

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

UFRGS
DEPTO. DE FISILOGIA
BIBLIOTECA

**EFEITO DA INSULINA SOBRE A CAPTAÇÃO DE
GLICOSE E AMINOÁCIDO PELA TIREÓIDE
*IN VITRO***

VERA LÚCIA ANDRADE MACHADO

Orientador: Profa. Dra. Maria Marques

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, concentração em Fisiologia, Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências.

PORTO ALEGRE

1995

"Quando ocorre a impossibilidade de esclarecer a estrutura e função de um órgão complexo, deve-se recorrer aos embriões ou animais inferiores, nos quais a natureza mostra-se mais simples e menos esquiua, oferecendo o plano quase esquemático da estrutura e função".

SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL

Para ARLINDO (*in memoriam*) e NOEMY

PEDRO HENRIQUE

RENÊ MARIA

RUBENS e THEREZINHA

ARLINDO, MARA LÚCIA e ANDRÉ,

com carinho

À Profa. Dra. MARIA MARQUES, meu reconhecimento especial, pela orientação segura, efetiva, pelo exemplo constante de dedicação e entusiasmo pela pesquisa e pelo acompanhamento amigo em todas as etapas deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

- * Aos PROFESSORES E FUNCIONÁRIOS do Departamento de Fisiologia e do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, concentração em Fisiologia, pela amizade e incentivo constante;
- * Ao Prof. Dr. GUILLERMO FEDERICO WASSERMANN, pelo ensino da metodologia e pelas significativas sugestões dadas;
- * À ADRIANA CRISTINA LUDWIG, pelo solícito auxílio na realização dos experimentos;
- * Ao FERNANDO MARCOS DOS REIS, pela valiosa colaboração na montagem dos gráficos;
- * Ao LUÍS ROBERTO GUIMARÃES DA SILVA, pela importante ajuda na impressão deste trabalho;
- * À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e à Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação (PROPEP-UFRGS), pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RELAÇÃO DE FIGURAS E TABELAS	IX
RESUMO	XI
SUMMARY	XIV
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	34
2.1- Objetivo geral	35
2.2 - Objetivos específicos	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1- Material	38
3.1.1- Reagentes	38
3.1.2- Animais	38
3.2- Procedimentos	39
3.2.1- Período pré-experimental	39
3.2.2- Período experimental	40
3.2.2.1- Medida <i>in vitro</i> da captação de glicose e aminoácido pela tireóide de tartarugas e ratos	41
3.2.2.2 - Captação <i>in vitro</i> de glicose e aminoácido pela tireóide de tartarugas	44
3.2.2.3 - Captação <i>in vitro</i> de metil-D-glicose, em presença de insulina, pela tireóide de tartarugas, aclimatadas a diferentes temperaturas	45

3.2.2.4- Captação <i>in vitro</i> de glicose e aminoácido pela tireóide de ratos normais	46
3.2.2.5- Captação <i>in vitro</i> de glicose e aminoácido pela tireóide de ratos diabéticos por estreptozotocina.....	47
3.3- Análise estatística	47
4. RESULTADOS	49
4.1 -Experimentos realizados em tartarugas	50
4.1.1- Captação de [¹⁴ C]deoxi-D-glicose e [¹⁴ C]ácido α-amino isobutírico pela tireóide de tartaruga.....	50
4.1.2- Efeito da insulina sobre a captação de [¹⁴ C] deoxi-D-glicose e [¹⁴ C] ácido α-amino isobutírico pela tireóide de tartaruga	50
4.1.3- Captação de [¹⁴ C]metil-D-glicose pela tireóide de tartarugas - aclimatadas a 6, 25 e 36 ⁰ C - pré-incubada e incubada na mesma temperatura da respectiva aclimação	58
4.1.4- Captação de [¹⁴ C] metil-D-glicose pela tireóide de tartarugas -aclimatadas a 6, 25 e 36 ⁰ C- pré-incubada e incubada na temperatura de 25 ⁰ C	58
4.1.5- Captação de [¹⁴ C]metil-D-glicose pela tireóide de tartaruga - aclimatadas a 6 ⁰ C- pré-incubada e incubada na mesma temperatura da aclimação por longo período.....	60

4.2- Experimentos realizados em ratos.....	63
4.2.1- Captação de [¹⁴ C]deoxi-D-glicose e [¹⁴ C]ácido α-metil-amino isobutírico pela tireóide de ratos normais.....	63
4.2.2- Efeito da insulina sobre a captação de [¹⁴ C]deoxi-D-glicose e [¹⁴ C]ácido α- metil-amino isobutírico pela tireóide de ratos normais e diabéticos por estreptozotocina.....	68
5. DISCUSSÃO	71
6. CONCLUSÕES.....	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
ANEXO	111

RELAÇÃO DAS FIGURAS E TABELAS

- Figura 1.** Captação de [^{14}C]deoxi-D-glicose pela tireóide de tartaruga, incubada a 25°C por diferentes intervalos de tempo.....51
- Figura 2.** Captação de [^{14}C]ácido α -amino isobutírico pela tireóide de tartaruga incubada à 25°C por diferentes intervalos de tempo.....52
- Figura 3.** Efeito da pré-incubação sobre a ação da insulina na captação de [^{14}C]deoxi-D-glicose pela tireóide de tartaruga.....53
- Figura 4.** Efeito comparativo da insulina na captação de [^{14}C]deoxi-D-glicose e [^{14}C]ácido α - amino isobutírico pela tireóide de tartaruga incubada a 25°C57
- Figura 5.** Captação de [^{14}C]metil-D-glicose pela tireóide de tartarugas -aclimatadas a 6, 25 e 36°C - pré-incubada e incubada na mesma temperatura da respectiva aclimação.....59
- Figura 6.** Captação de [^{14}C]metil-D-glicose pela tireóide de tartarugas -aclimatadas a 6, 25 e 36°C - pré-incubada e incubada a 25°C61
- Figura 7.** Captação de [^{14}C]metil-D-glicose pela tireóide de tartarugas -aclimatadas a 6°C - pré-incubada e incubada na mesma temperatura da aclimação.....62
- Figura 8.** Captação de [^{14}C]deoxi-D-glicose pela tireóide de ratos normais, incubada em ausência ou presença de insulina por diferentes intervalos de tempo.....64

- Figura 9.** Captação de [^{14}C] α -metil-amino isobutírico pela tireóide de ratos normais, incubada em ausência ou presença de insulina por diferentes intervalos de tempo.....65
- Figura 10.** Efeito da insulina sobre a captação de [^{14}C]deoxi-D-glicose pela tireóide de ratos normais e diabéticos por estreptozotocina.....69
- Figura 11.** Efeito da insulina sobre a captação de [^{14}C]ácido α -metil-amino isobutírico pela tireóide de ratos normais e diabéticos por estreptozotocina.....70
- Tabela 1.** Efeito de diferentes concentrações de insulina sobre a captação de [^{14}C]DG pela tireóide de tartaruga incubada a 25 $^{\circ}\text{C}$55
- Tabela 2.** Efeito de diferentes concentrações de insulina sobre a captação de [^{14}C]AIB pela tireóide de tartaruga incubada a 25 $^{\circ}\text{C}$56
- Tabela 3.** Efeito de diferentes concentrações de insulina sobre a captação de [^{14}C]DG pela tireóide de ratos normais.....66
- Tabela 4.** Efeito de diferentes concentrações de insulina sobre a captação de [^{14}C]MeAIB pela tireóide de ratos normais.....67

RESUMO

A insulina, após ligar-se a receptores específicos existentes na membrana plasmática das células-alvo, estimula a captação de glicose e aminoácidos. Receptores de insulina foram identificados em tireóide da tartaruga, tanto *in vivo* como *in vitro*, e em preparações microssomais dessa glândula. É válido admitir que a insulina possa exercer alguma ação direta sobre o metabolismo da glândula tireóide. O presente trabalho teve como objetivo demonstrar, em glândula tireóide *in vitro*, o efeito estimulante da insulina sobre a captação de glicose e de aminoácido, e evidenciar possíveis alterações desses parâmetros metabólicos em ausência ou redução de insulina. Realizaram-se duas séries de experimentos, utilizando respectivamente tartarugas (*Chrysemys dorsalis*) e ratos Wistar (*Rattus norvegicus*). A tireóide, de ambas as espécies, era pré-incubada em Krebs-Ringer-bicarbonato, pH 7,4, com ou sem insulina, e imediatamente incubada igualmente com ou sem insulina mais $[^{14}\text{C}]$ deoxi-D-glicose, $[^{14}\text{C}]$ metil-D-glicose, $[^{14}\text{C}]$ ácido α -amino isobutírico ou $[^{14}\text{C}]$ ácido α -metil-amino isobutírico (0,2 $\mu\text{Ci} / \text{ml}$), em banho metabólico tipo Dubnoff, numa atmosfera de 95 % de O_2 e 5 % de CO_2 . A temperatura do banho era de 25 $^\circ\text{C}$ nos experimentos com tireóide de tartarugas, e de 6, 25 ou 36 $^\circ\text{C}$, em experimentos com tartarugas aclimatadas a diferentes temperaturas; e de 36 $^\circ\text{C}$ nos experimentos com tireóide de ratos. A concentração da insulina bovina utilizada era de 7×10^{-6} M, exceto para o estabelecimento da curva dose-efeito, quando a concentração de insulina variou de 7×10^{-10} a 7×10^{-6} M. Após a incubação, em geral de

180 minutos (tireóide de tartaruga) ou 45 minutos (tireóide de rato), as amostras do tecido tireóideo eram processadas, e media-se a radioatividade no meio interno e no meio de incubação, sendo os resultados expressos pela relação da radioatividade contida no tecido e no meio de incubação: dpm / ml do líquido do tecido por dpm / ml do meio de incubação (T/ M). A insulina estimulou a captação de glicose e aminoácido pela glândula tireóide de tartarugas e de ratos. Esse efeito foi dependente do tempo de incubação e da dose do hormônio. A menor concentração efetiva para induzir o aumento da captação da glicose e do aminoácido foi de 7×10^{-9} M em ambas as espécies. Em tartarugas, a captação basal de glicose não sofre influência da temperatura, enquanto a ação hormonal da insulina depende da temperatura, e mesmo a 6°C , a tireóide destes animais é biologicamente ativa. A tireóide de ratos diabéticos por estreptozotocina capta menos glicose e menos ácido α -metil-amino isobutírico do que a glândula de ratos normais. A partir dos resultados *in vitro*, obtidos em glândula tireóide de tartarugas e de ratos, pode-se concluir que a insulina exerce uma ação direta sobre essa glândula, aumentando a captação de glicose e aminoácido e que, em ausência ou redução do hormônio, esse efeito diminui.

SUMMARY

After binding to specific receptors present in the plasmatic membrane of target cells, insulin stimulates the glucose and amino acid uptake. Receptors have been identified in the thyroid gland of turtles, both *in vivo* and *in vitro*, and in microsomal preparations of this gland. It is reasonable to admit that insulin may exert some direct action on the metabolism of the thyroid gland. The present work was aimed at demonstrating the stimulation effect of the insulin on the glucose and amino acid uptake in the thyroid gland *in vitro*, as well as to make evident possible alterations in these metabolic parameters in the absence or reduction of insulin. Two sets of experiments were carried out using turtles (*Chrysemys dorsibigni*) and Wistar rats (*Rattus norvegicus*). The thyroid gland of both species were preincubated in Krebs-Ringer-bicarbonate buffer, pH 7.4, with or without insulin and, immediately, equally incubated with or without insulin plus [¹⁴C]deoxy-D-glucose, [¹⁴C]methyl -D-glucose, [¹⁴C]α-amino isobutyric acid or [¹⁴C] α-methyl amino isobutyric acid (0.2 μCi / ml) in a Dubnoff incubator under an atmosphere of 95 % of O₂ and 5 % of CO₂. The temperature of the bath was 25 °C and 6, 25 or 36 °C, in the experiments with thyroid from turtles acclimated to different temperatures, and was 36 °C in the experiments with rat thyroid gland. The concentration of bovine insulin used was 7 x 10⁻⁶ M, except for the determination of dose effect curves, in which the insulin concentration ranged from 7 x 10⁻¹⁰ M to 7 x 10⁻⁶ M. After incubation generally 180 minutes (turtle thyroid) or 45 minutes (rat thyroid),

the thyroid tissue samples were processed and the radioactivity of the internal medium and incubation medium was measured, the results being expressed as the ratio of the radioactivity present in the tissue and in the incubation medium: dpm / ml of the tissue liquid per dpm / ml of the incubation medium (T / M). The insulin increased the glucose and amino acid uptake in turtle and rat thyroid glands. This effect was dependent on the incubation time and on the hormone concentration. The lowest effective concentration to induce an increase in glucose and amino acid uptake was 7×10^{-9} M in both species. In turtles, the basal glucose uptake does not suffer temperature influence, whereas the hormonal action of insulin depends on temperature, and even at 6 °C, the turtle thyroid gland is biologically active. The thyroid, from streptozotocin diabetic rats, uptakes less glucose and less α -methyl amino isobutyric acid than the glands from normal rats. From the *in vitro* results obtained in thyroid glands of turtles and rats, it can be concluded that insulin exerts a direct action on this gland, increasing glucose and amino acid uptake, and that, in the absence or reduction of the hormone, this effect decreases.

