando homogenizador (KEA, USA). Tanto os tecidos, quanto as linhagens de células foram então centrifugados por 10.000 g durante 10 minutos à 4°C. Uma alíquota dos lisados foi utilizada para a determinação da concentração de proteínas em cada amostra, pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Antes de aplicadas no gel SDS-PAGE, as amostras foram diluídas 1:1 (v/v) com tampão de amostra Laemmli (Tris-HCl 62.5mM, pH 6,8, SDS 2% p/v, DTT 50mM e azul de bromofenol, 0,01% p/v). Alíquotas contendo 30 µg de proteína dos lisados foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE, e então transferidas para membranas PVDF (Bio-Rad Laboratories, Burlington, ON). As membranas foram então bloqueadas em solução 3% BSA e incubadas com os anticorpos específicos, utilizando diluições entre 1:500-1:1000, até o dia seguinte. A revelação se deu através da utilização de ECL (Millipore, MA) e visualizada em filme fotográfico (Kodak®). A quantidade de proteína entre as amostras foi confirmada através da expressão da proteína GAPDH realizada na mesma membrana.

### **3.2.6 - Animais**

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar*, machos com 3 meses de idade (200 – 250 g), mantidos em gaiolas individuais sob condições controladas de temperatura (23 °C) e ciclo claro/escuro (12h / 12h, com ciclo claro iniciando às 19h). Todos os animais tiveram água e ração oferecidos *ad libitum*.

Após o período de 1 semana para aclimação, os animais foram, aleatoriamente, separados para receber AICAR ou veículo, formando os seguintes grupos: Controle (Con) e AICAR (A). Utilizamos um total de 18 animais para cada grupo. Todos os experimentos foram realizados após aprovação do protocolo pela Comissão de Ética em Pesquisa com o Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob número de protocolo IBCCF078.

### **3.2.7 Administração de AICAR**

A administração de AICAR foi por via intraperitoneal (i.p.), em uma única dose de 0,7 g/Kg de massa corporal (m.c.). Os animais que não foram tratados com AICAR receberam volume igual do veículo (cloreto de sódio 0.9%), nas mesmas condições da administração da AICAR. A captação de iodeto foi realizada 24 h após a administração de AICAR. Utilizamos 6 animais em cada grupo.

Com o objetivo de analisar se a injeção de AICAR seria capaz de ativar a AMPK na glândula tireóidea, um segundo grupo de animais, nas mesmas condições anteriores, recebeu uma única dose de AICAR (0,7 g/Kg m.c.) tendo sido sacrificados 30 minutos após a injeção. A glândula tireóide foi rapidamente removida

e congelada em nitrogênio líquido para posterior análise da fosforilação da AMPK e da ACC por Western blot. Utilizamos 2 animais em cada grupo.

### **3.2.8 Captação de radioiodo pela glândula tireóide**

Para avaliar a função do co-transportador  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  (NIS) foi utilizada a técnica desenvolvidas por Ferreira *et al* (2005) em nosso laboratório.

Resumidamente, 15 minutos antes da eutanásia cada animal recebeu solução intraperitoneal de radioiodo  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (0,1  $\mu\text{Ci}$  i.p., *Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra*). As tireóides foram removidas e pesadas. A radioatividade das glândulas foi medida, usando contador gama de fase sólida (*1470 Wallac Wizard<sup>TM</sup> automatic gamma counter, Turku, Finland*) e expressa em percentual da dose de  $^{125}\text{I}$  administrada por mg de tireóide.

## **3.3 - Estudo 2: Efeito da administração de AICAR por 4 dias sobre a função tireóidea em ratos Wistar**

### **3.3.1 - Administração de AICAR**

A administração de AICAR foi por via intraperitoneal (i.p.), 1 vez ao dia durante 4 dias seguidos na dose de 0.7g/Kg de massa corporal (m.c.). Os animais que não foram tratados com AICAR receberam volume igual do veículo (cloreto de sódio 0.9%), nas mesmas condições da administração da AICAR. Utilizamos 10 animais em cada grupo.

### **3.3.2 - Sacrifício dos animais**

Após o sacrifício, foram coletados sangue para as análises. Para a obtenção do soro foi realizada a centrifugação (1000 x g, 15 minutos, 4 °C) do sangue em tubos individualizados com a retirada do sobrenadante (soro). As amostras de soro foram aliquotadas em 3 tubos e armazenadas a – 70 °C até o momento das análises das concentrações séricas de TSH, T3, T4, através de radioimunoensaios específicos.

### **3.3.3 - Dosagem do TSH Sérico**

A determinação dos níveis séricos de TSH foi realizada através de radioimunoensaio específico, utilizando um kit fornecido pelo “National Hormone and Peptide Program/NIDDK” (*Dr. Parlow, Bethesda, MD, USA*), e expressos em termos da preparação de referência 3 (RP-3). Esse kit é composto por TSH murino purificado para a preparação das amostras utilizadas na curva padrão (0,625 a 25 ng/ml), TSH murino para ser iodado e anticorpo de coelho anti-TSH murino (1º anticorpo).

A iodação da molécula de TSH com  $^{125}\text{I}$  foi realizada em nosso laboratório, pelo método da cloramina T, sendo a molécula marcada purificada em uma coluna de Biogel (Biogel-P60 fino da Bio-rad, EUA), conforme previamente descrito (ORTIGA, 1992). O RIE foi realizado pelo método do 2º anticorpo (anti-rabbit IgG, SIGMA), com adição de 6% de polietilenoglicol (PEG) (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil).

Os coeficientes de variação intra- e inter-ensaio foram 7,7 e 6,5%, respectivamente e a sensibilidade do ensaio foi de 0,625 ng/ml usando volume de 100 µl por amostra. O TSH sérico foi expresso em ng/ml.

#### **3.3.4 - Dosagem de T3 e T4 totais séricos**

As concentrações séricas de T3 e T4 foram determinadas através de Kit comercial para RIE de T3 (DLS – 3100 Active®, TX, EUA) e T4 (DLS – 3200, Active®, TX EUA) totais, contendo anticorpos específicos aderidos à parede dos tubos de polipropileno e utilizando T3 e T4 marcados com <sup>125</sup>I como traçador. As curvas padrão foram preparadas com T3 e T4 em soro de rato livre de iodotironinas (soro zero) nas concentrações de 25 a 1000 ng/dL e 1 a 50 µg/dL, respectivamente. Para o kit de T3 os coeficientes de variação intra- e inter-ensaio foram 4,2 à 6,0% e 7,1 à 7,4%, respectivamente, e a sensibilidade do ensaio foi de 4,3 ng/dl, usando volume de 50µl por amostra. Para o kit de T4 os coeficientes de variação intra- e inter-ensaio foram 7,1 à 7,4% e 2,9 à 5,1%, respectivamente, e a sensibilidade do ensaio foi de 0,4 µg/dl usando volume de 25 µl por amostra. Todo o procedimento foi realizado seguindo-se as recomendações do fornecedor. Os resultados foram expressos em ng/dl para o T3 e em µg/dl para o T4.

#### **3.4 - Análise Estatística**

A análise estatística empregada na comparação dos resultados apresentados foi realizada com a utilização do programa de análises estatísticas Graphpad Prism



(versão 5, *Graphpad Software, Inc., San Diego, USA*). Para a quantificação da expressão dos transportadores de glicose GLUT1 e GLUT4 por “immunoblotting”, a densitometria das bandas foi calculada utilizando-se o software Image J 1.39 (NIH, EUA), e a densitometria foi normalizada pelos valores do grupo controle. Empregou-se o teste de variância univariada paramétrica, seguida de teste de comparação múltipla, *Bonferroni's Multiple Comparison Test*.

Os resultados dos estudos 1 foram analisados pelo teste de variância univariada paramétrica, seguida do teste de comparação múltipla, *Bonferroni's Multiple Comparison Test*. Já os resultados de massa corporal, TSH, T3 e T4 séricos do estudo 2 foi analisado por Student t não pareado (massa corporal, gorduras retro e epididimal, T3, T4). Os resultados de TSH e captação de iodeto, que não seguem uma distribuição normal, foram analisados por variância univariada não paramétrica, *Kruskal-Wallis*, seguido de teste de comparação múltipla de *Dunn*.

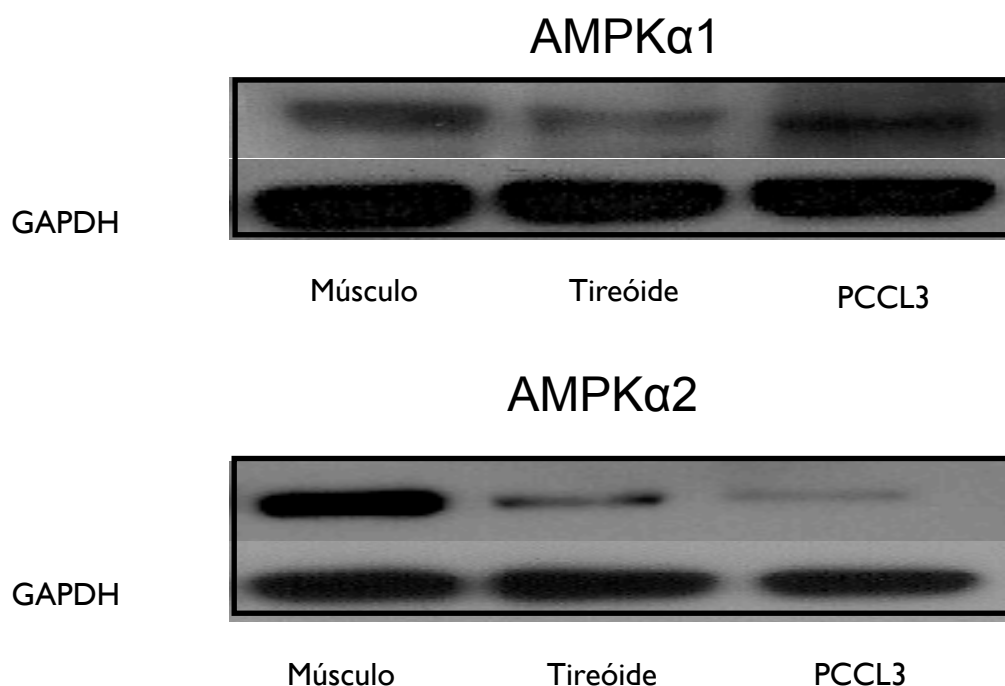
As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## **4- RESULTADOS**

### **4.1 - Estudo 1: Efeito da ativação e inibição farmacológica da AMPK sobre a captação de glicose nas células PCCL3 e de iodeto na glândula tireóide e nas células PCCL3**

#### **4.1.1 Expressão das subunidades $\alpha 1$ e $\alpha 2$ da AMPK na glândula tireóide e nas células PCCL3**

Com o objetivo de demonstrar, pela primeira vez, o papel da enzima AMPK no controle da função tireóidea, necessitamos confirmar a expressão dessa enzima no tecido tireóideo, bem como na linhagem de células tireóideas PCCL3. Na figura 4, pode-se observar a expressão das 2 subunidades  $\alpha$  da AMPK com 63 kDa, tanto na glândula de ratos, quanto na PCCL3. Como controle positivo, utilizamos o músculo solear de rato, que conhecidamente expressa essa proteína (KEMP & COL, 2009).