I - INTRODUÇÃO

A glicose é um nutriente importante para o metabolismo celular. Absorvida pelo intestino ou liberada pelo fígado, a hexose é transportada pelo sangue a todas as células, onde irá servir como fonte de energia e precursora primordial para outros compostos que contêm carbono. Cada tecido tem suas próprias necessidades de glicose (LIENHARD e col., 1992), assim, o respectivo transporte através da membrana celular assume um papel central no metabolismo e na homeostase celular (GOULD e HOLMAN, 1993).

A glicose penetra nas células através de três mecanismos independentes: difusão simples (lento; bidirecional), difusão facilitada -também denominada transporte passivo- (rápido; mediado por proteínas; bidirecional) e transporte ativo (rápido; mediado por proteínas e dependente de energia). Na difusão simples, as moléculas de glicose misturam-se ao acaso, devido a seu movimento térmico, tendendo a igualar suas concentrações nos dois lados da membrana. Na difusão facilitada há necessidade de acoplamento da glicose a um carreador específico ligado à membrana celular sem dependência de energia metabólica. No transporte ativo há mediação da proteína carreadora ligada à membrana, e o fluxo da hexose se dá contra um gradiente de concentração, necessitando do acoplamento obrigatório de um fluxo de cátions para dentro da célula. A difusão facilitada de glicose através da membrana celular é comum a quase todas as células. O transporte ativo, ao contrário, é único para os epitélios absorptivo e

reabsortivo de organismos eucarióticos multicelulares (CARRUTHERS, 1990).

Entende-se por transporte o movimento de moléculas através da membrana em ambas as direções -influxo e efluxo- e, por captação, apenas o influxo. Devido à importância da glicose como substrato energético do metabolismo tem-se estimulado, desde longa data, intensa pesquisa para identificar o mecanismo pelo qual ela entra na célula. A captação de glicose costuma ser avaliada pelo uso da deoxi-D-glicose ou da metil-D-glicose que são seus análogos sintéticos e são transportados pelo mesmo mecanismo da hexose, porém não metabolizados. Essas substâncias costumam ser ligadas a moléculas de carbono ou trítio radioativo e, por não serem metabolizadas, permitem medir a captação isolada da glicose, sem avaliar seu metabolismo na célula. A deoxi-D-glicose é transportada de forma saturável e é fosforilada a deoxi-D-glicose-6-fosfato pelas enzimas no interior das células e a metil-D-glicose não é metabolizada pela célula (MIAN e col., 1979).

Consideráveis evidências experimentais, obtidas nos últimos anos, sugerem que a molécula de glicose entra na célula através de quatro etapas: ocupação do sítio externo do transportador; alteração da conformação do complexo transportador-glicose e subsequente ocupação do sítio interno da célula; liberação da glicose pelo transportador para o citoplasma da célula; e, finalmente, alteração da conformação do transportador desocupado deixando o sítio ligante para

a glicose exposto para a face externa da célula e assim capaz de novamente transportar outra molécula de glicose. Esse transporte de glicose é mediado por uma família de transportadores que são semelhantes em sua estrutura e função. Cada um deles consiste em uma cadeia polipeptídica de cerca de 500 aminoácidos (LIENHARD e col., 1992). Cinco diferentes transportadores já foram identificados e clonados. Cada transportador de glicose está numerado na ordem de sua descoberta e são referidos como GLUT 1-5. Cada um destes GLUTs são encontrados predominantemente em determinados tecidos, por exemplo, GLUT 1 em células epiteliais, na barreira sangue-cérebro, placenta e retina; GLUT 2 no intestino, células beta pancreáticas, fígado e rim; GLUT 3 em células neuronais; GLUT 4 em músculo e tecido adiposo; GLUT 5 em intestino delgado (revisão de BELL e col., 1990, GOULD & HOLMAN, 1993). O GLUT 4 parece ser o único regulado pela insulina e é encontrado exclusivamente em tecidos sensíveis à ação desse hormônio (BIRNBAUM, 1992). Na ausência da insulina, quase todos os transportadores GLUT 4 e, em menor extensão, os GLUT 1, são encontrados no interior de vesículas dentro da célula. A insulina provoca uma rápida translocação dos transportadores de glicose do meio intracelular para a membrana plasmática, resultando em um aumento de 20 a 30 vezes na taxa de captação da glicose (CUSHMAN & WARDZALA, 1980; SMITH e col., 1991; BIRNBAUM, 1992).

Certas células respondem a uma variedade de estímulos externos que alteram a velocidade do transporte da glicose. Em alguns casos, estas respostas são agudas, ocorrendo dentro de segundos da exposição ao estímulo. Em outros, a resposta é lenta, necessitando de muitas horas para sua total expressão. O transporte de glicose em tecido adiposo, músculos cardíaco e esquelético, timócitos e eritrócitos é modulado rapidamente por uma variedade de estímulos, incluindo a insulina (CARRUTHERS, 1990). HAYES e col. (1993) referem estar a ativação do transporte de glicose pela insulina correlacionada com alterações na localização intracelular e atividade catalítica intrínseca dos transportadores de glicose. As células mantêm um número extra de transportadores e movimentam alguns deles em resposta ao estímulo da insulina. Sendo o transportador da glicose uma proteína transmembrana, é possível que ele migre, em forma de vesícula, como uma parte da própria membrana. A insulina, provavelmente, induz as vesículas intracelulares contendo um predomínio de transportadores GLUT 4 a se moverem em direção à membrana plasmática e a ela se fusionarem, acelerando o transporte da glicose. Enquanto a insulina estiver presente, as vesículas continuarão a se fundir na membrana celular, mas uma redução do hormônio leva a uma interrupção do ciclo e os transportadores de glicose se acumulam nas vesículas intracelulares (LIENHARD e col., 1992).

Os aminoácidos, assim como a glicose, são importantes para o metabolismo celular. A captação de aminoácidos neutros em tecidos

animais se faz por diversos tipos de sistemas de transporte. O sistema de transporte de aminoácido é um processo ativo e perfeitamente regulado. Os diversos tipos de transporte têm sido identificados de acordo com suas propriedades cinéticas e suas especificidades. Pelo menos sete sistemas de transporte são conhecidos para os diferentes aminoácidos. O sistema A, ASC, X⁻, e em parte, sistema N^m, são sensíveis à regulação da insulina, enquanto o sistema L é insensível. O sistema A apresenta estereoespecificidade para vários aminoácidos entre os quais alanina, serina, glicina, metionina, ácido metil-amino isobutírico e ácido alfa-amino isobutírico. O sistema ASC transporta alanina, serina e cisteína. O sistema X⁻ transporta cisteína, glutamina e análogos da glutamina. Glicina, histidina e asparagina são transportadas pelo sistema N^m, e o sistema L transporta aminoácidos neutros como leucina, isoleucina, fenilalanina, metionina e ciclo-leucina. Os sistemas A e ASC são dependentes da presença de sódio e são alvo da regulação endócrina (TESSARI, 1994). Células animais adaptam-se a mudanças na disponibilidade de alimentos, regulando a atividade de seus sistemas de transporte (SHOTWELL e col., 1983).

A regulação hormonal do transporte de aminoácidos é de particular importância fisiológica em células eucarióticas. O controle hormonal do transporte de aminoácidos provê um fundamental mecanismo pelo qual o metabolismo protéico e o crescimento celular são regulados. A insulina participa da regulação da síntese protéica e proteólise a níveis molecular e celular (TESSARI, 1994). Assim, seu

efeito estimulante sobre o transporte de aminoácidos tem sido observado em muitas preparações biológicas, incluindo músculos esquelético, liso e cardíaco, tecido ósseo, linfócitos, útero, adipócitos, fibroblastos, fígado perfundido, hepatócitos, glândula adrenal, glândula mamária, retina, pulmão e células epiteliais. O controle da insulina no transporte de aminoácidos é necessário para ajustar o fluxo de nutrientes entre os diferentes tipos de células em cada órgão, bem como entre os diferentes órgãos (GUIDOTTI e col., 1978; SHOTWELL e col., 1983).

Para o estudo do transporte de aminoácidos nas preparações biológicas são amplamente utilizados o ácido amino isobutírico ou o ácido α -metil-amino isobutírico ligados a elementos radioativos (^{14}C , ^3H). Estes aminoácidos não são metabolizados pelas células e parece que se acumulam em seu interior de uma maneira semelhante aos aminoácidos naturais (DEBONS & PITTMAN, 1962, 1966; SEGAL e col., 1966).

Em muitas células e tecidos, o efeito da insulina -mediado, pelo menos em parte, por um mecanismo que envolve síntese protéica- fica reduzido ou abolido na presença de inibidores da própria síntese de proteínas ou da síntese de RNA (ácido ribonucléico) (LE CAM & FREYCHET, 1978). A síntese de proteínas é um processo complexo que envolve transcrição da informação do gene do DNA (ácido desoxirribonucléico) para o RNAm (mensageiro), transporte do RNAm do núcleo para o citoplasma e a associação do RNAm com os

ribossomas para a tradução da base de ligação na seqüência de aminoácidos dos novos peptídeos ou proteína. A insulina estimula a síntese protéica a nível molecular em várias etapas do processo -transcrição do DNA para o RNAm, tradução e estabilidade do RNAm. Promove também um aumento no transporte de aminoácidos, diminui a degradação de proteínas, de ribossomas e de macromoléculas a nível dos lisossomas no fígado, músculo esquelético e músculo cardíaco (TESSARI, 1994).

Além de seu efeito primário sobre a homeostasia da glicose, regulação do transporte de aminoácidos e da síntese protéica, a insulina produz outros efeitos celulares -regulação do transporte de íons, metabolismo lipídico, síntese de glicogênio, transcrição gênica, movimento de RNAm, síntese de DNA. Assim, a ação da insulina desempenha um papel essencial no armazenamento dos alimentos ingeridos, no crescimento normal e na diferenciação da célula (CHEATHAM & KAHN, 1995).

A insulina, como os demais hormônios peptídicos, para produzir seus efeitos nos tecidos-alvo, precisa, primeiramente, ligar-se a receptores específicos existentes na membrana plasmática. Estes receptores são definidos como moléculas capazes de reconhecer a insulina e com ela interagir num alto grau de seletividade e afinidade, e, capazes igualmente de transmitir essa interação a processos bioquímicos celulares como resposta biológica ao hormônio (CUATRECASSAS, 1971; 1972). A estrutura do receptor de insulina

caracteriza-se como glicoproteína tetramérica com duas subunidades alfa -contendo o sítio de ligação ao hormônio- e duas beta -apresentando atividade tirosina-quinase, estimulada pela ligação com a insulina (MASSAGUE e col., 1980; KASUGA e col., 1981). O receptor, após ligação com a insulina, é autofosforilado e ativado, desencadeando uma seqüência de efeitos intracelulares. Recentemente, foi identificado por ROTHENBERG e col. (1991) um substrato endógeno efetor intracelular da insulina, emergente após a ligação desse hormônio a seu respectivo receptor específico, denominado substrato receptor de insulina (IRS-1). Este substrato é uma proteína citosólica encontrada numa grande variedade de tecidos. A ativação do receptor de insulina, em segundos, fosforila o substrato em numerosos resíduos de tirosina. Estudos de CHEATHAM & KAHN (1995) têm identificado proteínas, associadas com o IRS-1, que parecem estar presentes nas etapas de sinalização da insulina, sugerindo que o IRS-1, no interior da célula, desempenha um papel central na rede dos vários sinais para as múltiplas ações da insulina.

A presença de receptores específicos para a insulina foi demonstrada e caracterizada inicialmente em uma grande variedade de tecidos de mamíferos, tanto animais de laboratório -rato, camundongo e cobaia- quanto humanos. Esses estudos foram realizados basicamente em preparações de membrana plasmática de tecidos-alvo clássicos para a ação desse hormônio como o tecido adiposo (CUATRECASSAS, 1971, 1972; KONO & BARHAM, 1971; JEN & OLEFSKY , 1974),

hepatócitos (FREYCHET e col., 1974; OLEFSKY e col., 1975; DE MEYTS e col., 1976), músculo cardíaco (FORGUE & FREYCHET, 1975) e músculo esquelético (LE MARCHAND-BRUSTEL e col., 1978). Mais tarde, foram registrados receptores de insulina também em tecidos não considerados alvo para a ação direta desse hormônio, como placenta humana (LANG e col., 1980), diversas áreas do sistema nervoso central (HAVRANKOVA & ROTH, 1978; PACOLD & BLACKARD, 1979; RAIZADA e col., 1980, 1982, SANVITTO e col., 1988), hipófise (HAVRANKOVA e col., 1978; BELLÓ e col., 1982) e glândulas adrenais (BERGERON e col., 1980; DA SILVA e col., 1984).

Receptores de insulina foram igualmente identificados em tecidos ou células de vertebrados não mamíferos: hepatócitos e eritrócitos de aves (SIMON e col., 1977; GINSBERG e col., 1977), cartilagem de pinto (STUART e col., 1979), músculo esquelético de rã (POSNER e col., 1974), e eritrócitos de rã e de peixe (MUGGEO e col., 1979). Os receptores de insulina em vertebrados inferiores, segundo estes últimos autores, são muito similares aos de aves e mamíferos, parecendo que os receptores de insulina, no decorrer da evolução, foram mais conservados do que a própria molécula do hormônio, que pode apresentar algumas ou várias substituições de aminoácidos conforme a espécie (revisão de EPPLE & BRINN, 1987).

Buscando completar os estudos comparativos sobre a presença de receptores de insulina na escala evolutiva, MARQUES e col. (1982)

utilizaram tartaruga como representante dos répteis para avaliar a distribuição e captação específica da [125 I]iodoinsulina, empregando a técnica *in vivo* descrita por GAGLIARDINO e col., (1980). Foram, então, identificados sítios receptores específicos para a insulina no fígado e tecido adiposo, bem como na hipófise e nas adrenais e posteriormente em glândula tireóide (MARQUES e col., 1982; 1984). Experimentos complementares avaliaram *in vitro* a captação específica da insulina, sua dissociação e degradação em tireóides de tartaruga, confirmando a presença de receptores de insulina nessa glândula. E observaram ainda que, na tireóide de tartaruga, incubada em presença de insulina a 6 °C, cerca de 50 % da radioatividade contida na glândula era insulina degradada, o que sugere ser a tireóide desse animal a 6 °C biologicamente ativa (MARQUES e col., 1985). Este fenômeno observado foi surpreendente, pois, em tecido adiposo de rato, incubado nessas mesmas condições experimentais, não ocorrera a degradação da insulina subsequente à internalização do complexo hormônio-receptor, uma vez que a endocitose é inibida à baixa temperatura (OLEFSKY e col., 1982). Considerando, entretanto, que a tartaruga, animal heterotérmico, adapta seu metabolismo a diferentes temperaturas, esses resultados sobre a degradação da insulina ligada a seus receptores específicos na glândula tireóide a 6 °C poderiam ser esperados. Estudos posteriores em preparações de membrana da tireóide de tartarugas determinaram as características da ligação insulina-receptor, identificando sítios de baixa e de alta afinidade ao hormônio (TURYN

e col., 1986), como ocorre no fígado e tecido adiposo de rato (DE MEYTS & ROTH, 1975; DE MEYTS e col., 1976).

A tireóide é uma glândula endócrina presente em todos os vertebrados e tem como unidade anátomo-funcional o folículo tireóideo. Os hormônios tireoideanos -tiroxina (T_4) e tri-iodotironina (T_3)- são estimuladores gerais que afetam virtualmente todos os tecidos do organismo. Além da produção de calor (termogênese) e do consumo de oxigênio (metabolismo basal), produzem efeitos no metabolismo das proteínas, dos lipídios, dos hidratos de carbono, dos ácidos nucléicos, das vitaminas e de íons inorgânicos (funções metabólicas) e são essenciais para o crescimento e desenvolvimento normais e para a maturação e funcionamento do sistema nervoso central (funções morfogênicas). A tiroxina e a tri-iodotironina circulantes vão atuar na hipófise e nos neurônios hipotalâmicos controlando por retroalimentação negativa a secreção do hormônio estimulante da tireóide ou tireotrofina (TSH), glicoproteína sintetizada pela adenohipófise com sua síntese e liberação controladas pelo hormônio hipotalâmico liberador da tireotrofina (TRH). O TSH é o principal regulador do funcionamento da tireóide, estimulando todas as etapas de biossíntese dos hormônios, incluindo transporte de iodeto, organificação, síntese de tireoglobulina, acoplamento, endocitose e proteólise da tireoglobulina (LARSEN & INGBAR, 1992).

Admite-se a existência de outros mecanismos de regulação da produção de hormônios da glândula tireóide, além do clássico e bem

conhecido eixo hipotálamo-hipófise-tireóide. Há uma regulação hormonal complexa da biossíntese dos hormônios tireoidianos realizada por cortisol, insulina ou IGFs I e II (fatores de crescimento semelhantes à própria insulina) que dependem primariamente da estimulação do TSH. O cortisol potencia o efeito do TSH controlando a função e o crescimento da tireóide (BECKS e col., 1992). Os IGFs sinergizam com o TSH ao estimular todas as etapas da síntese dos hormônios da glândula tireóide (WANG e col., 1994). Tal regulação pode estar envolvendo um mecanismo local autócrino ou parácrino no interior do microambiente da tireóide (BECKS e col., 1992). A presença de receptores de IGF I em células foliculares na tireóide humana associada à capacidade de secretarem estas células IGF I leva à conclusão de que o IGF I provavelmente regule a função da tireóide através de mecanismos autócrinos (TODE e col., 1989).

A influência da insulina sobre a função da tireóide é reconhecida desde longa data, admitia-se, porém, que seu efeito sobre o metabolismo tireóideo era indireto, isto é, resultante de uma ação provavelmente mediada pelo eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (LEUNG e col., 1975; GUANSING e col., 1975; BLUM e col., 1977 e BROWN e col., 1976). É surpreendente que nesses trabalhos não tenham sido considerados os dados já publicados em 1960 por FIELD que havia observado aumento pela insulina *in vitro* da captação de glicose por fatias de tireóide bovina, e, em 1965, por SINGH e col. demonstrando ser a síntese de proteínas e de ácido ribonucléico pela

glândula tireóide de fetos de ratos em cultura estimulada em presença de insulina; e, ainda, em 1978 por BRISSON-LOUGARRE e col. comprovando o fato de a insulina aumentar a síntese protéica em tireóide de cão *in vitro*.

Essas comprovações experimentais, indicando a existência de uma ação direta da insulina sobre o metabolismo da tireóide, podem explicar a ocorrência de várias anormalidades da função tireoidiana descritas em manifestações de diabetes mellitus. Tem sido demonstrada a freqüente ocorrência de hipotireoidismo clínico e subclínico em diabéticos dependentes de insulina (GRAY e col., 1980). Diabetes experimental em ratos está também associada ao decréscimo das funções basais da glândula tireóide e da resposta ao estímulo do TSH (SERIF & SIHOTANG, 1962; JOLÍN & GONZÁLEZ, 1978). O tratamento com insulina corrige, em grande parte, esta disfunção em camundongos diabéticos por estreptozotocina (BAGCHI, 1981). Ratos diabéticos por aloxano mostraram uma redução de cerca de 41 % da secreção de tiroxina, tendo a administração de insulina a esses animais corrigido essa diferença (KUMARESAN & TURNER, 1966). Igualmente foi encontrada redução significativa da atividade da enzima tireo-peroxidase em ratos diabéticos por estreptozotocina, não sendo este, porém, um efeito direto da droga sobre a tireóide, já que, em animais diabéticos com reposição de insulina, a atividade da enzima foi semelhante à encontrada nos animais-controle (MOURA e col., 1986). Além disso, a diabetes mellitus altera a função dos hormônios

tireoidianos, interferindo na sua biossíntese, bem como na sua produção periférica, pela desiodação da tiroxina, conduzindo, assim, a um estado de hipotireoidismo (SCHRÖDER-VAN DER ELTS & VAN DER HEIDE, 1992).

Apesar das referidas disfunções da tireóide em diabéticos ou em ratos com diabete induzida experimentalmente e dos primeiros registros (década de 60) indicando a ação estimulante da insulina sobre a captação de glicose por fatias de tireóide bovina *in vitro* e sobre a síntese protéica em tireóide de feto de rato, o papel fisiológico da insulina sobre a atividade dessa glândula não está esclarecido.

A demonstração da presença de receptores de insulina na tireóide de tartaruga e a evidência de atividade biológica desta glândula, à baixa temperatura -característica não encontrada em ratos- sugerem a seleção da tartaruga, animal heterotérmico, como modelo biológico adequado à investigação do efeito da insulina sobre a tireóide e a influência da temperatura sobre este efeito. E diante da ampla demonstração de que a insulina estimula o transporte de glicose e aminoácido nos tecidos clássicos para esse hormônio, considerou-se oportuno, neste trabalho, avaliar o efeito da insulina sobre a captação *in vitro* de [¹⁴C]metil-D-glicose por tireóide de tartarugas *Chrysemys dorbigni*, aclimatadas a diferentes temperaturas. Entende-se por aclimação o processo em que o animal está respondendo a uma única e bem definida variável ambiental térmica no interior de um laboratório e por aclimatização quando as respostas surgem devido a

flutuações sazonais de temperatura dentro do seu próprio ecossistema natural (HAZEL & PROSSER, 1974).

Para comprovar, entretanto, a importância do papel fisiológico da insulina sobre a função da tireóide, torna-se imprescindível demonstrar que o fenômeno em estudo -captação de glicose e aminoácido- fica prejudicado na ausência ou redução do hormônio, ou seja, em tartarugas com diabetes induzida experimentalmente.

A metodologia mais utilizada para a indução de diabetes em animais consiste na administração de drogas que possuem ação citotóxica específica sobre as células beta das ilhotas de Langerhans, como aloxano (DUNN e col., 1943) e estreptozotocina (JUNOD e col., 1967). Ocorrem, entretanto, limitações. O aloxano, quando injetado em tartarugas, produz hiperglicemia de curta duração, seguida de hipoglicemia por vários dias, com recuperação aos valores iniciais ou levemente acima da glicemia normal (LOPES, 1955). A tartaruga oferece muita resistência à ação diabetogênica da estreptozotocina. Em estudo de MUNIZ & MARQUES (1989) somente 14 % dos animais injetados com essa droga apresentaram manifestações de diabetes. Esta baixa incidência poderia decorrer da pouca sensibilidade à droga diabetogênica, característica da própria espécie, ou da baixa taxa metabólica e lentidão da circulação sanguínea nesses animais, tornando ineficaz este fármaco. É sabido que a estreptozotocina é rapidamente inativada em pH acima de 4,5 e sua meia vida está estimada em 5 minutos no camundongo (RERUP, 1970). Restaria como alternativa

induzir a diabete por extirpação total do pâncreas, o que na *Chrysemys dorbigni* é bastante traumático devido às relações anatômicas do pâncreas e colédoco, e à alta taxa de mortalidade (FOGLIA e col., 1955). A pancreatectomia total excluiria também a ação de outros hormônios pancreáticos e de enzimas digestivas. O grande número de tartarugas necessário seria incompatível com a autorização do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

Considerando essas dificuldades e limitações, optou-se por utilizar, numa segunda série de experimentos, para verificar os efeitos da ausência ou redução da insulina sobre o transporte de glicose e aminoácido, a tireóide de ratos diabéticos por estreptozotocina como modelo biológico.