**Figura 4** - Expressão da subunidade  $\alpha$  da AMPK no músculo solear, na glândula tireóidea e na linhagem de células foliculares de tireóide PCCL3. Os tecidos foram retirados de um rato Wistar macho que não recebeu qualquer tipo de tratamento e era alimentado com ração e água *ad libitum*. A linhagem de células PCCL3 foi cultivada em meio de cultura F12 6H. A proteína GAPDH foi utilizada como controle de carregamento.

#### **4.1.2 Efeito do AICAR sobre a fosforilação da AMPK e ACC e captação de iodeto *in vitro***

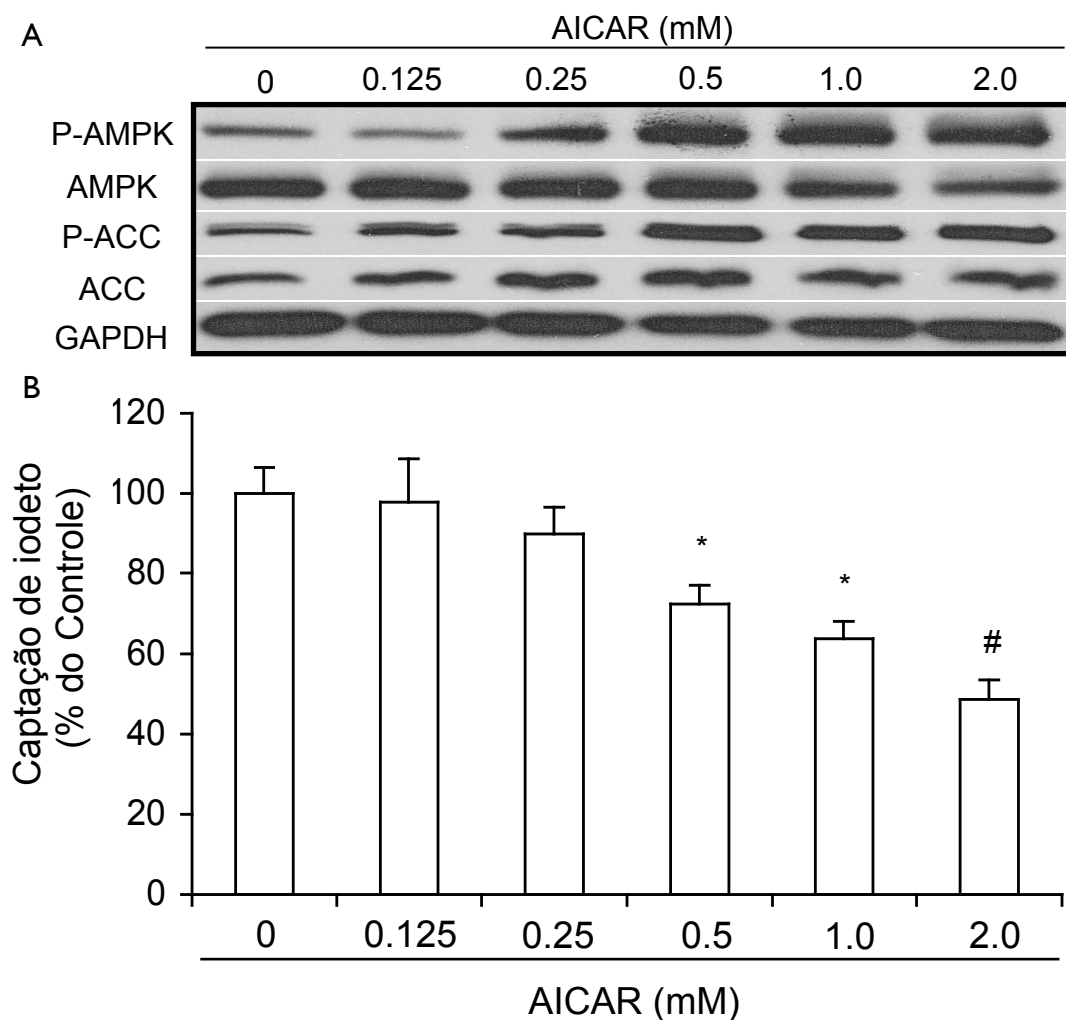
Realizamos inicialmente uma curva dose-resposta para avaliar a concentração ótima de AICAR a ser utilizada. A exposição das células PCCL3 ao AICAR levou à diminuição significativa da captação de iodeto de maneira dose dependente. Dessa forma, foram observados significativas reduções na captação nas doses de 0.5, 1 e 2 mM (**Figura 5B**). Em paralelo, analisamos a fosforilação da AMPK e da ACC por Western blot nas mesmas condições anteriores. O tratamento das células PCCL3 com AICAR também causou aumento na fosforilação da AMPK $\alpha$  e do seu alvo preferencial ACC de maneira dose dependente (**Figura 5A**). A

quantidade total de AMPK $\alpha$  não sofreu alteração nas menores doses de AICAR (0.25 e 0.5mM), enquanto houve uma pequena diminuição na expressão nas maiores doses (1 e 2 mM). Nenhuma modificação foi observada na quantidade total de ACC. A partir desse resultado, passamos a utilizar a dose de 1mM de AICAR em todos os experimentos.

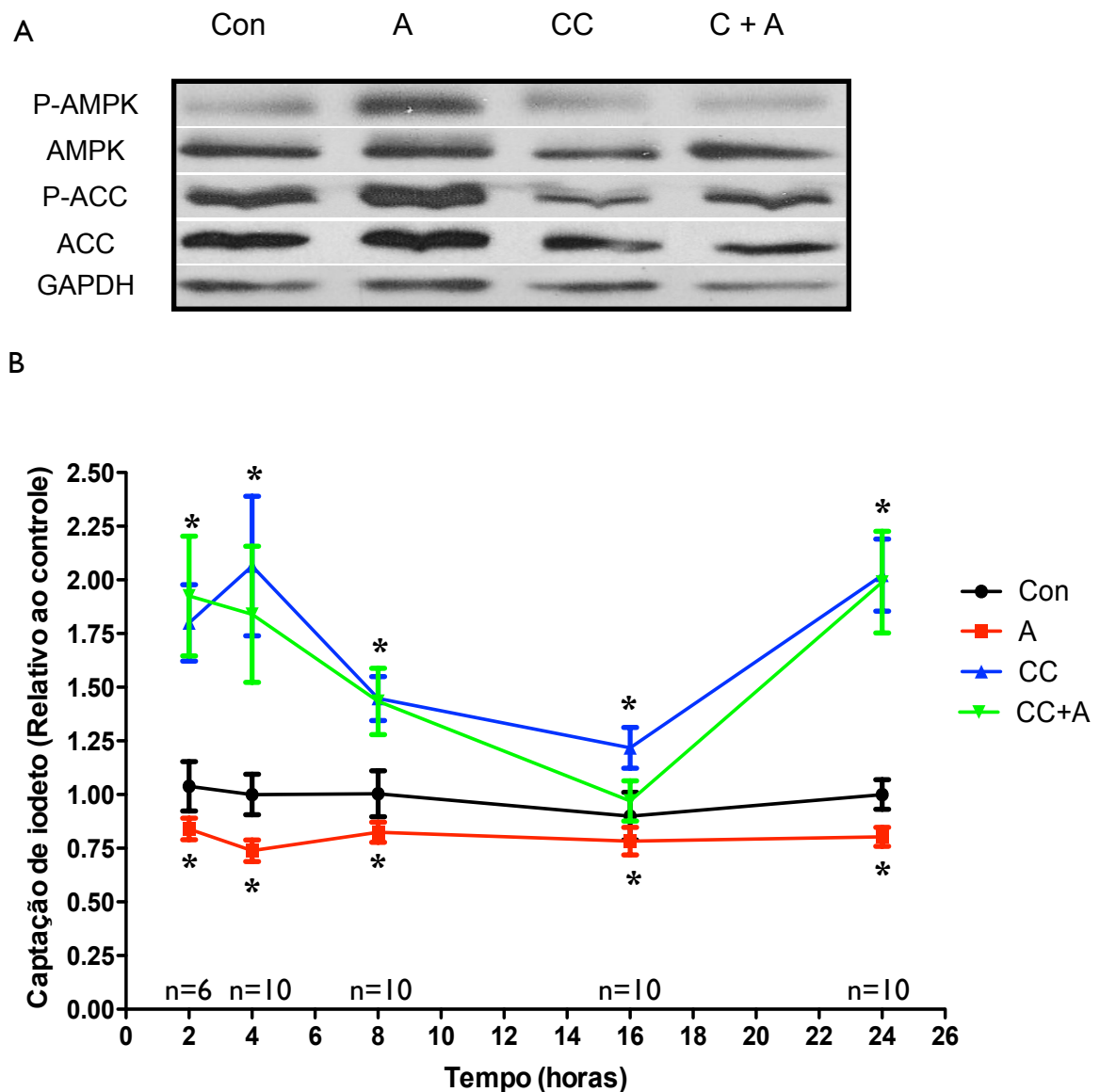
Com o objetivo de investigar se os efeitos do AICAR são realmente desempenhados pela AMPK, nós avaliamos a expressão da AMPK $\alpha$  e ACC fosforiladas e a captação de iodeto, na presença do inibidor farmacológico da AMPK, o composto C. Dessa forma, as células PCCL3, cultivadas com meio de cultura 6H, foram tratadas com composto C, AICAR ou ambos por 24h. O composto C era colocado em contato com as células 1h antes do AICAR. Como esperado, o AICAR induziu a fosforilação da AMPK $\alpha$  e da ACC, enquanto que o composto C inibiu completamente essa atividade (**Figura 6A**).

Avaliou-se então a captação de iodeto em diferentes tempos de incubação com AICAR, composto C ou ambos. Nenhum efeito significativo foi observado após 1h de incubação porém, a partir de 2h, e por diversos momentos até 24h (4, 8 e 16h) observamos uma redução significativa na captação induzida por AICAR. A presença do composto C, não só reverteu completamente a diminuição da captação induzida por AICAR, como aumentou a captação quando colocado sozinho em relação ao grupo controle (**Figura 6B**). Esses resultados indicam que a atividade basal da AMPK exerce um importante efeito na regulação da captação de iodeto nas células tireóideas, mesmo na presença de TSH. Além disso, devido a grande estabilidade do NIS na presença de TSH, esses dados sugerem que pode existir mais de um mecanismo de redução da captação pela ativação da AMPK, pois observamos efeitos rápidos, que não envolvem regulação da transcrição, e tardios onde a

supressão da expressão ou a indução da degradação do NIS podem estar envolvidos.