2 - OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

Demonstrar a ação direta da insulina sobre a captação de glicose e aminoácido pela glândula tireóide de dois modelos experimentais -a tartaruga e o rato.

2.2- Objetivos específicos

- Determinar a captação *in vitro* de [^{14}C] deoxi-D-glicose e [^{14}C] ácido α -amino isobutírico em presença de insulina pela tireóide de tartarugas *Chrysemys dorbigni*, em distintas condições experimentais;

- Determinar a captação *in vitro* de [^{14}C]metil-D-glicose, em presença de insulina, pela tireóide de tartarugas *Chrysemys dorbigni* aclimatadas a diferentes temperaturas;

- Determinar a captação *in vitro* de [^{14}C] deoxi-D-glicose e [^{14}C] ácido α -metil-amino isobutírico pela tireóide de ratos em distintas condições experimentais;

• Determinar a captação *in vitro* de [^{14}C] deoxi-D-glicose e [^{14}C] ácido α -metil-amino isobutírico, em presença de insulina pela tireóide de ratos normais;

• Determinar a captação *in vitro* de [^{14}C] deoxi-D-glicose e e [^{14}C] ácido α -metil-amino isobutírico em tireóide de ratos diabéticos por estreptozotocina, e os efeitos da insulina adicionada *in vitro*.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1- MATERIAL

3.1.1- Reagentes

Insulina cristalina bovina adquirida da Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO) para os experimentos realizados com tartarugas e, gentilmente oferecida pela Biobrás Bioquímica do Brasil, S/A, para os experimentos realizados com ratos. Estreptozotocina (STZ) procedente da Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO). Substâncias radioativas importadas da Dupont, NEN Produtos (Boston, Ma): 2-[1-¹⁴C]deoxi-D-glicose (atividade específica: 2,1 Gbq/mmol, [¹⁴C]DG); 3-0-[(U)-¹⁴C]metil-D-glicose (atividade específica: 12,0 Gbq/mmol, [¹⁴C]MG); α -[1-¹⁴C]ácido amino isobutírico (atividade específica: 1,9 GBq/mmol, [¹⁴C]AIB); α -[1-¹⁴C]ácido metil-amino isobutírico (atividade específica: 1,8 GBq/mmol, [¹⁴C]MeAIB). Kit glicose enzima color da Biodiagnóstica e tiras reagentes Dextrostix da Bayer Diagnóstica. Os demais reagentes foram adquiridos no país, sendo todos de alta qualidade e de alto grau de pureza.

3.1.2- Animais

Uma série de experimentos foi realizada em tartarugas e outra série em ratos normais e diabéticos por estreptozotocina.

Tartarugas da espécie *Chrysemys dorsalis*, adultas, fêmeas, pesando entre 1,2 a 1,8 kg coletadas da população nativa do Estado do

Rio Grande do Sul. Coleta e utilização dos animais autorizadas pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), conforme licenças de números 101/90, 138/91, 061/93 e 031/95 DEVIS.

Ratos da espécie *Rattus norvegicus* da cepa Wistar, adultos, machos, pesando entre 150-200 g, provenientes do Biotério Central do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.2- PROCEDIMENTOS

3.2.1- Período pré-experimental

Após coletadas, as tartarugas eram mantidas por um período mínimo de 30 dias em tanque com fluxo contínuo de água, contendo área central com terra seca à temperatura ambiente. Eram alimentadas com carne fresca *ad libitum*. Vinte quatro horas antes da realização dos experimentos, os animais eram levados ao laboratório e mantidos sem oferta de alimento em ambiente com temperatura controlada em torno de 24°C. Em alguns experimentos, os animais foram aclimatados por um período de 15 dias a diferentes temperaturas: 6°C (em uma câmara fria), 25°C (em laboratório com condicionador de ar) e 36°C (no interior de uma estufa). Estas tartarugas eram retiradas destes locais no momento da realização do experimento. Mortalidade de 40 % ocorreu somente no grupo de animais aclimatados à 36°C. Os experimentos foram realizados nos meses de verão.

Os ratos eram mantidos em gaiolas de plástico, com serragem no fundo, colocadas em sala com temperatura controlada (18-22 °C) e com ciclo normal de claro e escuro. Todos os animais receberam dieta comum do Biotério e água *ad libitum*, sendo colocados em jejum por uma noite (15 horas) antes da realização dos experimentos. Alguns experimentos foram realizados em tireóide de ratos com diabete induzida pela estreptozotocina. Ratos em jejum de 24 horas recebiam injeção intra-peritoneal de estreptozotocina (65 mg / kg de peso corporal), dissolvida imediatamente antes do uso em tampão citrato 0,1M (citrato de sódio / ácido cítrico; 1:1), pH 4,0. O grupo controle recebeu a injeção intra-peritoneal de igual volume do tampão citrato. Somente ratos com glicemia acima de 250 mg / dl após 5 dias da injeção de estreptozotocina foram utilizados nos experimentos. Amostras de sangue eram retiradas no momento da decapitação do animal, sendo uma gota do sangue testada imediatamente com o uso de tiras reagentes Dextrostix para identificar dentre os animais injetados com estreptozotocina aqueles que apresentavam acentuada hiperglicemia (acima de 250 mg / dl). Amostras adicionais de sangue eram retiradas para posterior análise quantitativa da glicemia através de método mais preciso como o método de glicose oxidase.

3.2.2- Período experimental

3.2.2.1- Medida *in vitro* da captação de glicose e aminoácido pela tireóide de tartarugas e ratos

As tartarugas, previamente pesadas, eram anestesiadas com pentobarbital sódico (25 mg / kg de peso corporal). Abria-se na região ventral da carapaça, com auxílio de uma serra elétrica, um retângulo de aproximadamente 6 x 7 cm, o qual, ao ser retirado, deixava exposta a glândula tireóide. Os ratos eram sacrificados com o auxílio de uma guilhotina. As tireóides de ambas as espécies eram então removidas e colocadas em placas de Petry apoiadas sobre gelo picado, num recipiente de isopor, para conservá-las à baixa temperatura. No interior da placa, era colocado papel de filtro, com repartições numeradas a lápis, umedecido com solução-tampão Krebs-Ringer-bicarbonato (KRb) gelado (NaCl 120 mM; KCl 4,75 mM; CaCl₂ 2 H₂O 2,5 mM; KH₂PO₄ 1,2 mM; MgSO₄.7 H₂O 1,2 mM; NaHCO₃ 25 mM) e pH ajustado a 7,4.

Insulina cristalina (1 mg), equivalente a 25 U.I., era previamente dissolvida em 100 µl de HCl 0,06 N e após diluída com 400 µl de água destilada. Adicionavam-se 20 µl desta solução aos frascos para incubação com insulina, obtendo-se a concentração final do hormônio de 1,0 U.I./ ml (7×10^{-6} M). Em alguns experimentos, utilizaram-se concentrações de insulina de 7×10^{-10} a 7×10^{-6} M.

Todos os experimentos com tartarugas ou ratos eram realizados no mesmo local do laboratório, sempre no período da manhã entre 9 e

12h. As tireóides das tartarugas com peso médio de 215 mg eram cortadas em quatro partes com pesos aproximados de 40 mg cada. As tireóides dos ratos, pesando cerca de 10 mg, eram separadas em seus dois lobos (direito e esquerdo), sendo um utilizado como controle e o outro contra-lateral para avaliar o efeito da insulina. Fazia-se um pequeno corte longitudinal na cápsula da glândula com o auxílio de uma lâmina. As amostras da glândula tireóide de tartaruga ou de rato eram, então, rapidamente pesadas e colocadas em frascos de plástico com capacidade de 5 ml em presença de 1 ml de tampão KRb, pH 7,4, com ou sem insulina, e pré-incubadas num incubador metabólico Dubnoff à temperatura de 25 °C (tartarugas) ou 6 e 36°C em alguns experimentos com tartarugas aclimatadas e de 36-37 °C (ratos), com gaseificação constante de uma mistura de carbogênio O₂: CO₂ (95/5 %, v/v). Essa incubação prévia em KRb com ou sem insulina constituiu o período de pré-incubação que era de 60 minutos nos experimentos com tireóides de tartaruga e de 90 minutos nos realizados com a glândula de rato. Findo esse período, as amostras eram colocadas em outra série de tubos plásticos com a mesma numeração, contendo 1 ml de tampão KRb com ou sem insulina, acrescido de 0,2 µCi da glicose ou aminoácido marcado com [¹⁴C] e incubadas por diferentes intervalos de tempo (de acordo com a espécie animal ou com o tipo de experimento) nas mesmas condições da pré-incubação quanto à temperatura e à concentração de insulina.

Após a incubação, as amostras eram rapidamente removidas do meio de incubação, passadas em papel de filtro umedecido com tampão KRb gelado, com o objetivo de interromper o transporte e remover o excesso da radioatividade adsorvida ao tecido, sendo imediatamente colocadas em tubos de ensaio pirex, com tampa, contendo 1 ml de água destilada. Estes frascos eram congelados, posteriormente fervidos por 15 minutos, novamente congelados e fervidos, com o objetivo de romper a estrutura do tecido, liberando a substância radioativa captada pela glândula. Com este procedimento, obtinha-se o conteúdo do meio interno. A solução tampão em que fora incubado o tecido constituía o meio externo.

Alíquotas de 25 μ l (experimentos com tartarugas) ou de 500 μ l (experimentos com ratos) eram então retiradas tanto do meio interno como do meio externo e colocadas em viales especiais, numerados, para a contagem da radioatividade. O volume da alíquota utilizada para os experimentos com ratos aumentou em função do menor peso da glândula em comparação com a tireóide da tartaruga. Os viales continham 5 ml do líquido de cintilação (liquefluor; triton; toluol: 63:500:1000 ml respectivamente) e eram levados a um contador LKB-Rack Beta com 97 % de eficiência, para a contagem da radioatividade. Os resultados foram expressos pela relação da radioatividade contida no tecido e no meio de incubação (T / M): dpm/ml do líquido do tecido por dpm/ml do meio de incubação (média \pm erro-padrão da média). O número de amostras do tecido tireóideo utilizado em cada

experimento está indicado nas Figuras ou Tabelas. Essas amostras de tireóide eram sempre provenientes de 3 a 4 animais, no mínimo, tanto nos experimentos em tartarugas como em ratos.

3.2 2.2 - Captação *in vitro* de glicose e aminoácido pela tireóide de tartaruga

Para avaliar a captação nas distintas condições experimentais, foram realizados os seguintes procedimentos:

Influência do tempo de incubação -O tecido da tireóide de tartaruga foi incubado em KRb na presença de [^{14}C]DG por 60, 120, 240, 360 ou 420 minutos ou de [^{14}C]AIB por 60, 120, 180, 240 ou 300 minutos.

Presença de insulina na pré-incubação e/ou incubação -O tecido da tireóide foi previamente incubado por 60 minutos, em presença ou ausência de insulina ($7 \times 10^{-6} \text{ M}$) e incubado por 240 minutos, com ou sem idêntica concentração de insulina mais 0,2 μCi de [^{14}C]DG. E foi também adicionada a insulina somente no período de pré-incubação ou somente no período de incubação.

Presença de diferentes concentrações de insulina -O tecido da tireóide de tartaruga foi pré-incubado em KRb por 60 minutos com diferentes concentrações de insulina (7×10^{-10} a $7 \times 10^{-6} \text{ M}$) e incubado por 240 minutos com as mesmas concentrações do hormônio juntamente com [^{14}C]DG. Para os estudos da captação de [^{14}C]MeAIB, amostras da

glândula foram pré-incubadas por 90 minutos, em presença ou ausência de concentrações crescentes de insulina (7×10^{-10} a 7×10^{-6} M), e incubadas por 210 minutos com as respectivas concentrações do hormônio mais o aminoácido marcado com [14 C].