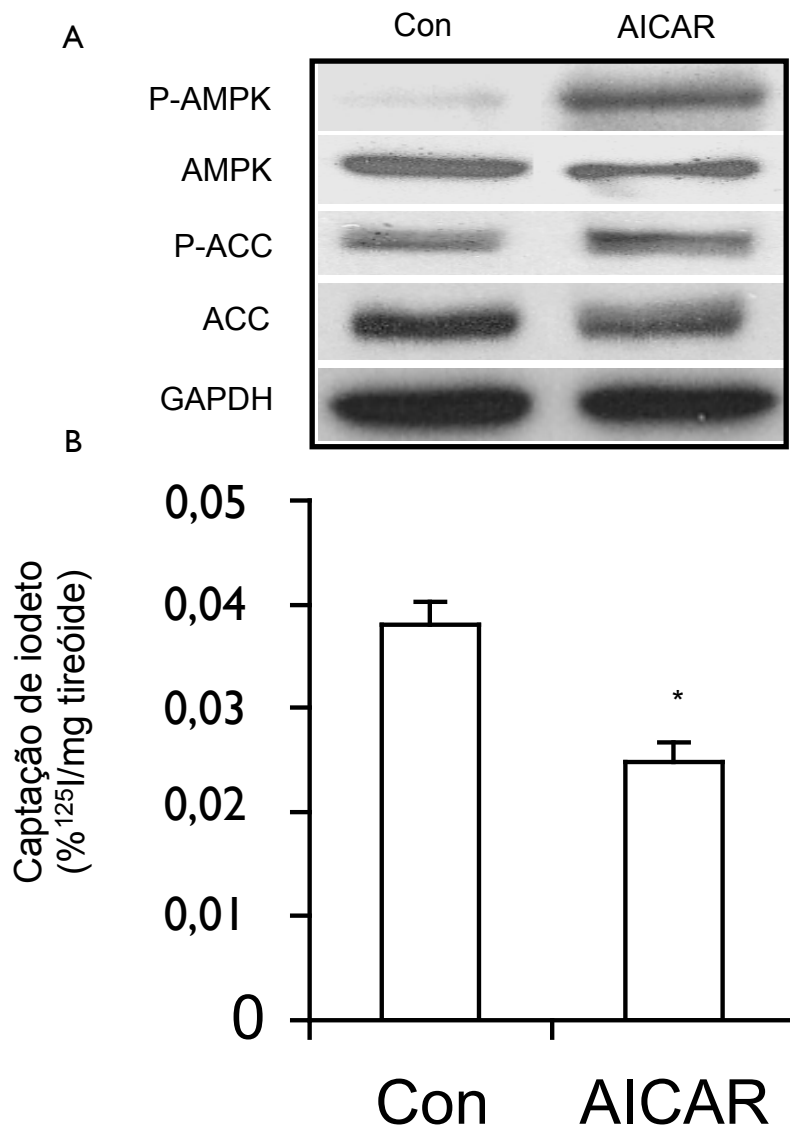
**Figura 5** - Efeito dose resposta de AICAR (A) sobre a expressão das enzimas AMPK e ACC nas formas total e fosforilada e (B) sobre a captação de iodeto nas células PCCL3. Estas foram cultivadas em meio de cultura F12 6H, e tratadas com diferentes doses de AICAR (como indicado) por 24h. A proteína GAPDH foi utilizada como controle de carregamento em todas as membranas. Os blots são representativos de pelo menos 3 experimentos independentes, sendo cada proteína avaliada em uma membrana independente com a mesma amostra. As mesmas condições foram utilizadas para a captação de iodeto. Os resultados da captação de iodeto foram representados com % do grupo controle com pelo menos 3 experimentos independentes, com média  $\pm$  erro padrão e  $n=12$ . O asterisco indica resultado estatisticamente significativo. Nível de significância \*  $p<0,05$  em relação ao controle e #  $p<0.05$  em relação a 1mM.



**Figura 6** - Efeito do inibidor da AMPK, composto C (CC) na presença (CC+A) ou na ausência do AICAR (A) sobre (A) a expressão das enzimas AMPK e ACC nas formas total e fosforilada após 24h de tratamento e (B) sobre a captação de iodeto nas células PCCL3 em diferentes tempos. Estas foram cultivadas em meio de cultura HAM'S F12 6H, e tratadas com composto C (20 $\mu$ M), AICAR (1mM) ou ambos por 24h. A proteína GAPDH foi utilizada como controle de carregamento em todas as membranas. Os blots são representativos de pelo menos 2 experimentos independentes, sendo cada proteína avaliada em uma membrana independente com a mesma amostra. As mesmas condições foram utilizadas para a captação de iodeto somente alterando o tempo de tratamento como indicado. Os resultados da captação de iodeto foram expressos como relativo ao controle com pelo menos 2 experimentos independentes, com média  $\pm$  erro padrão; n=número de poços com células por grupo. O asterisco indica resultado estatisticamente significativo em relação ao grupo controle. Nível de significância de pelo menos  $p < 0,05$ .

#### **4.1.3 Efeito do AICAR sobre a fosforilação da AMPK e ACC e captação de iodeto *in vivo***

Para avaliarmos a relevância da inibição da captação induzida por AICAR observada nas células PCCL3 *in vivo*, injetamos uma única dose de AICAR (0.7g/Kg m.c.) em ratos Wistar machos pesando entre 200-250g e medimos a captação de radiodo de 15 minutos, 24 h depois. Como esperado pelos dados *in vitro*, uma única dose de AICAR foi suficiente para reduzir significativamente a captação de iodeto em ratos Wistar (**Figura 7B**). Isso demonstra que a AMPK regula a captação de iodeto também na glândula tireóide *in vivo*, reforçando a importância dessa enzima no controle dessa etapa da síntese dos HT.



**Figura 7** - Efeito da administração de uma única dose de AICAR sobre a (a) expressão das enzimas AMPK e ACC nas formas total e fosforilada (b) e sobre a captação de iodo. Foram utilizados ratos Wistar machos (250g) que receberam uma única dose i.p. de AICAR 0.7g/Kg m.c. Após 24h do tratamento com AICAR, os animais foram injetados com radioiodo ou veículo e as glândulas tireóides foram removidas 15 minutos depois para contagem de radioatividade ou congeladas em nitrogênio líquido. A proteína GAPDH foi utilizada como controle de carregamento em todas as membranas. Os blots são representativos de pelo menos 2 experimentos independentes, sendo cada proteína avaliada em uma membrana independente com a mesma amostra. Para os blots utilizamos n=3. Os resultados da captação de iodo foram expressos por %<sup>125</sup>I/mg tireóide de tireóide com média ± erro padrão e n = 8. O asterisco indica resultado estatisticamente significativo. Nível de significância p<0,05.



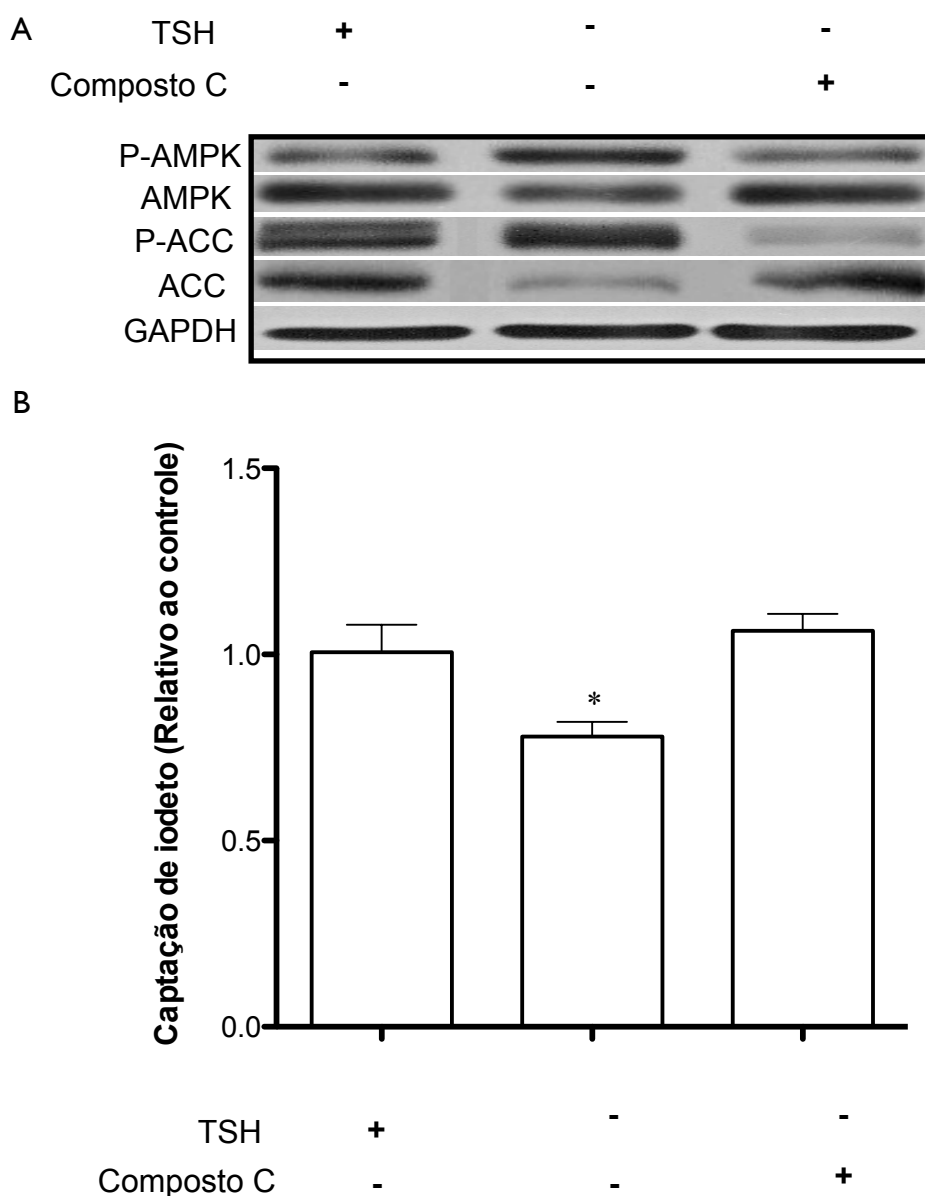
#### **4.1.4 Efeito do TSH sobre a ativação da AMPK**

Com o objetivo de compreender melhor os mecanismos pelos quais ocorre a ativação da AMPK nas células tireóideas, avaliamos o efeito do TSH sobre o controle da expressão e ativação da AMPK $\alpha$ , bem como a relação entre TSH e AMPK sobre a captação de iodeto. É bem descrito na literatura que a ausência de TSH no meio de cultura, leva a rápida redução da captação de iodeto (RIEDEL, 2001; Kogai et al 2000). Para avaliar se o mecanismo de redução da captação na ausência de TSH seria mediado pela ativação da AMPK, incubamos as células PCCL3 em meio de cultivo sem TSH (5H) por 48h na presença ou na ausência de composto C, que foi adicionado nas últimas 4h do período de 48h de privação do TSH. Observamos por Western blot que a retirada do TSH induziu aumento na fosforilação da AMPK $\alpha$  e ACC, sugerindo que o TSH regula negativamente a ativação da AMPK nas células foliculares. Como esperado, a presença do composto C nessas condições inibe a ativação da AMPK demonstrada em períodos de privação do TSH (**Figura 8A**).

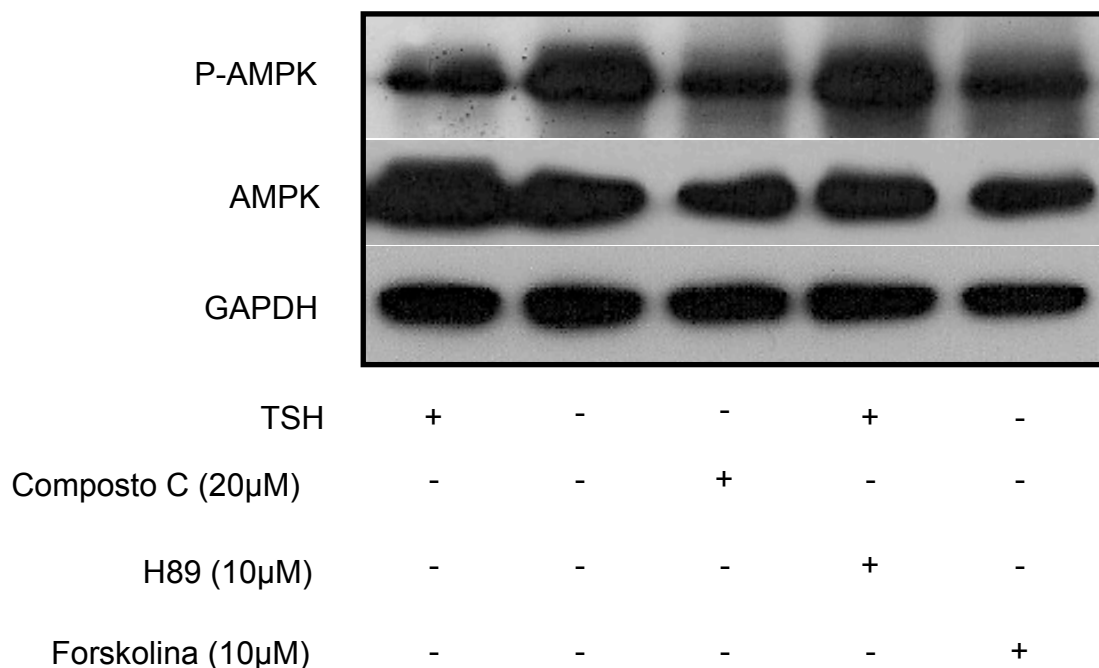
Supreendentemente, quando avaliamos a captação de iodeto, encontramos uma completa restauração no grupo tratado com composto C, mesmo na ausência do TSH por 48h (**Figura 8B**). Esses dados sugerem fortemente que um dos mecanismos de redução da captação, que ocorreria pela ausência do TSH, é via ativação da AMPK nas células foliculares. Além disso, parece existir um sistema fisiológico de controle da captação de iodeto, regulado por um jogo de forças entre a ativação da AMPK e a sinalização desencadeada pelo TSH.

Para confirmar se o efeito do TSH sobre a ativação da AMPK seria mediado pelo AMPc e PKA, utilizou-se um ativador farmacológico da adenilato ciclase e um inibidor da PKA, conhecidos como forskolina e H89 respectivamente. Desta forma,

podemos demonstrar que, mesmo na ausência de TSH a forskolina foi capaz de inibir a AMPK, enquanto que na presença de TSH, o H89 aumentou a fosforilação da AMPK (**Figura 9**). Esses dados confirmam que a regulação negativa do TSH sobre a ativação da AMPK é mediada pela via clássica de sinalização TSH-TSHr-AMPC- PKA.



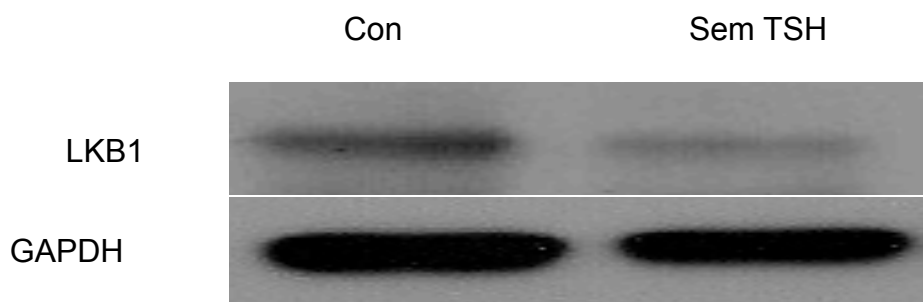
**Figura 8** - Efeito do composto C, na presença e ausência do TSH sobre (a) a expressão das enzimas AMPK e ACC nas formas total e fosforilada (b) sobre a captação de iodo nas células PCCL3. Estas foram cultivadas em meio de cultura HAM'S F12 5H, sem TSH por 48h e tratadas ou não com composto C (20 $\mu$ M) nas últimas 4h do período de 48h de privação do TSH. A proteína GAPDH foi utilizada como controle de carregamento em todas as membranas. Os blots são representativos de pelo menos 2 experimentos independentes, sendo cada proteína avaliada em uma membrana independente com a mesma amostra. As mesmas condições foram utilizadas para a captação de iodo. Os resultados da captação de iodo foram expressos como relativo ao controle, com pelo menos 3 experimentos independentes, com média  $\pm$  erro padrão e n=18 para cada condição. O asterisco indica resultado estatisticamente significativo em relação ao grupo controle. Nível de significância  $p < 0,05$ .



**Figura 9** - Efeito da retirada do TSH por 48h na presença ou ausência de composto C, H89 e Foscolina sobre a expressão da enzima AMPK nas formas total e fosforilada nas células PCCL3. Estas foram cultivadas em meio de cultura HAM'S F12 5H, e tratadas com composto C (20µM), H89 (10µM) ou foscolina (10µM) por 4h. A proteína GAPDH foi utilizada como controle de carregamento em todas as membranas. Os blots são representativos de pelo menos 2 experimentos independentes, sendo cada proteína avaliada em uma membrana independente com a mesma amostra.

#### **4.1.5 Mecanismo pelo qual o TSH suprime a ativação da AMPK nas células PCCL3**

Para tentar esclarecer o possível envolvimento da cinase ativadora da AMPK, LKB1, no mecanismo pelo qual o TSH suprime a ativação da AMPK nas células tireóideas, colocamos as células em meio de cultura privado de TSH (5H) por 48h e avaliamos a expressão da LKB1. Surpreendentemente, a ausência de TSH por esse período leva a diminuição da expressão da LKB1 nas células tireóideas, indicando que outro mecanismo é responsável pela ativação da AMPK na ausência de TSH (**Figura 10**).



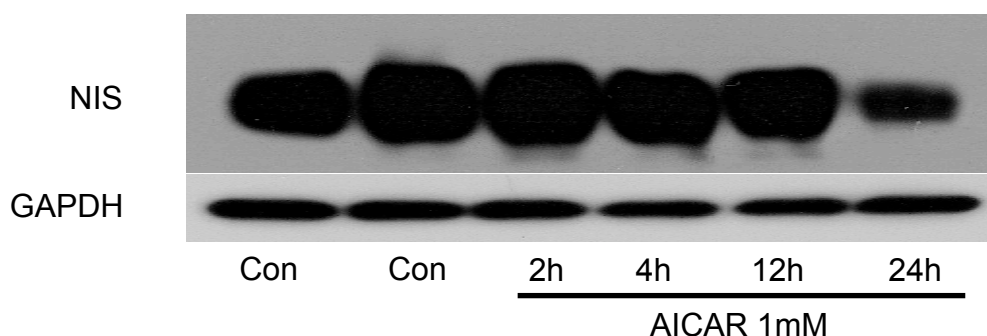
**Figura 10** - Efeito da retirada do TSH por 48h sobre a expressão da enzima LKB1 nas células PCCL3. Estas foram cultivadas em meio de cultura HAM'S F12 5H por 48h. A proteína GAPDH foi utilizada como controle de carregamento. Os blots são representativos de pelo menos 2 experimentos independentes.

#### **4.1.6 Mecanismo pelo qual a ativação da AMPK inibe a captação de iodeto nas células PCCL3**

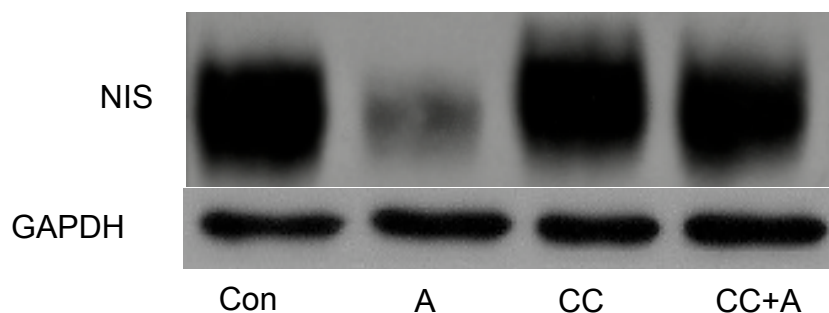
Com o objetivo de desvendar, pelo menos em parte, o mecanismo pelo qual a ativação da AMPK pelo AICAR inibe a captação de iodeto, tratamos as células PCCL3 com AICAR, composto C ou ambos por 24h e realizamos um Western blot para quantificação do co-transportador Na/I nessas condições. O tratamento com AICAR diminuiu significativamente a quantidade de NIS, enquanto o composto C reverteu completamente essa redução (**Figura 11B**). Devido ao fato do NIS possuir uma meia vida longa na presença de TSH (em torno de 5 dias), ou seja, nas mesmas condições utilizadas no presente estudo, esse resultado sugere que a ativação da AMPK por 24h pode induzir a degradação do NIS. Para melhor caracterização deste resultado, realizamos uma curva temporal de expressão do NIS com AICAR que foi incubado na presença das células por diferentes tempos. Podemos observar uma pequena redução na expressão do NIS após 12h do tratamento, seguido de uma grande diminuição após 24h (**Figura 11A**). Devido ao fato de que a captação de iodeto já está reduzida em tempos inferiores a 24h,

podemos concluir que outros mecanismos além da indução da degradação do NIS estejam envolvidos na inibição da captação induzida por AICAR.

A



B

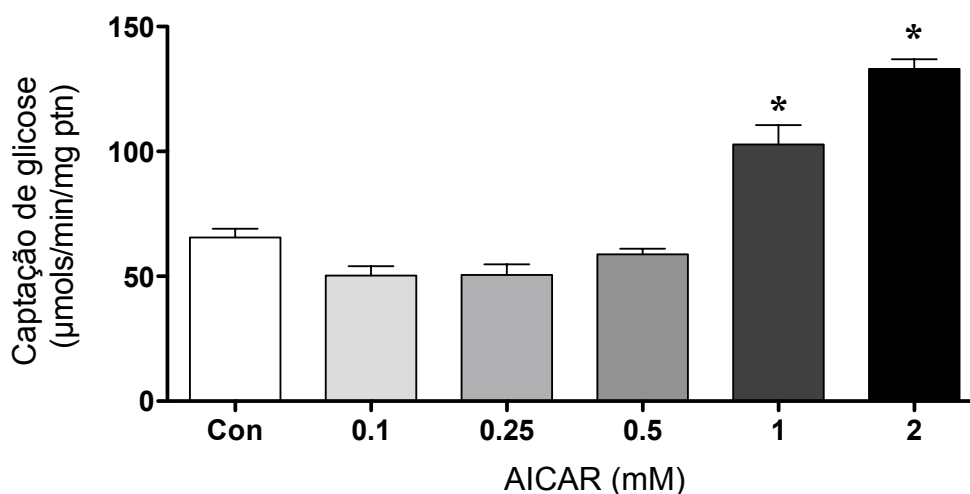


**Figura 11** - Efeito do tratamento com AICAR (1mM) (a) em diferentes tempos e (b) na presença ou ausência de composto C (20 $\mu$ M), sobre a expressão do NIS nas células PCCL3. Estas foram cultivadas em meio de cultura HAM'S F12 6H e tratadas com AICAR por diferentes tempos e com AICAR, composto C ou ambos por 24h. A proteína GAPDH foi utilizada como controle de carregamento. Os blots são representativos de pelo menos 3 experimentos independentes.