3.2.2.3- Captação *in vitro* de metil-D-glicose em presença de insulina pela tireóide de tartarugas, aclimatadas a diferentes temperaturas

As diferentes temperaturas foram empregadas conforme os seguintes procedimentos:

Captação da metil-D-glicose in vitro na mesma temperatura da aclimação da tartaruga - Neste experimento, utilizaram-se tireóide de tartarugas aclimatadas a 6, 25 ou 36 °C, cujas amostras da glândula foram pré-incubadas por 60 minutos na presença ou ausência de insulina (7×10^{-6} M), e incubadas por 180 minutos com ou sem insulina mais 0,2 μ Ci de [14 C]MG na mesma temperatura em que foram aclimatadas.

Captação de metil-D-glicose a 25 °C em tireóide de tartarugas aclimatadas a 6, 25 ou 36 °C - Das tartarugas aclimatadas a 6, 25 ou 36 °C foram retiradas amostras da glândula tireóide e imediatamente pré-incubadas por 60 minutos a 25 °C, com ou sem insulina

(7×10^{-6} M), e incubadas por 180 minutos em presença ou ausência de insulina mais 0,2 μ Ci de [14 C]MG a essa mesma temperatura (25 °C).

Captação de metil-D-glicose a 6 °C pela tireóide de tartaruga aclimatada a essa temperatura e incubada por tempo prolongado -O tecido tireóideo das tartarugas aclimatadas a 6 °C foi pré-incubado por 300 minutos com ou sem insulina a 6 °C, e incubado por mais 300 minutos com ou sem o hormônio mais 0,2 μ Ci de [14 C]MG, a essa mesma temperatura.

3.2.2.4- Captação *in vitro* de glicose e aminoácido pela tireóide de ratos normais

Para determinação das respectivas condições experimentais, foram realizados os seguintes procedimentos:

Influência do tempo de incubação -Lobos direito e esquerdo da tireóide de ratos normais foram pré-incubados respectivamente com ou sem insulina (7×10^{-6} M) por 90 minutos, e incubados com [14 C]DG ou [14 C]MeAIB em presença ou ausência do hormônio, por diferentes intervalos de tempo -15, 30, 45 e 60 minutos para a deoxi-D-glicose e 15, 45, 90 e 180 para o ácido α -metil-amino isobutírico.

Presença de diferentes concentrações de insulina -Lobos direito e esquerdo da tireóide de ratos normais foram pré-incubados sem insulina ou com diferentes concentrações do hormônio: 7×10^{-10} , 7×10^{-9} ,

7×10^{-8} , 7×10^{-7} e 7×10^{-6} M por 90 minutos, e incubados por mais 45 minutos na presença de [^{14}C]DG ou de [^{14}C]MeAIB juntamente com a mesma concentração do hormônio do período da pré-incubação.

3.2.2.5- Captação *in vitro* de glicose e aminoácido pela tireóide de ratos diabéticos por estreptozotocina

Presença de insulina na pré-incubação e na incubação -O tecido tireóideo dos ratos normais (grupo-controle) e diabéticos era pré-incubado com ou sem insulina (7×10^{-6} M) por 90 minutos e incubado por 45 minutos com igual concentração do hormônio mais 0,2 μCi de [^{14}C] DG ou de [^{14}C]MeAIB.

3.3- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram expressos como médias \pm erro-padrão da média de (n) valores.

A comparação entre os grupos foi realizada em amostras não pareadas adotando-se o teste t de Student (Figuras 3 -lado esquerdo, 4, 7, 8 e 9). Valores com p menores que 0,05 foram considerados significativos. Os demais dados foram analisados pelo teste de análise

de variância em uma via (ANOVA) e testados *post hoc* com o teste de comparação de Duncan (NIE e col., 1975) com $p < 0,05$.

4 - RESULTADOS

4.1- Experimentos realizados em tartarugas

4.1.1- Captação de [¹⁴C]deoxi-D-glicose e [¹⁴C]ácido α-amino-isobutírico pela tireóide de tartaruga

A captação de [¹⁴C]DG pela glândula tireóide da tartaruga incubada em KRb a 25 °C aumentou progressivamente das 2 às 7 horas. Diferenças estatisticamente significativas -com relação à captação verificada aos 60 minutos- ocorreram a partir dos 240 minutos, embora apreciável aumento já se tenha observado aos 120 minutos (Figura 1). A captação de [¹⁴C]AIB pela tireóide aumentou, em função do tempo de incubação, somente a partir dos 180 minutos. Aos 120 minutos, não houve qualquer acréscimo na captação de [¹⁴C]AIB (Figura 2).

4.1.2- Efeito da insulina sobre a captação de [¹⁴C]deoxi-D-glicose e [¹⁴C]ácido α-amino isobutírico pela tireóide de tartaruga

Em glândula tireóide não pré-incubada, a adição de insulina (7×10^{-6} M) no meio de incubação, contendo 0,2 μCi de [¹⁴C]DG, não modificou a captação desse substrato (Figura 3). A pré-incubação da tireóide em KRb, sem insulina durante 60 minutos, seguida da incubação com o hormônio e [¹⁴C]DG, produziu pequeno aumento na relação T / M, embora não estatisticamente significativo. Entretanto,

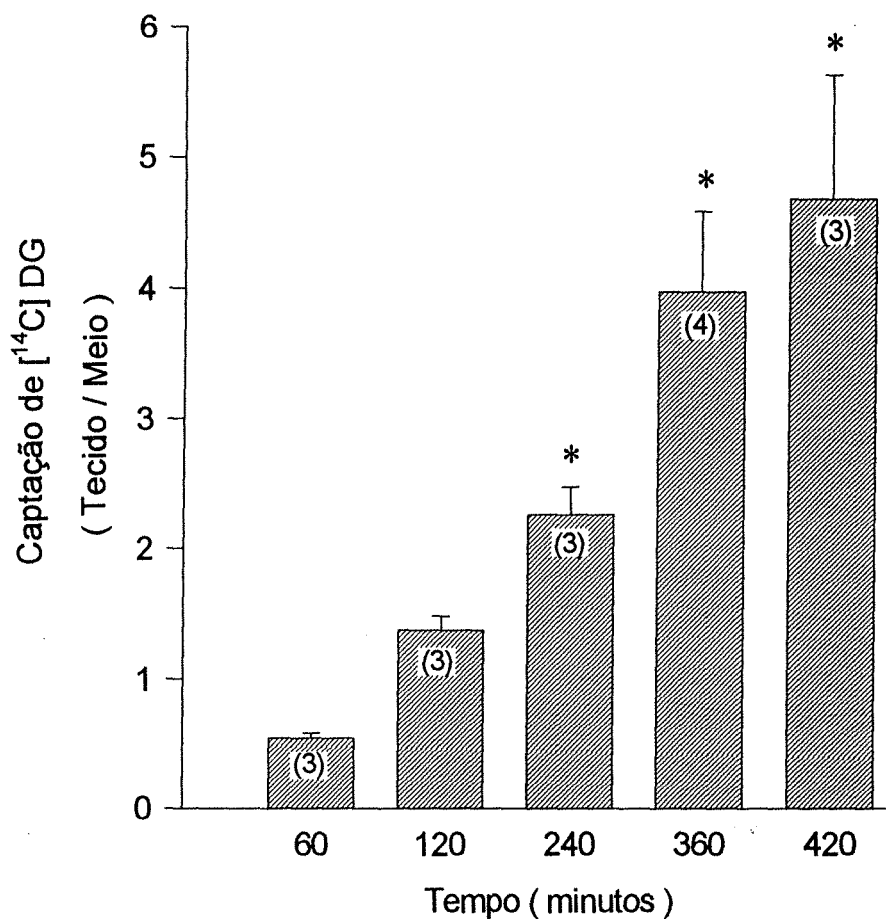


Figura 1. Captação de $[^{14}\text{C}]$ deoxi-D-glicose pela tireóide de tartaruga incubada a 25°C por diferentes intervalos de tempo

Tecido / Meio: dpm / ml de líquido de tecido por dpm / ml do meio de incubação

Resultados: média \pm erro-padrão da média

() número de amostras

* Diferença significativa em relação aos 60 minutos, $p < 0,05$, teste de análise de variância em uma via (ANOVA) e teste de comparação de Duncan

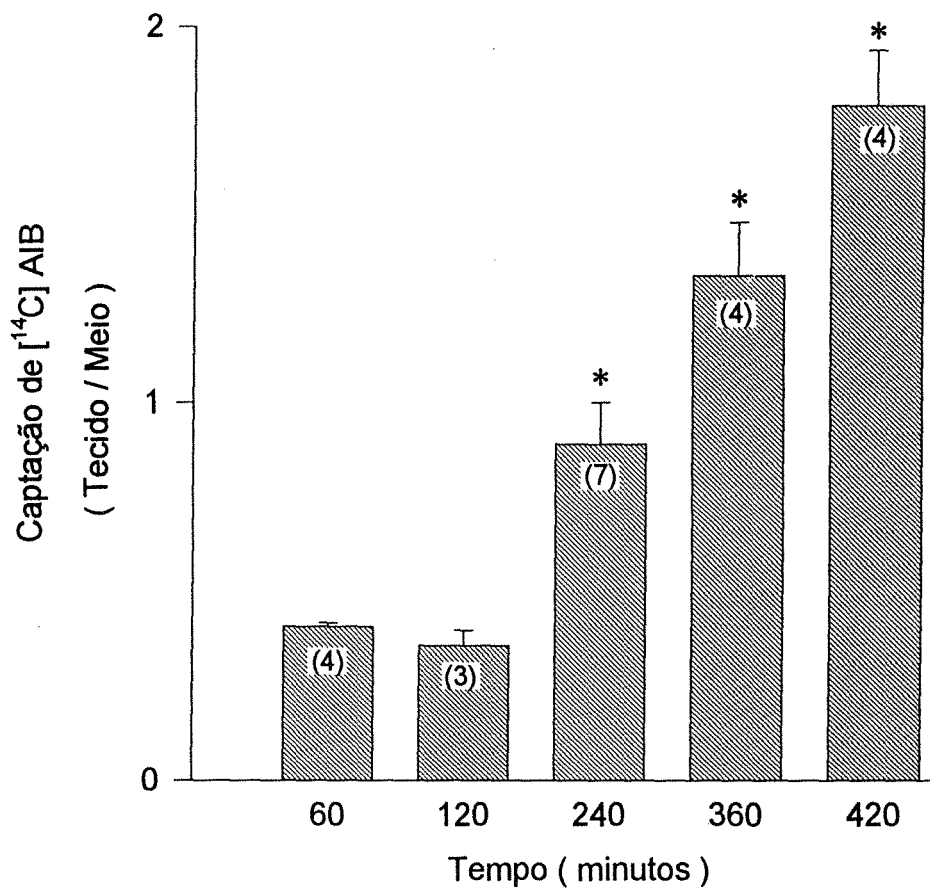


Figura 2. Captação de $[^{14}\text{C}]\alpha$ -amino isobutírico pela tireóide de tartaruga incubada a 25°C por diferentes intervalos de tempo

Tecido / Meio: dpm / ml de líquido de tecido por dpm / ml do meio de incubação

Resultados: média \pm erro-padrão da média

() número de amostras

* Diferença significativa em relação aos 60 minutos, $p < 0,05$, teste de análise de variância em uma via (ANOVA) e teste de comparação de Duncan