#### **4.1.7 Efeito do AICAR e composto C sobre a captação de glicose e expressão do GLUT 1/4 e AS160 nas células PCCL3**

Um das mais importantes funções descritas para a ativação da AMPK em diversos tipos celulares é a regulação da captação de glicose. Utilizando a linhagem de células de tireóide PCCL3, realizou-se inicialmente uma curva dose-resposta para avaliar a concentração ótima de AICAR a ser utilizada. O tratamento das

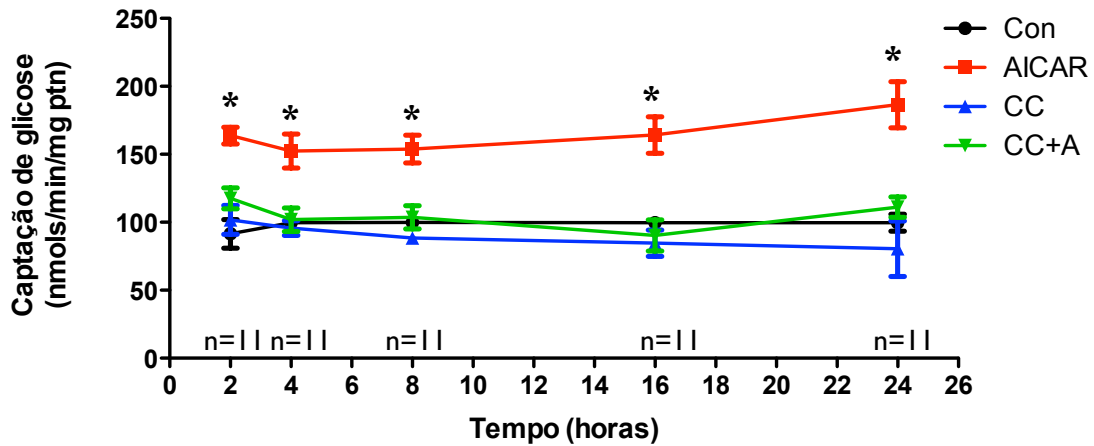
células com AICAR causou aumento significativo na captação de glicose entre a dose de 1 mM até 2 mM, sendo esta última significativamente maior do que 0,5mM (**Figura 12**). Dessa forma todos os demais experimentos foram realizados com 1mM de AICAR.



**Figura 12** - Efeito dose resposta de AICAR sobre a captação de glicose nas células PCCL3. Estas foram cultivadas em meio de cultura HAM'S F12 6H, e tratadas com diferentes doses de AICAR (1mM) por 24h. Os resultados da captação de glicose foram expressos em nmols/min/mg ptn, com pelo menos 2 experimentos independentes, média  $\pm$  erro padrão e n=6 para cada condição. O asterisco indica resultado estatisticamente significativo em relação ao grupo controle. Nível de significância  $p < 0,05$ .

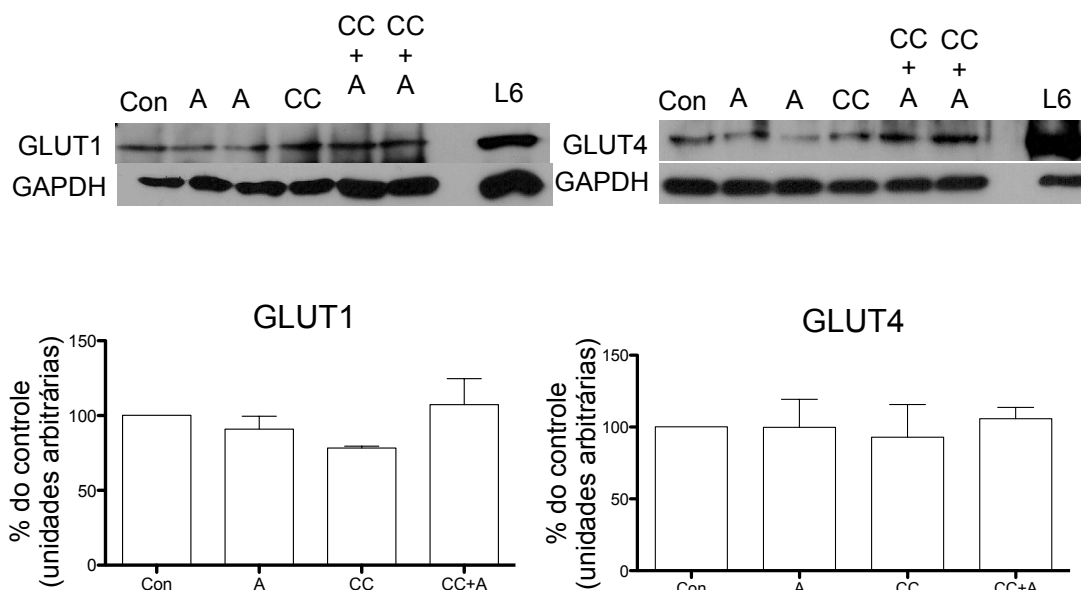
Posteriormente, realizou-se experimentos para avaliar a captação de glicose sob ativação e inibição farmacológica da AMPK em diversos tempos. Demonstramos em todos os tempos estudados, que a captação de glicose é significativamente aumentada pelo AICAR. Como esperado, o composto C impede completamente esse aumento, apesar de sozinho não alterar a captação de glicose em relação ao grupo controle (**Figura 13**). Em paralelo aos experimentos de captação de glicose, realizou-se Western blot para quantificar a expressão de GLUT1 e GLUT4 nas mesmas condições, para esclarecer o mecanismo pelo qual a

ativação da AMPK induz ao aumento na captação de glicose. Porém, não encontramos diferença significativa na expressão protéica dos transportadores de glicose em nenhuma das condições estudadas (**Figura 14**).



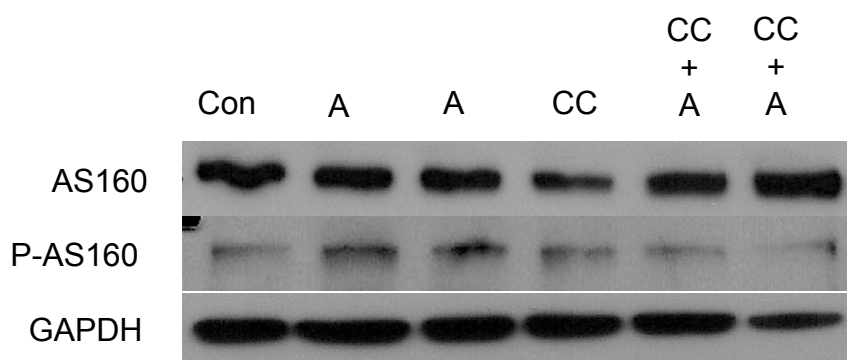
**Figura 13** - Efeito tempo dependente do tratamento com AICAR, composto C (CC) ou ambos (CC+A) sobre a captação de glicose nas células PCCL3. Estas foram cultivadas em meio de cultura HAM'S F12 6H, e tratadas com AICAR (1mM), composto C (20µM), ou ambos por diferentes tempos como indicado. Os resultados da captação de glicose foram expressos em nmols/min/mg ptn, com pelo menos 3 experimentos independentes, média ± erro padrão; n=número de poços com células para cada grupo. O asterisco indica resultado estatisticamente significativo em relação ao grupo controle. Nível de significância  $p < 0,01$ .





**Figura 14** - Efeito do tratamento com AICAR (A), composto C (CC) ou ambos (CC+A) sobre a expressão de GLUT1 e GLUT 4 nas células PCCL3. Estas foram cultivadas em meio de cultura HAM'S F12 6H, e tratadas com AICAR (1mM), composto C (20 $\mu$ M), ou ambos por 24h. A proteína GAPDH foi utilizada como controle de carregamento em todas as membranas. A linhagem de células musculares L6 foi utilizada como controle positivo. A densitometria das bandas foi calculada utilizando o software Image J (NIH). O resultado foi expresso como % do grupo controle com pelo menos 3 experimentos independentes, com média  $\pm$  erro padrão e n=3.

Com o objetivo de estudar o mecanismo pelo qual o AICAR aumenta a captação de glicose, avaliamos a expressão da proteína AS160 nas mesmas condições citadas acima. Demonstramos pela primeira vez que a proteína AS160 é expressa na linhagem de células PCCL3. Entretanto, não parece haver diferença na quantidade total e fosforilada desta proteína em nenhuma das condições estudadas (**Figura 15**).



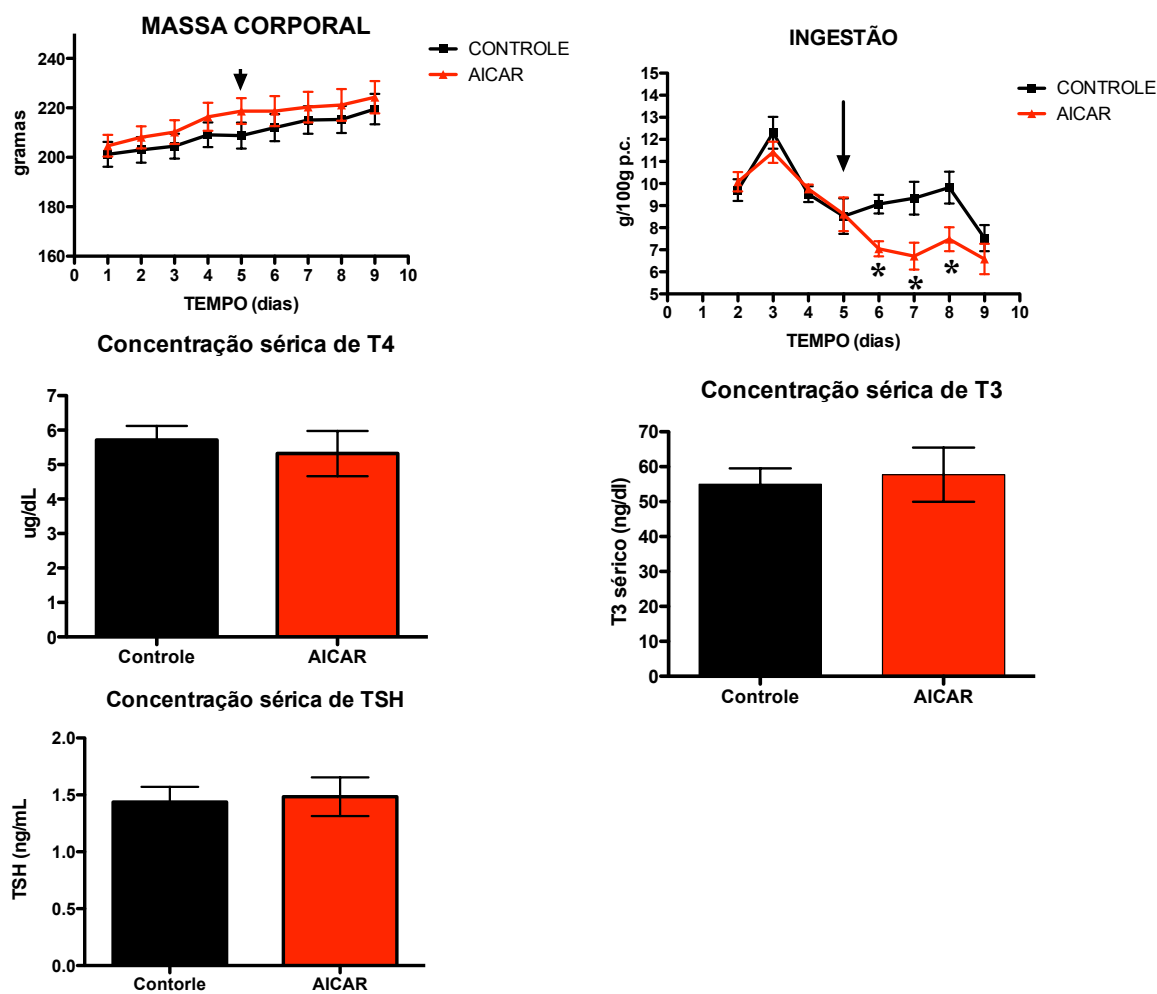
**Figura 15** - Efeito do tratamento com AICAR (A), composto C (CC) ou ambos (CC+A) sobre a expressão de AS160 nas células PCCL3. Estas foram cultivadas em meio de cultura HAM'S F12 6H, e tratadas com AICAR (1mM), composto C (20µM), ou ambos por 24h. A proteína GAPDH foi utilizada como controle de carregamento em todas as membranas. Os blots são representativos de pelo menos 2 experimentos independentes, sendo cada proteína avaliada em uma membrana independente com a mesma amostra.