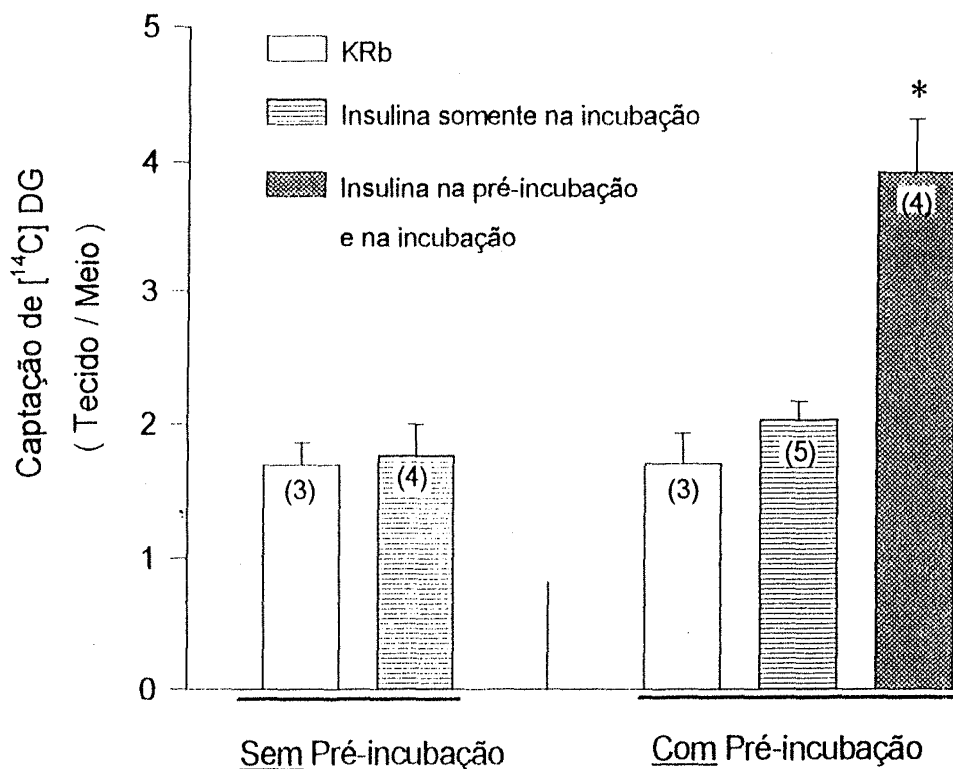


Figura 3. Efeito da pré-incubação sobre a ação da insulina na captação de $[^{14}\text{C}]$ deoxi-D-glicose pela tireóide de tartaruga

Tireóide incubada a 25°C em KRb sem ou com insulina mais $0,2 \mu\text{Ci} / \text{ml}$ de $[^{14}\text{C}]$ DG

Pré-incubação (60 minutos) e incubação (240 minutos)

Tecido / Meio: dpm / ml de líquido de tecido por dpm / ml do meio de incubação

Resultados: média \pm erro-padrão da média

() número de amostras

Nenhuma diferença significativa sem a pré-incubação (Teste t de Student, lado esquerdo)

* Diferença significativa em relação ao controle e do tecido pré-incubado sem insulina $p < 0,05$, teste de análise de variância em uma via (ANOVA) e teste de comparação de Duncan

quando a insulina estava presente no período de pré-incubação (60 minutos) e no meio de incubação (240 minutos), a captação de [^{14}C]DG pela tireóide aumentou acentuadamente ($p < 0,05$). Na Tabela 1, estão apresentados os valores de T / M obtidos nas tireóides incubadas com concentrações crescentes de insulina. A menor dose do hormônio que produziu um aumento significativo sobre a captação de [^{14}C]DG foi de 7×10^{-9} M. Menor concentração do hormônio - 7×10^{-10} M- aumentou a captação em torno de 14 %, porém estatisticamente não significativo.

A Tabela 2 apresenta os efeitos de diferentes concentrações de insulina sobre o transporte de [^{14}C]AIB pela tireóide da tartaruga. A menor dose que aumentou significativamente o transporte do aminoácido foi igualmente de 7×10^{-9} M. Uma concentração menor de insulina (7×10^{-10} M) induziu um aumento de 13 % sobre a captação de [^{14}C]AIB, percentual estatisticamente não significativo.

A comparação do efeito da insulina (7×10^{-6} M) sobre o transporte de glicose e de aminoácido pela tireóide da tartaruga está ilustrada na Figura 4. Apesar das diferenças na captação de ambos os substratos pelas glândulas-controle (sem insulina), a presença do hormônio no meio de pré-incubação e de incubação induziu similares aumentos na captação de [^{14}C]DG (72 %) e de [^{14}C]AIB (96 %).

Tabela 1: Efeito de diferentes concentrações de insulina sobre a captação de [¹⁴C]DG pela tireóide de tartaruga incubada a 25°C

Insulina (mol)	Número de amostras	Captação de [¹⁴ C]DG (Tecido / Meio)	Aumento percentual em relação à tireóide sem insulina
Zero	8	^a 2,71 ± 0,20	-
7 x 10 ⁻¹⁰	3	3,09 ± 0,06	14
7 x 10 ⁻⁹	4	4,01 ± 0,64*	48
7 x 10 ⁻⁸	3	4,22 ± 0,48*	56
7 x 10 ⁻⁷	4	4,25 ± 0,56*	57
7 x 10 ⁻⁶	9	4,26 ± 0,17*	57

Pré-incubação (60 minutos) sem ou com diferentes concentrações de insulina e incubação (240 minutos) na presença da mesma concentração do hormônio mais [¹⁴C]DG (0,2 µCi / ml)

^a Média ± erro-padrão da média

Tecido / Meio: dpm / ml de líquido de tecido por dpm / ml do meio de incubação

* Diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação à tireóide incubada sem insulina (análise de variância de uma via ANOVA e teste de comparação de Duncan)

Tabela 2: Efeito de diferentes concentrações de insulina sobre a captação de [¹⁴C]AIB pela tireóide de tartaruga incubada a 25°C

Insulina (mol)	Número de amostras	Captação de [¹⁴ C]AIB (Tecido / Meio)	Aumento percentual em relação à tireóide sem insulina
Zero	9	^a 0,58 ± 0,06	-
7 x 10 ⁻¹⁰	4	0,66 ± 0,02	13
7 x 10 ⁻⁹	3	1,04 ± 0,04*	79
7 x 10 ⁻⁸	4	0,93 ± 0,17*	60
7 x 10 ⁻⁷	3	1,11 ± 0,05*	91
7 x 10 ⁻⁶	4	1,26 ± 0,11*	117

Pré-incubação (90 minutos) com ou sem diferentes concentrações de insulina, e incubação (210 minutos) na presença da mesma concentração do hormônio mais [¹⁴C]AIB (0,2 µCi / ml)

^a Média ± erro-padrão da média

Tecido / Meio: dpm / ml de líquido de tecido por dpm / ml do meio de incubação

* Diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação à tireóide incubada sem insulina (análise de variância de uma via ANOVA e teste de comparação de Duncan)

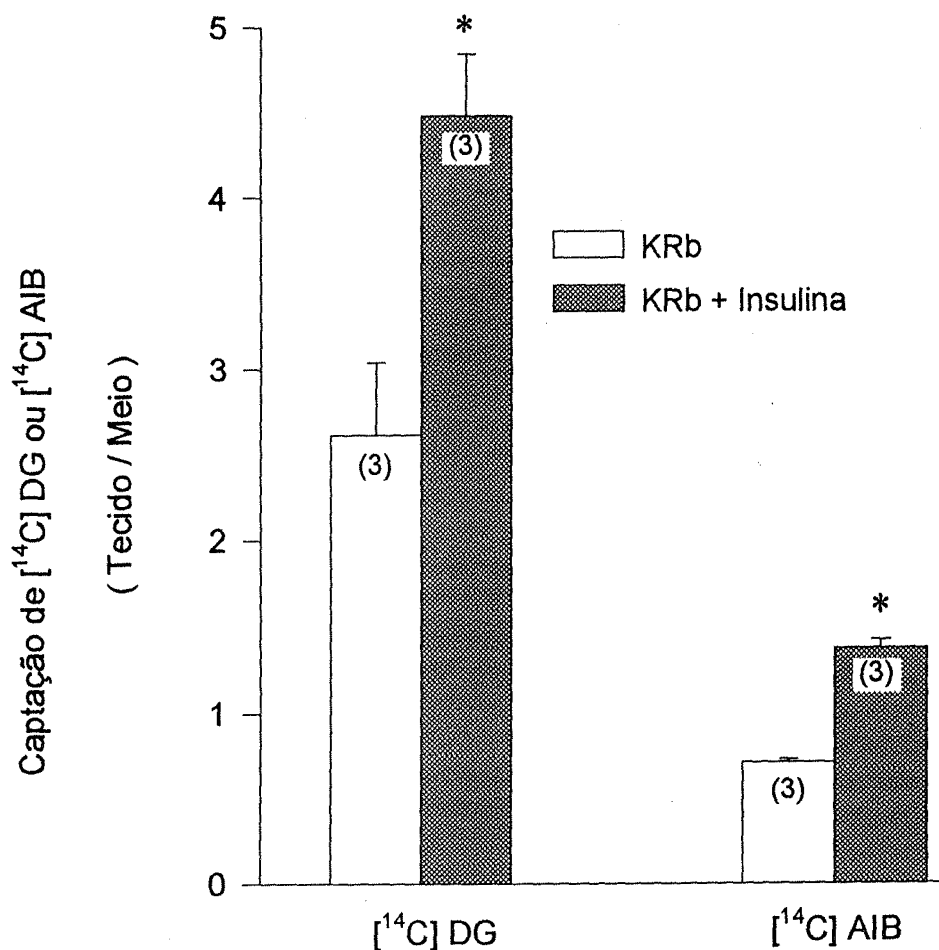


Figura 4. Efeito comparativo da insulina na captação de [¹⁴C]deoxi-D-glicose e [¹⁴C]ácido α -amino isobutírico pela tireóide de tartaruga incubada a 25 °C

Insulina bovina presente no meio de pré-incubação e incubação

[¹⁴C]DG (0,2 μ Ci / ml): 60 minutos de pré-incubação e 240 minutos de incubação

[¹⁴C]AIB (0,2 μ Ci / ml): 90 minutos de pré-incubação e 210 minutos de incubação

Tecido / Meio: dpm / ml de líquido de tecido por dpm / ml do meio de incubação

Resultados: média \pm erro-padrão da média

() número de amostras

* Diferença significativa da respectiva glândula controle, $p < 0,05$, teste t de Student

4.1.3- Captação de [^{14}C]metil-D-glicose pela tireóide de tartarugas -aclimatadas a 6, 25 e 36 °C- pré-incubada e incubada na mesma temperatura da respectiva aclimação

A captação de [^{14}C]MG pela tireóide pré-incubada e incubada somente com KRb, nas temperaturas de 6, 25 e 36 °C (as mesmas da aclimação), sem insulina, não apresentou variações significativas (Figura 5). A 6 °C, a insulina adicionada ao meio de pré-incubação e de incubação não aumentou a captação de metil-D-glicose. O aumento significativo ocorreu nas temperaturas de 25 e 36 °C, tendo sido o efeito mais pronunciado naquela do que nesta.