#### **4.2 - Estudo 2: Efeito da administração de AICAR por 4 dias sobre a função tireóidea em ratos Wistar**

Para avaliar os efeitos da administração de AICAR por 4 dias consecutivos, sobre a função tireóidea, tratamos um grupo de ratos Wistar machos com AICAR (0,7g/Kg) com uma injeção i.p. diária. Controlamos a massa e composição corporal, bem como os níveis séricos dos HT e TSH.

Não encontramos diferença significativa na massa e composição corporais após 4 dias de tratamento. Entretanto, observamos diminuição transitória na ingestão alimentar, com redução significativa ocorrendo em torno do segundo dia de administração, retornando aos valores do grupo controle no 4º dia de administração de AICAR.

Nenhuma alteração foi encontrada nas concentrações séricas de T4, T3 e TSH após 4 dias de administração de AICAR.



**Figura 16** – Efeito do tratamento com AICAR (0.7g/Kg m.c.) por 4 dias sobre a massa corporal, ingestão e concentração séricas dos hormônios T4, T3 e TSH em ratos Wistar machos. Os resultados são representativos de pelo menos 2 experimentos independentes, estão expressos como média  $\pm$  erro padrão e possuem  $n = 10$  para cada grupo. As setas representam o início do tratamento com AICAR. O asterisco indica resultado estatisticamente significativo. Nível de significância  $p < 0,05$ .

## 5 - DISCUSSÃO

Nosso trabalho demonstrou pela primeira vez que a enzima AMPK é expressa na glândula tireóide e que participa da regulação da captação de iodeto, etapa chave na formação dos hormônios tireóideos. De fato, a ativação da AMPK por AICAR reduziu a captação de iodeto *in vivo* e *in vitro*, enquanto a supressão dessa ativação, realizada pelo composto C, impediu completamente o efeito do AICAR na linhagem de células tireóideas PCCL3.

A captação de iodeto na tireóide é estimulada por TSH, tanto por aumentar a síntese do co-transportador Na/I, quanto por regular o funcionamento da proteína por mecanismos pós-traducionais, como a retirada do NIS da membrana (RIEDEL et al 2001; WEISS et al 1984). De fato, quando retiramos o TSH do meio de cultura, observamos queda importante na captação de iodeto. Interessantemente, nessas condições, demonstramos aumento na fosforilação da AMPK, sugerindo que o TSH possa regular a atividade desta enzima diretamente. Além disso, observamos que a captação de iodeto foi completamente revertida pelo inibidor da ativação da AMPK, composto C, mesmo na ausência de TSH, fato esse acompanhado pela redução da fosforilação da AMPK. Esses resultados sugerem que a redução da captação de iodeto na ausência de TSH se dá via ativação da AMPK nas células PCCL3. Nossos dados sugerem que, no âmbito fisiológico, as diferentes concentrações de TSH modulem a ativação da AMPK, que por sua vez, controla a capacidade de captação de iodeto e conseqüente formação dos HT. Essa hipótese é reforçada pelo fato do composto C sozinho elevar a captação de iodeto acima dos níveis do grupo controle, sugerindo uma contra-regulação fisiológica entre AMPK e TSH.

Diversas vias de sinalização intracelulares foram descritas a partir da ligação do TSH ao seu receptor na célula tireóidea. Dentre estas, a via desencadeada pelo aumento do AMPc e subsequente ativação da PKA, está diretamente relacionada com a expressão do NIS e com a captação de iodeto (BARATTA et al 2009; KOGAI et al, 2000; SAITO et al, 1997). De maneira semelhante, em nossos estudos, demonstramos que a sinalização envolvida na regulação da ativação da AMPK pelo TSH é dependente de AMPc e PKA. De fato, quando tratamos as células PCCL3, na presença de TSH e do inibidor da PKA H89, observamos aumento na fosforilação da AMPK, comparável aquela encontrada na ausência do TSH no meio de cultura. Inversamente, quando colocamos as células em meio 5H porém na presença de forskolina, observamos o mesmo nível de inibição do grupo controle, que é cultivado com meio 6H. Esses resultados reforçam a hipótese de que o mecanismo pelo qual o TSH controla a captação de iodeto envolve, pelo menos em parte, a inativação da AMPK. A via de ativação da AMPK em diversos tipos celulares envolve a fosforilação da treonina-172 pela cinase constitutivamente ativa LKB1. Entretanto, a presença dessa enzima na tireóide ainda não havia sido descrita. Nosso trabalho demonstrou que a LKB1 é expressa na glândula tireóide e é regulada positivamente por TSH, o que no entanto, não explica a regulação negativa da AMPK observada nas mesmas condições. Postulamos portanto, baseado em achados da literatura, que o mecanismo de regulação negativa do TSH deve envolver a inativação da CAMKK $\beta$  e fosforilação da serina 485/491 da AMPK pela via AMPc-PKA (HURLEY et al 2007; STEIBERG & KEMP, 2009).

Recentemente, foi descrito que o TSH regula a captação de iodeto por vias pós-traducionais (VADYSIRISACK et al 2008; RIEDEL et al 2001). Apesar do mecanismo exato desta regulação ainda não ter sido esclarecido, foi demonstrado

que, na ausência da sinalização do TSHR ocorre, internalização e diminuição da estabilidade da proteína NIS, cuja meia vida passa de 5 para 3 dias (RIEDEL et al 2001). Foi ainda descrito que, o NIS possui sítios de fosforilação que regulam a atividade e também, a estabilidade da proteína (VADYSIRISACK et al 2007). O presente trabalho sugere um mecanismo diferente de regulação do NIS através do aumento da degradação. Mostramos uma curva temporal no qual as células PCCL3 foram submetidas ao tratamento com AICAR. Somente a partir de 24h de tratamento houve diminuição na quantidade total de NIS. Com base na longa meia vida dessa proteína e no fato de que esse experimento foi realizado na presença de TSH, concluímos que a ativação da AMPK induz a degradação do NIS nessa linhagem celular. Apesar de não encontrarmos relatos na literatura sobre o mecanismo que leva à degradação do co-transportador  $\text{Na}^+/\text{I}^-$ , observamos que outros transportadores como os GLUTs, são degradados por enzimas lisossomais após a fusão das vesículas contendo o transportador com o lisossomo (WEIMAN et al 2009; HOU et al 2009). Um dos fatores relacionados a esse processo, parece ser a presença do domínio PDZ na região C-terminal da proteína (WEIMAN et al 2009). Já foi descrito que o NIS possui este domínio, entretanto a relação entre a degradação e a presença de domínio PDZ nessa proteína ainda tem que ser investigada (DOHAN et al 2003). Recentemente, foi demonstrado que a AMPK regula a atividade e posicionamento na membrana de um co-transportador  $\text{Na}^+/\text{glicose}$  da mesma família do NIS (SLC5A1). Nesse trabalho, SOPJANI et al (2010) demonstram que a expressão de uma AMPK constitutivamente ativa induz aumento na atividade e na quantidade do transportador SGLT1 presente na membrana. Ainda não foi descrito o mecanismo pelo qual a AMPK exerce esses efeitos, mas este trabalho reforça o papel desta enzima na regulação de transportadores da família SLC5A1.

Nossos dados demonstram ainda que outros mecanismos pós-traducionais devem atuar na resposta da ativação da AMPK na célula tireóidea. Isso porque demonstramos inibição da captação de iodeto após 2,4,8 e 16h de tratamento com AICAR. Entretanto, quando analisamos a expressão de NIS em tempo similares, observamos que esta não sofre alteração, o que sugere que outro mecanismo além do relacionado à indução da degradação esteja envolvido. Dentre as hipóteses abordadas na literatura com relação à regulação do NIS, a fosforilação da Serina-43 e Serina-581 parecem regular a atividade do transporte de iodo (VADYSIRISACK et al, 2007). Como a AMPK exerce seus efeitos a partir da fosforilação de sítios específicos em enzimas chaves do metabolismo, a fosforilação do NIS pela AMPK explicaria a rápida redução da captação observada com o tratamento de AICAR (KAHN et al 2005). Entretanto essa hipótese ainda tem que ser demonstrada em estudos futuros.

Outras vias de sinalização intracelular estão envolvidas na regulação da captação de iodeto, ainda que não haja consenso sobre de que maneira estas vias atuem no âmbito fisiológico. Dessa forma, já foi demonstrado que a PI3K, ativada pela subunidade  $G\beta\gamma$  do receptor de TSH e por IGF-I, inibe a expressão do NIS e a captação de iodeto estimulada por AMPc. Da mesma forma, a inativação da subunidade  $G\beta\gamma$ , aumenta a expressão do NIS mediada pela ativação de PAX-8 pelo TSH (ZABALLOS et al 2008; GARCIA & SANTISTEBAN,2002). Recentemente, nosso grupo demonstrou que a inibição da proteína de mamífero-alvo-da-rapamicina (mTOR) aumenta a captação de iodeto nas células PCCL3. Já foi demonstrado que essa proteína é ativada por PI3K, o que constitui uma importante via de regulação negativa da captação de iodeto na célula PCCL3 (SOUZA et al, 2010). Curiosamente, é descrito na literatura que em diversos tipos celulares, a

AMPK inibe a ativação da mTOR (LEE et al 2010; WILLIAMSON et al 2006). Assim, parecem existir pelo menos 2 vias independentes de inativação da captação de iodeto na tireóide. No entanto, a relação entre estas vias ainda tem que ser melhor estudada.