4.1.4- Captação de [^{14}C]metil-D-glicose pela tireóide de tartarugas -aclimatadas a 6, 25 ou 36 °C- pré-incubada e incubada a 25 °C

A captação de [^{14}C]metil-D-glicose pela tireóide de tartarugas -aclimatadas a 6, 25 ou 36 °C- pré-incubada (60 minutos) e incubada (180 minutos), sem insulina, a 25 °C, foi semelhante nas três condições de aclimação. A presença de insulina (7×10^{-6} M) não aumentou a captação de metil-D-glicose pela tireóide de tartarugas -aclimatadas a 6 ou 36 °C- pré-incubada e incubada a 25 °C. Somente

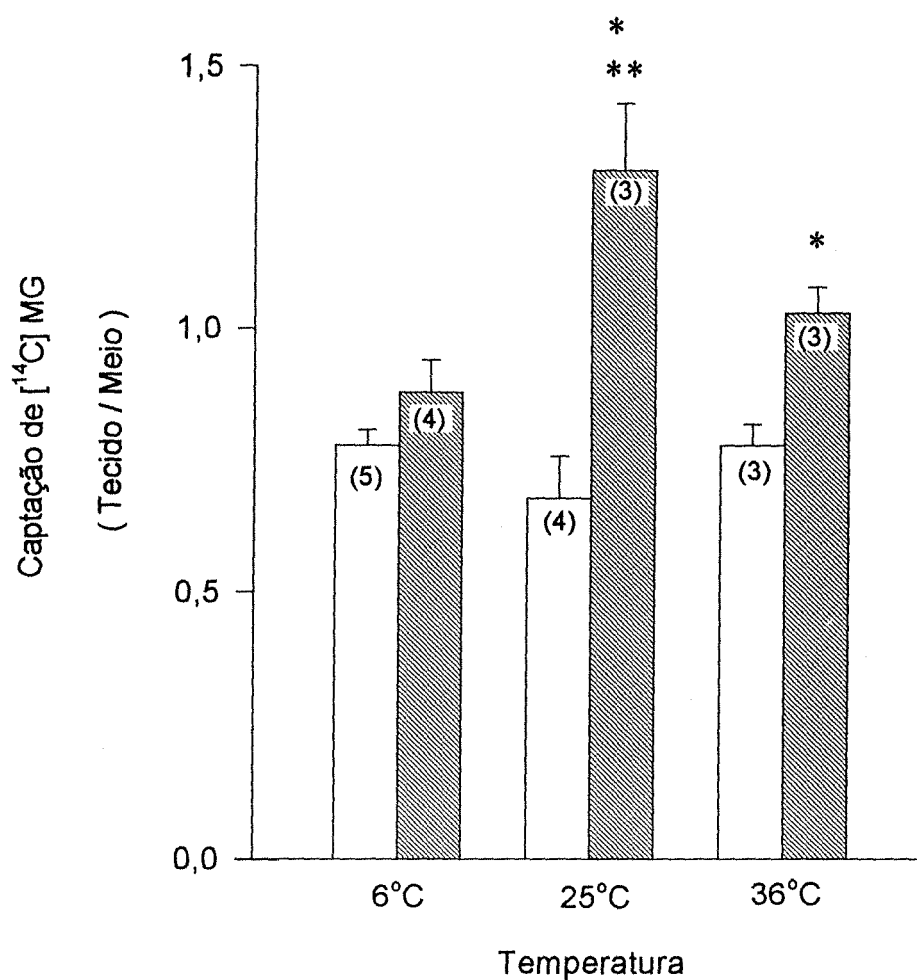


Figura 5. Captação de $[^{14}\text{C}]$ metil-D-glicose pela tireóide de tartarugas -aclimatadas a 6, 25 e 36°C- pré-incubada e incubada na mesma temperatura da respectiva aclimação

Tiréioide pré-incubada (60 minutos) e incubada (180 minutos)

sem (□) ou com insulina bovina (▨) na mesma temperatura da aclimação de 15 dias

Tecido / Meio: dpm / ml de líquido de tecido por dpm / ml do meio de incubação

Resultados: média \pm erro-padrão da média

() número de amostras

* Diferença significativa da respectiva glândula-controle (KRb sem insulina)

** Diferença significativa do efeito da insulina a 6 °C ($p < 0,05$), teste de análise de variância em uma via (ANOVA) e teste de comparação de Duncan

foi observado um efeito do hormônio incrementando a captação de [^{14}C]MG ($p < 0,05$) quando a glândula das tartarugas -aclimatadas a 25 °C- foi pré-incubada e incubada a essa mesma temperatura (Figura 6).

4.1.5- Captação de [^{14}C]metil-D-glicose pela tireóide de tartaruga -aclimatadas a 6 °C- pré-incubada e incubada na mesma temperatura da aclimação por longo período

Em tireóide de tartarugas -aclimatadas a 6 °C- pré-incubada e incubada por longo período (300 minutos) na mesma temperatura da aclimação, o efeito da insulina estimulando a captação de glicose foi demonstrado - $p < 0,05$ comparado com as glândulas-controle -(Figura 7). Os dados de T / M das glândulas-controle (sem insulina) não apresentaram variações significativas, comparados com os de T / M dos experimentos descritos nas Figuras 5 e 6, nos quais as glândulas foram incubadas a diferentes temperaturas -25 e 36 °C- e a 6 °C por menor tempo de incubação.

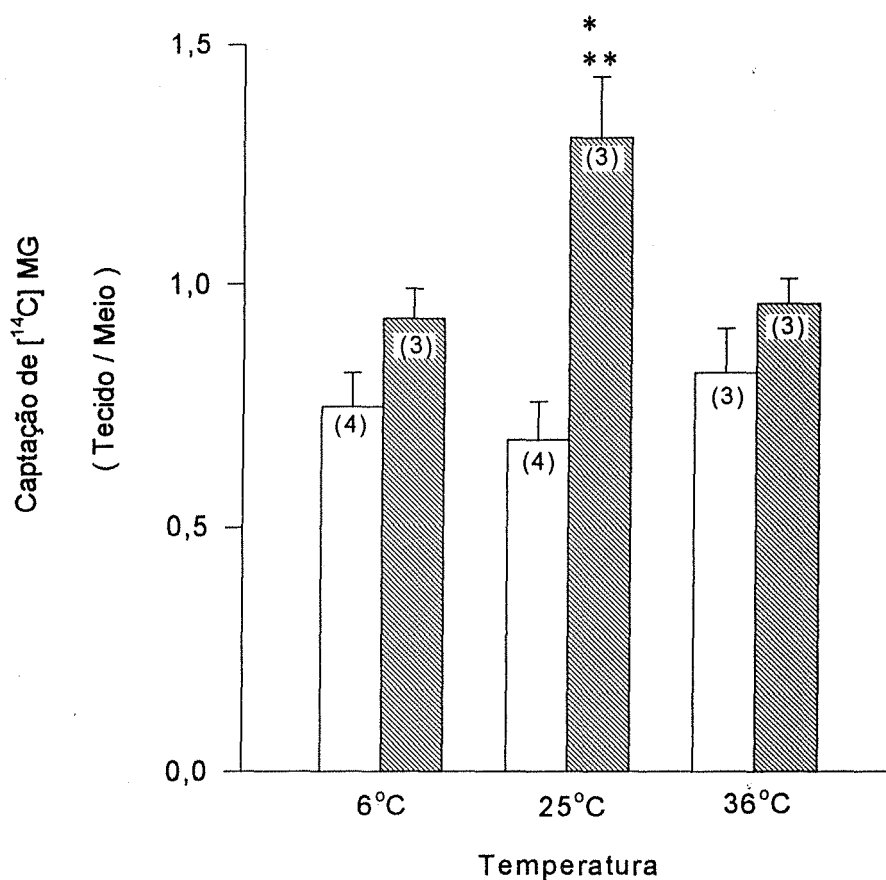


Figura 6. Captação de $[^{14}\text{C}]$ metil-D-glicose pela tireóide de tartarugas -aclimatadas a 6, 25 e 36 $^{\circ}\text{C}$ - pré-incubada e incubada a 25 $^{\circ}\text{C}$

Tiréioide de tartarugas aclimatadas (15 dias) a 6, 25 e 36 $^{\circ}\text{C}$

pré-incubação (60 minutos) e incubação (180 minutos) sem (□) ou com insulina bovina (▨) a 25 $^{\circ}\text{C}$

Tecido / Meio: dpm / ml de líquido de tecido por dpm / ml do meio de incubação.

Resultados: média \pm erro-padrão da média

() número de amostras

* Diferença significativa da respectiva glândula controle (KRb sem insulina)

** Diferença significativa do efeito da insulina a 6 $^{\circ}\text{C}$ ($p < 0,05$), teste de análise de variância em uma via (ANOVA) e teste de comparação de Duncan

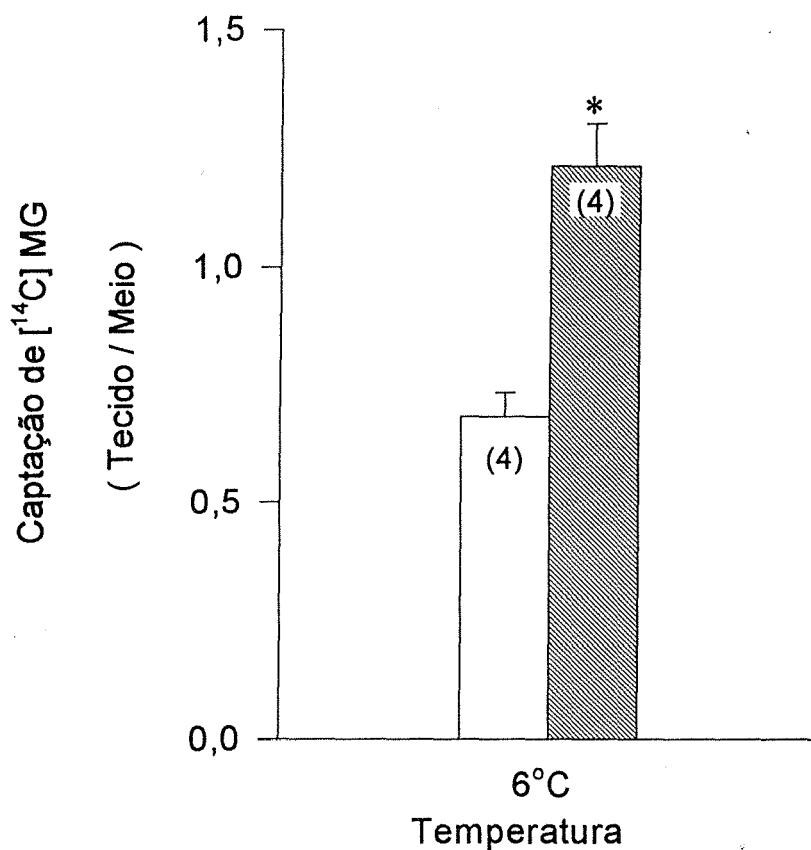


Figura 7. Captação de $[^{14}\text{C}]$ metil-D-glicose pela tireóide de tartarugas -aclimatadas a 6°C- pré-incubada e incubada na mesma temperatura da aclimação

Tiréide de tartarugas aclimatadas (15 dias) a 6 °C

Pré-incubação (300 minutos) e incubação (300 minutos) sem (□) ou com insulina bovina (▨) a 6 °C

Tecido / Meio: dpm / ml de líquido de tecido por dpm / ml do meio de incubação

Resultados: média \pm erro-padrão da média

() número de amostras

* Diferença significativa da respectiva glândula controle (KRb sem insulina), teste t de Student, $p < 0,05$

4.2- Experimentos realizados em ratos

4.2.1- Captação de [^{14}C]deoxi-D-glicose e [^{14}C]ácido α -metil-amino isobutírico pela tireóide de ratos normais

A captação de [^{14}C]DG pela tireóide de ratos normais, incubada em KRb, aumentou em função do tempo de incubação, dos 15 aos 60 minutos. A presença da insulina ($7 \times 10^{-6} \text{ M}$) -tanto na pré-incubação como na incubação- produziu um aumento significativo na captação da deoxi-D-glicose aos 45 e 60 minutos ($p < 0,05$), comparado com os valores das respectivas glândulas-controle, sem insulina (Figura 8). A captação de [^{14}C]MeAIB pela glândula tireóide de ratos normais aumentou progressivamente dos 15 aos 180 minutos, e a adição de insulina ($7 \times 10^{-6} \text{ M}$) ao meio de pré-incubação e incubação aumentou significativamente esse transporte dos 45 aos 180 minutos (Figura 9).

A Tabela 3 apresenta os valores de captação de [^{14}C]deoxi-D-glicose obtidos em tecido tireóideo de ratos normais pré-incubado e incubado com concentrações crescentes de insulina. A menor dose de insulina que produziu um aumento significativo na captação de [^{14}C]DG foi $7 \times 10^{-9} \text{ M}$. A menor dose que aumentou significativamente a captação de ácido α -metil-amino isobutírico também foi de $7 \times 10^{-9} \text{ M}$ (Tabela 4).