Devemos ainda considerar a hipótese do AICAR e do composto C desempenharem seus efeitos de forma independente da sinalização por AMPK. Apesar dos nossos dados sempre se relacionarem com o aumento ou diminuição da fosforilação da subunidade  $\alpha$  da AMPK (essencial para a ativação da enzima), já foram demonstrados efeitos independentes desses compostos (VUCICEVIC et al, 2009; ZANG et al, 2008). Interessantemente, ZANG et al (2008) demonstraram que o AICAR regula a diferenciação de astrócitos ativando a via de sinalização da Januscinase (JAK-STAT3), independente dos efeitos sobre a ativação da AMPK. Essa via é ativada na tireóide em resposta ao hormônio leptina, que reduz a captação de iodeto estimulada por TSH em linhagens de células tireóideas (IZOZAKI et al, 2004; OLIVEIRA et al 2007). Ao mesmo tempo, já foi demonstrado que a leptina ativa a AMPK em células musculares e inibe essa enzima no hipotálamo, demonstrando então que parte do mecanismo de ação desse hormônio é via modulação da atividade da AMPK nos diversos tecidos (STEIBERG et al 2009; MINOKOSHI, et al 2004). Dessa forma é necessária a comprovação do papel da AMPK nas células tireóideas através de técnicas como RNA de interferência, bem como da possível relação entre as vias de sinalização da leptina e a AMPK no tireócito.

Diversos estudos na literatura demonstram que uma das etapas mais importantes no metabolismo celular, controlada pela AMPK, é a captação de glicose (MERRIL et al 1997; RUSSEL et al 1999; DAVAL et al 2006; IHLEMANN et al 2002; SOPJANI et al 2010). Além disso, a captação de glicose possui crescente



importância no diagnóstico do câncer da tireóide através da técnica de PET-SCAN utilizando um análogo da glicose [18]Fluorodeoxiglicose. Já foi demonstrado a relação inversa entre a captação de iodeto e glicose, além da correlação positiva entre a captação de glicose e a agressividade do câncer da tireóide (BLASER et al 2006; DIETLEN et al 1997; FINKELSTEIN et al 2007).

Nosso trabalho então demonstrou que o AICAR aumenta de maneira dose e tempo dependente a captação de glicose nas células tireóideas. Esse efeito, no entanto, não é acompanhado por um aumento na expressão dos transportadores de glicose GLUT1 e 4. Esse fato nos leva a postular que a ativação da AMPK induz a translocação desses transportadores para a membrana, como demonstrado em diferentes tipos celulares (MERRIL et al 1997; RUSSEL et al 1999). Na tentativa de esclarecer parte desse mecanismo, avaliamos a expressão da proteína AS160, que no músculo esquelético é modulada tanto pela AMPK quanto pela insulina, controlando a translocação da vesícula de GLUT4 para a membrana. Demonstramos pela primeira vez que a proteína AS160 está expressa na célula tireóidea, apesar de não parecer sofrer modificação no seu estado fosforilado na presença de AICAR.

O estudo da captação de glicose na tireóide é dificultado pela expressão diferenciada dos membros da família dos transportadores de glicose nos diversos modelos experimentais. Dessa forma, a célula PCCL3 expressa GLUT1 e 4 enquanto a glândula tireóide humana expressa GLUT10, 3 e 4 e os diferentes tipos de câncer expressam em sua maioria GLUT1 e 3 (HOSAKA et al 1992; MATSUZU et al 2005). Entretanto, a identificação de fatores que controlam a captação de glicose independentemente da sinalização do TSH é de fundamental relevância. Além disso, a ativação da AMPK no câncer da tireóide poderia levar, pelo menos em parte, ao mecanismo pelo qual ocorre inibição da captação de iodeto e aumento na captação

de glicose simultaneamente. Ainda que essa hipótese tenha que ser demonstrada, a ativação da AMPK já foi demonstrada em diferentes tipos de câncer como tendo efeito supressor da proliferação celular (LUO et al 2010).

Na tentativa de avaliar o possível efeito do AICAR sobre a função tireóidea no âmbito fisiológico, injetamos esse composto na dose de 0.7g/Kg em ratos Wistar machos por 4 dias. Apesar de observarmos um não esperado efeito transitório sobre a ingestão, não detectamos quaisquer alterações das concentrações séricas dos HT e do TSH. De fato, se analisarmos somente a inibição da captação de iodeto, devido a grande meia vida dos HT no sangue e ao estoque de HT presente no colóide, levaria um longo tempo para que as concentrações séricas dos HT sofressem alterações mensuráveis (LARSEN et al 2002). Já foi demonstrado que a administração crônica de AICAR leva ao aumento nas concentrações séricas de ácidos graxos, diminuição do coeficiente respiratório e melhora na sensibilidade a insulina (POLD et al 2005). Entretanto, os efeitos diretos dos ácidos graxos e da glicose sobre a função tireóidea não são conhecidos (MARIASH & OPPENHEIMER, 1985). Dessa maneira, mais estudos são necessários para a caracterização dos efeitos do AICAR sobre a função tireóidea *in vivo*.

## 6 - CONCLUSÃO

A cinase ativada por AMP (AMPK) está expressa tanto na glândula tireóide de ratos quanto na linhagem de células PCCL3.

Quando ativada farmacologicamente pelo AICAR, a AMPK fica ativada e promove uma significativa redução na captação de iodeto, de maneira dose e tempo dependente. A inibição farmacológica da AMPK, utilizando-se composto C, não só reverte completamente os efeitos do AICAR como aumenta os níveis de captação de iodeto em relação ao grupo controle.

A ativação da AMPK por AICAR também promove a redução da captação *in vivo*. Após uma única injeção de AICAR, observou-se diminuição significativa na captação de 15 minutos. Isso demonstra que a ativação da AMPK possui relevância fisiológica no controle da captação de iodeto na glândula tireóide.

O TSH inibe parcialmente a ativação da AMPK na linhagem de células PCCL3. Esse efeito é mediado por AMPc e PKA uma vez que foi revertido pela presença do inibidor da PKA, H89, e estimulador da adeliato ciclase, forskolina. Essa inibição parcial não é mediada pela cinase LKB1, o que sugere que a cinase CaMKK $\beta$  pode estar envolvida.

O mecanismo pelo qual a AMPK diminui a captação de iodeto é, pelo menos em parte, por induzir a degradação do NIS. Entretanto, esse efeito só foi observado após 24h de tratamento com AICAR enquanto que a captação de iodeto já está diminuída após 2h de tratamento. Isso sugere que outros mecanismos estão envolvidos na diminuição da captação de iodeto promovida pela ativação da AMPK na linhagem de células PCCL3.

A ativação da AMPK por AICAR aumenta de maneira dose e tempo dependente a captação de glicose na linhagem de células PCCL3. Apesar disso, não observou-se aumento na expressão dos transportadores de glicose GLUT1 e GLUT4 e nem alterações na expressão da proteína AS160 total e fosforilada, o que sugere que a ativação da AMPK controla a translocação desses transportadores para a membrana por outros mecanismos.

A administração crônica de AICAR por 4 dias em ratos Wistar machos não promove alterações séricas nas concentrações de T3, T4 e TSH, bem como da massa corporal.

## **7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**Baratta MG, Porreca I, Di Lauro R.** Oncogene Ras blocks the cAMP pathway and dedifferentiates thyroid cells via an impairment of Pax8 transcriptional activity. *Molecular Endocrinology* 23(6):838-848, 2009.

**Bläser D, Maschauer S, Kuwert T, Prante O.** In Vitro Studies on the Signal Transduction of Thyroidal Uptake of <sup>18</sup>F-FDG and <sup>131</sup>I-Iodide. *J Nucl Med* 47:1382–1388, 2006.

**Berberof-Van-Sande J, Schell-Frederick E, Dumont JE.** The energy metabolism of the thyroid gland. *Annals of Clinical Research* 4:189-199, 1972.

**Bizhanova A, Kopp P.** The Sodium-Iodide Symporter NIS and Pendrin in Iodide Homeostasis of the Thyroid. *Endocrinology* 150(3):1084-1090, 2009.

**Bradford MM.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

**Capen C.** (1996) Anatomy. In: Braverman, LE & Utiger, RD (editors). *The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text.* (7<sup>a</sup> ed). Lippincott-Raven, Nova Iorque, cap. 3, p. 19-46

**Carling D, Clarke PR, Zammit VA, Hardie DG.** Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities. *Eur J Biochem* 186: 129–136, 1989.

**Corvilain B, Laurent E, Leconte M, Vansande J, Dumont JE.** Role of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and the phosphatidylinositol-Ca<sup>2+</sup> cascades in mediating the effects of thyrotropin and iodide on hormone synthesis and secretion in human thyroid slices. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 79(1): 152-159, 1994.

**Dai G, Levy O, Carrasco N.** Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 379: 458–460, 1996.

**Dohan O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, Ginter CS & Carrasco N.** The sodium/iodide symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocrine Reviews* 24:48–77, 2003.

**Daval M, Fougelle F, Ferre P.** Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. *J Physiol* 574:55-62, 2006.

**Dietlein M, Scheidhauer K, Voth E, Theissen P, Chicha H.** Fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography and iodine-131 whole-body

scintigraphy in the follow-up of differentiated thyroid cancer. *Eur J Nucl Med* 24:1342–1348 1997

**Dzamko NL, Steinberg GR.** AMPK-dependent hormonal regulation of whole-body energy metabolism. *Acta Physiol* 196(1):115-27 2009.

**Eng PH, Cardona GR, Fang SL, Previti M, Alex S, Carrasco N, Chin WW, Braverman LE.** Escape from the acute Wolff–Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein. *Endocrinology* 140:3404–3410, 1999.

**Erecinska M, Wilson DF.** Regulation of cellular energy metabolism. *J Membrane Biology* 70:1-14, 1982.

**Ferreira AC, Lima LP, Araujo RL, Müller G, Rocha RP, Rosenthal D & Carvalho DP.** (2005) Rapid regulation of thyroid sodium-iodide symporter activity by thyrotrophin and iodine. *J. Endocrinol.* 1: 69-76.

**Filetti S, Bidart S-M, Arturi F, Caillou B, Russo D & Schlumberger M.** (1999) Sodium/Iodide symporter: a key transporter system in thyroid cancer cell metabolism. *Eur. J. Endocrinol.* 144: 443-457.

**Filetti S, Damante G, Foti D.** Thyrotropin stimulates glucose transport in culture rat thyroid cells. *Endocrinology* 120:2576-2581, 1987.

**Finkelstein SE, Grigsby PW, Siegel BA, Dehdashti F, Moley JF, Hall BL.** Combined [18F]Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography and Computed Tomography (FDG-PET/CT) for Detection of Recurrent, 131I-Negative Thyroid Cancer. *Annals of Surgical Oncology* 15(1):286–292, 2007.

**Garcia B, Santisteban, P.** PI3K is involved in the IGF-1 inhibition of TSH-induced sodium/iodide symporter gene expression. *Mol Endocrinol* 16:342-352, 2002.

**Grünwald F, Schomburg A, Bender H, Klemm E, Menzel C, Bultmann T, Palmedo H, Ruhlmann J, Kozak B, Biersack HJ.** Fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the follow-up of differentiated thyroid cancer. *Eur J Nucl Med* 23:312-319, 1996.

**Heather LC, Cole MA, Atherton HJ, Coumans WA, Evans RD, Tyler DJ, Glatz JF, Luiken JJ, Clarke K.** Adenosine monophosphate-activated protein kinase activation, substrate transporter translocation, and metabolism in the contracting hyperthyroid rat heart. *Endocrinology* 151(1):422-31, 2010.

**Hosaka Y, Tawata M, Kurihara A, Ohtaka M, Endo T, Onaya T.** The regulation of two distinct glucose transporter (GLUT1 and GLUT4) gene expressions in culture rat thyroid cells by thyrotropin. *Endocrinology* 131:159-165, 1992.

**Hou JD, Williams D, Vicogne J, Pessin JE.** The Glucose Transporter 2 Undergoes Plasma Membrane Endocytosis and Lysosomal Degradation in a Secretagogue-Dependent Manner. *Endocrinology* 150: 4056–4064, 2009.

**Hulbert, AL.** Thyroid hormones and their effects: a new perspective. *Biol. Rev.* 75:519-631, 2000.

**Irrcher I, Walkinshaw DR, Sheehan TE, Hood DA.** Thyroid hormone (T3) rapidly activates p38 and AMPK in skeletal muscle in vivo. *J Appl Physiol.* 104(1):178-85, 2008.

**Ishii S, Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Sugihara H, Oikawa S.** Triiodothyronine (T3) stimulates food intake via enhanced hypothalamic AMP-activated kinase activity. *Regul Pept.* 151(1-3):164-9 2008.

**Ihlemann J, Hellsten Y, Lauritzen HPMM, Hardie DG, Galbo H, Ploug T.** Effects of fiber type and nutritional state on AICAR- and contraction-stimulation glucose transport in rat muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E1291-E1300, 2002.

**Kahn, BB, Alquier T, Carling D, Hardie G.** AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provide clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* 1: 15-25, 2005.

**Kim B.** Thyroid hormone as a determinant of energy expenditure and the Basal metabolic rate. *Thyroid* 18 (2): 141-144 2008.

**Kogai T, Curcio F, Hyman S, Cornford EM, Brent GA, Hershman JM.** Induction of follicle formation in long-term cultured normal human thyroid cells treated with thyrotropin stimulates iodide uptake but not sodium/iodide symporter messengerRNA and protein expression. *J Endocrinol* 167:125–135, 2000.

**Law RM, Stafford A, Quick MW.** Functional Regulation of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Transporters by Direct Tyrosine Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **275**, 23986–23991, 2000.

**La Vieja A, Dohan O, Levy O, Carrasco N.** Molecular Analysis of the Sodium Iodide Symporter: Impact on Thyroid and Extrathyroid Pathophysiology. *Physiological Reviews* 80:1083-1105, 2000.

**Larsen PR, Davies TF, Schlumberger MJ & Hay ID.** (2002) Thyroid Physiology and Diagnostic Evaluation of Patients with Thyroid Disorders. *In:* Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S & Polonsky KS (editors) *Williams Textbook of Endocrinology.* (10<sup>th</sup> ed). W B Saunders Company, Philadelphia, cap. 10, p. 331-573.

**Luo Z, Zang M, Guo W.** AMPK as a metabolic tumor suppressor: control of metabolism and cell growth. *Future Oncol.* 6(3):457-70, 2010.

**Lee YK, Park SY, Kim YM, Kim DC, Lee WS, Surh YJ, Park OJ.** Suppression of mTOR via Akt dependent and independent mechanisms in selenium treated colon cancer cells: involvement of AMPK $\alpha$ 1. *Carcinogenesis.* Feb 17 Epub ahead of print, 2010.

**Mariash CN, Oppenheimer JH.** Interaction of thyroid hormone and nutritional signals on thyroid hormone action. *Mol Cell Endocrinol* 43(1):3-13, 1985.

**Merrill GF, Kurth EJ, Hardie DG, Winder WW.** AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 273: E1107–E1112, 1997

**Matsuzu K, Segade F, Wong M, Clark OH, Perrier ND, Bowden DW.** Glucose transporters in the thyroid. *Thyroid* 15(6):545-50, 2005

**Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, Mu J, Fougelle F, Ferré P, Birnbaum MJ, Stuck BJ, Kahn BB.** AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428(6982): 569-74, 2004.

**Park SH, Paulsen SR, Gammon SR, Mustard KJ, Hardie DG, Winder WW.** Effects of thyroid state on AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase expression in muscle. *J Appl Physiol* 93(6):2081-8 2002.

**Pold R, Jensen LS, Jessen N, Buhl ES, Schmitz O, Flyvbjerg A, Fujii N, Goodyear LJ, Gotfredsen CF, Brand CL, Lund S.** Long-term AICAR administration and exercise prevents diabetes in ZDF rats. *Diabetes* 54(4):928-34, 2005.

**Raspe E & Dumont JE.** (1991) Robert Feulgen Lecture 1991. Control and role of major signalling cascades of the thyrocyte. *Prog. Histochem. Cytochem.* 26: 1-29.

**Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P.** A perspective view of sodium iodide symporter research and its clinical implications. *European Journal of Endocrinology* 155:495-512, 2006.

**Riedel C, Levy O & Carrasco N.** (2001) Post-transcriptional Regulation of the Sodium/Iodide Symporter by Thyrotropin. *J. Biol. Chem.* 276: 21458-21463.

**Ross MH, Reith EJ & Romrell LJ.** (1993) Glândulas Endócrinas. Em: Ross, MH & Rowrell, LJ (editores). *Histologia Texto e Atlas* (2ª ed). Editorial Médica Panamericana, São Paulo, cap. 20, p. 573-577.

**Rothwell NJ, Stock MJ.** Regulation of energy balance. *Ann. Rev. Nutr.* 81(1): 235-256, 1981.

**Russell RR 3rd, Bergeron R, Shulman GI, Young LH.** Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *Am J Physiol.* 277(2 Pt 2):H643-9, 1999.

**Saito T, Endo T, Kawaguchi A, Ikeda M, Nakazato M, Kogai T, Onaya T.** Increased expression of the Na/I symporter in cultured human thyroid cells exposed to thyrotropin and in Graves' thyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 82:3331–3336, 1997.

**Samih N, Hovsepian S, Aouani A, Lombardo D, Fayet G.** Glut-1 Translocation in FRTL-5 Thyroid Cells: Role of Phosphatidylinositol 3-Kinase and N-Glycosylation. *Endocrinology* 141:4146-4155, 2000

**Sakamoto K, Holman GD.** Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 In the regulation of GLUT4 traffic. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 295(1):E29-37, 2008.

**Sopjani M, Bhavsar SK, Fraser S, Kemp BE, Föller M, Lang F.** Regulation of Na (+)-coupled glucose carrier SGLT1 by AMP-activated protein kinase. *Mol Membr Biol.* 27(2-3):137-44, 2010.

**Steinberg GR, Kemp BE.** AMPK in health and disease. *Physiological Reviews* 89:1025-1079, 2009.

**Steinberg GR, Watt MJ, Febbraio MA.** Cytokine Regulation of AMPK signalling. *Front Biosci.* 14:1902-16, 2009.

**Tata JR, Ernster L, Lindenberg O.** Control of basal metabolic rate by thyroid hormones and cellular function. *Nature* 193:1058-60, 1962.

**Treebak JT, Wojtaszewski JF.** Role of 5'AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. *Int J Obes* 32 Suppl 4:S13-7, 2008.

**Treebak JT, Glund S, Deshmukh A, Klein DK, Long YC, Jensen TE, Jørgensen SB, Viollet B, Andersson L, Neumann D, Wallimann T, Richter EA, Chibalin AV, Zierath JR, Wojtaszewski JF.** AMPK-mediated AS160 phosphorylation in skeletal muscle is dependent on AMPK catalytic and regulatory subunits. *Diabetes* 55(7): 2051-8, 2006.

**Thomson DM, Winder WW.** AMP-activated protein kinase control of fat metabolism in skeletal muscle. *Acta Physiol* 196(1):147-54, 2009.

**Vadysirisack DD, Chen ESW, Zhang Z, Tsai MD, Chang GD, Jhiang SM.** Identification of in vivo phosphorylation sites and their functional significance in sodium iodide symporter. *Journal of Biological Chemistry* 282(51): 36820-36828, 2007.

**Vucicevic L, Misirkic M, Janjetovic K, Harhaji-Trajkovic L, Prica M, Stevanovic D, Isenovic E, Sudar E, Sumarac-Dumanovic M, Micic D, Trajkovic V.** AMP-activated protein kinase-dependent and -independent mechanisms underlying in vitro antiangioma action of compound C. *Biochem Pharmacol.* 77(11):1684-93, 2009.

**Zaballos MA, Garcia B, Santisteban P.** G $\beta$  $\gamma$  dimers release in response to thyrotropin activate phosphoinositide 3-kinase and regulate gene expression in thyroid cells. *Molecular Endocrinology* 22(5):1183-1199, 2008.

**Zang Y, Yu LF, Pang T, Fang LP, Feng X, Wen TQ, Nan FJ, Feng LY, Li J.** AICAR induces astroglial differentiation of neural stem cells via activating the JAK/STAT3 pathway independently of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 283(10): 6201-8, 2008.



**Yamauchi M, Kambe F, Cao X, Lu X, Kozaki Y, Oiso Y, Seo H.** Thyroid hormone activates adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase via intracellular calcium mobilization and activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta. *Mol Endocrinol.* 22(4):893-903 2008.

**Yeh LA, Lee KH, Kim KH.** Regulation of rat liver acetyl-CoA carboxylase. Regulation of phosphorylation and inactivation of acetyl-CoA carboxylase by the adenylate energy charge. *J Biol Chem* 255: 2308–2314, 1980

**Wieman HL, Horn SR, Jacobs SR, Altman BJ, Kornbluth S, Rathmell JC.** An essential role for the Glut1 PDZ-binding motif In growth factor regulation of Glut1 degradation and trafficking. *The biochemical Journal* 418:345-357, 2009.

**Williamson DL, Bolster DR, Kimball SR, Jefferson LS.** Time course changes in signaling pathways and protein synthesis in C2C12 myotubes following AMPK activation by AICARAm *J Physiol Endocrinol Metab* 291: E80–E89, 2006.

**Wolff, J.** Transport of iodide and other anions in thyroid gland. *Physiological Reviews* 44:45-90, 1964.

**Wolff J, Chaikoff IL.** Plasma inorganic iodide as an homeostatic regulator of thyroid function. *Journal of Biological Chemistry* 174(2):555-564, 1948.

**Weiss SJ, Philip NJ, Amueis-Impiombato FS, Grollman EF.** Thyrotropin-stimulated iodide transport mediated by adonise 3',5'-monophosphate and dependent on protein synthesis. *Endocrinology* 114: 1099–1107, 1984.

“PAPEL DA CINASE ATIVADA POR AMP NA CAPACIDADE DA CÉLULA  
TIREÓIDE EM CAPTAR IODETO E GLICOSE”

## **BRUNO MOULIN DE ANDRADE**

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO  
GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS

RIO DE JANEIRO, 14 DE ABRIL DE 2010.

APROVADA POR:

---

PROF. CELSO CARUSO NEVES (DOUTOR - UFRJ)  
COORDENADOR DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS (FISIOLOGIA)

---

PROF<sup>a</sup> DENISE PIRES DE CARVALHO (DOUTORA - UFRJ) - ORIENTADORA

---

PROF<sup>a</sup> DORIS ROSENTHAL (DOUTORA - UFRJ) - REVISORA

---

PROF<sup>a</sup> JENIFFER LOWE (DOUTORA - UFRJ)

---

PROF MAURO SOLA PENNA (DOUTOR - UFRJ)

---

PROF<sup>a</sup> CARMEN CABANELAS PRAZOS-MOURA (DOUTORA - UFRJ)



# Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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