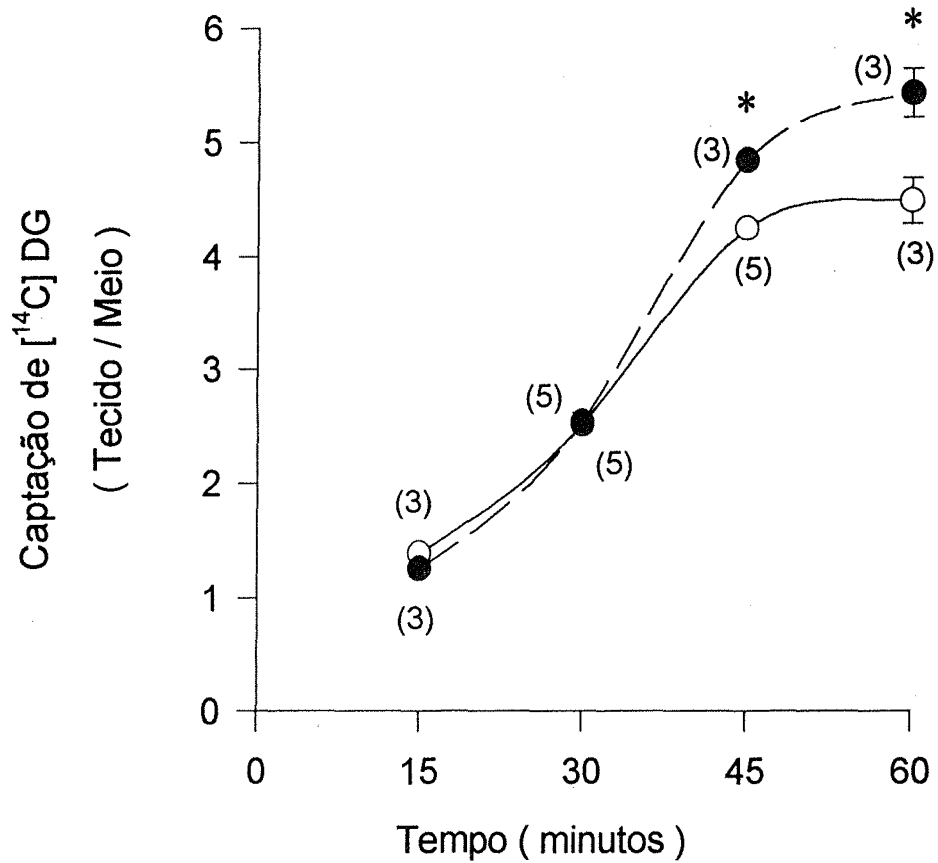


Figura 8. Captação de $[^{14}\text{C}]$ deoxi-D-glicose pela tireóide de ratos normais, incubada em ausência ou presença de insulina por diferentes intervalos de tempo

Pré-incubação (90 minutos) e incubação em ausência (○) ou presença (●) de insulina

Tecido / Meio: dpm / ml de líquido de tecido por dpm / ml do meio de incubação

Resultados: média \pm erro-padrão da média

() número de amostras

* Diferença significativa em relação à respectiva glândula-controle (KRb sem insulina), $p < 0,05$, teste t de Student

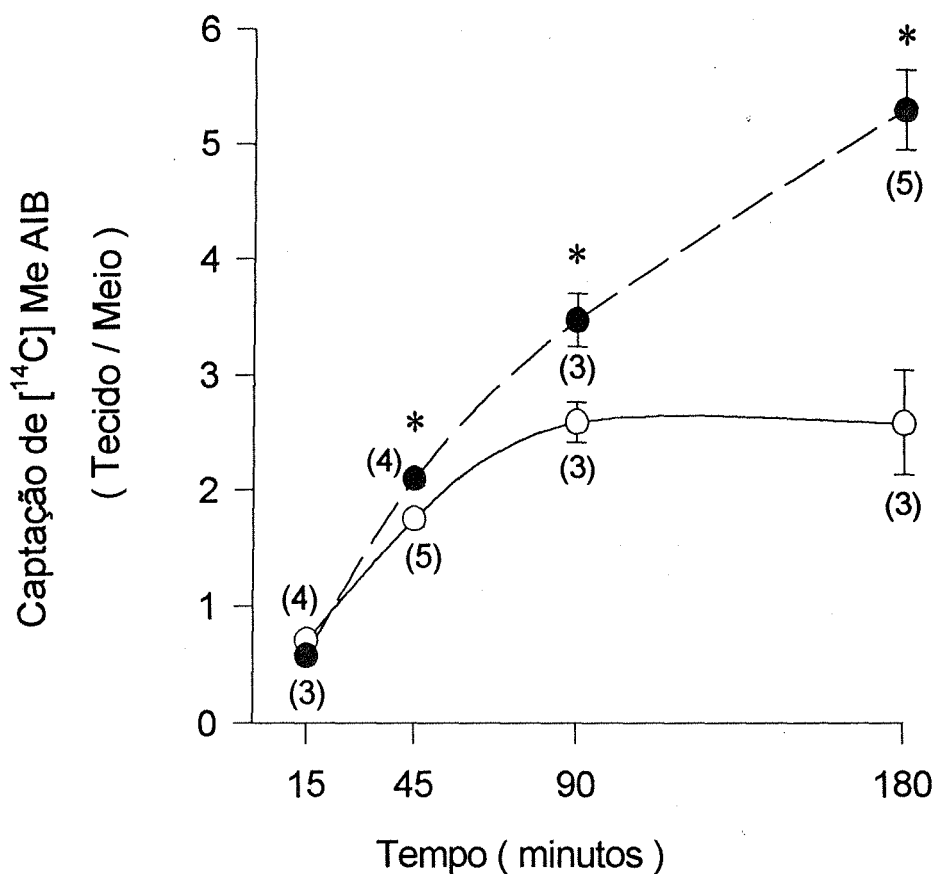


Figura 9. Captação de $[^{14}\text{C}]$ ácido α -metil-amino isobutírico pela tireóide de ratos normais, incubada em ausência ou presença de insulina por diferentes intervalos de tempo

Pré-incubação (90 minutos) e incubação em ausência (\circ) ou presença (\bullet) de insulina

Tecido / Meio: dpm / ml de líquido de tecido por dpm / ml do meio de incubação

Resultados: média \pm erro-padrão da média

() número de amostras

* Diferença significativa em relação à respectiva glândula-controle (KRb sem insulina), $p < 0,05$, teste t de Student

Tabela 3: Efeito de diferentes concentrações de insulina sobre a captação de [¹⁴C]DG pela tireóide de ratos normais

Insulina (mol)	Número de amostras	Captação de [¹⁴ C] DG (Tecido / Meio)	Aumento percentual em relação à tireóide sem insulina
Zero	4	^a 3,30 ± 0,11	-
7 x 10 ⁻¹⁰	4	3,47 ± 0,16	5
7 x 10 ⁻⁹	4	4,04 ± 0,11*	22
7 x 10 ⁻⁸	4	4,06 ± 0,11*	23
7 x 10 ⁻⁷	4	4,02 ± 0,11*	22
7 x 10 ⁻⁶	4	4,16 ± 0,12*	26

Pré-incubação (90 minutos) com ou sem diferentes concentrações de insulina, e incubação (45 minutos) na presença da mesma concentração do hormônio mais [¹⁴C]DG (0,2 µCi / ml)

^a Média ± erro-padrão da média

Tecido / Meio: dpm / ml de líquido de tecido por dpm / ml do meio de incubação

* Diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação à tireóide incubada sem insulina (análise de variância de uma via ANOVA e teste de comparação de Duncan)

Tabela 4: Efeito de diferentes concentrações de insulina sobre a captação de [¹⁴C]MeAIB pela tireóide de ratos normais

Insulina (mol)	Número de amostras	Captação de [¹⁴ C] MeAIB (Tecido / Meio)	Aumento percentual em relação à tireóide sem insulina
Zero	5	^a 1,97 ± 0,06	-
7 x 10 ⁻¹⁰	5	2,03 ± 0,07	3
7 x 10 ⁻⁹	5	2,68 ± 0,27*	36
7 x 10 ⁻⁸	4	2,77 ± 0,05*	41
7 x 10 ⁻⁷	5	2,92 ± 0,13*	48
7 x 10 ⁻⁶	5	3,10 ± 0,17*	57

Pré-incubação (90 minutos) com ou sem diferentes concentrações de insulina, e incubação (45 minutos) na presença da mesma concentração do hormônio mais [¹⁴C]MeAIB (0,2 µCi / ml)

^a Média ± erro-padrão da média

Tecido / meio : dpm / ml de líquido de tecido por dpm / ml do meio de incubação

* Diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação à tireóide incubadas sem insulina (análise de variância de uma via ANOVA e teste de comparação de Duncan)

4.2.2- Efeito da insulina sobre a captação de [^{14}C]deoxi-D- glicose e [^{14}C]ácido α -metil-amino isobutírico pela tireóide de ratos normais e diabéticos por estreptozotocina

A Figura 10 mostra que a tireóide de ratos diabéticos por estreptozotocina apresenta uma diminuição significativa na captação de [^{14}C]DG, comparada com a captação pela tireóide de ratos normais ($p < 0,05$). Um decréscimo semelhante na captação de [^{14}C]MeAIB foi observado na tireóide de ratos diabéticos (Figura 11) ($p < 0,05$). Em tireóide incubada em presença de insulina ($7 \times 10^{-6}\text{M}$), ocorreu um aumento significativo no transporte de ambos os substratos. Entretanto, apesar deste aumento, a captação pela tireóide de ratos diabéticos por estreptozotocina não alcançou os valores da captação de [^{14}C]DG ou [^{14}C]MeAIB encontrados na tireóide de ratos normais, incubada com a mesma concentração de insulina.

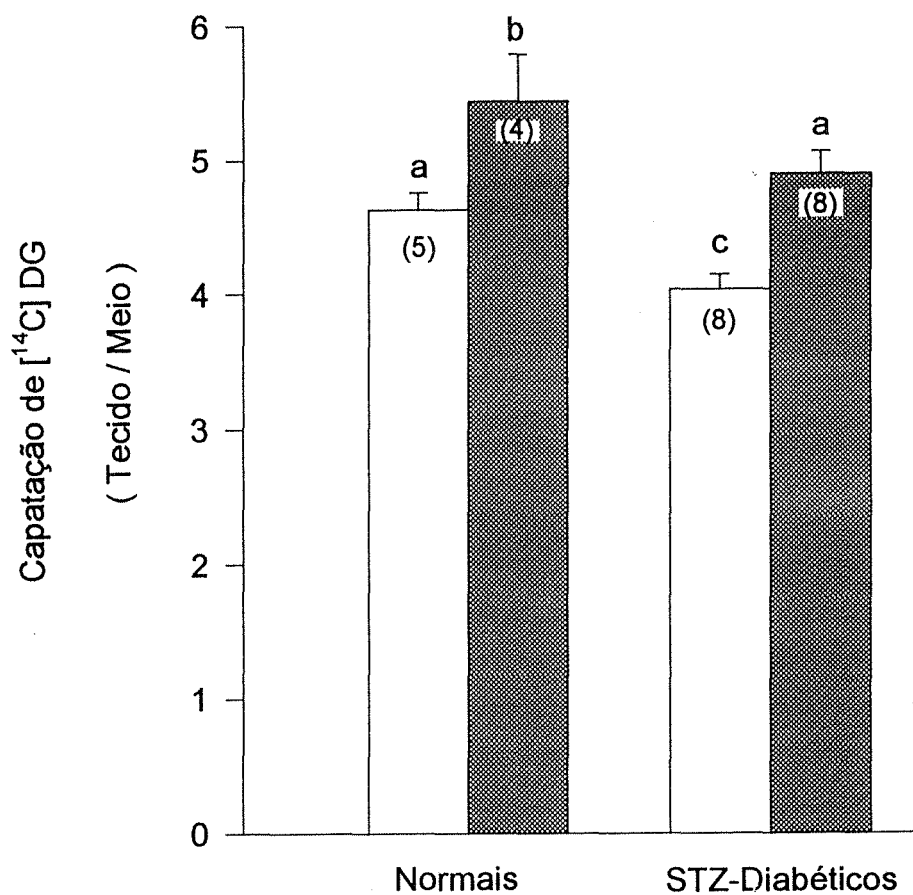


Figura 10. Efeito da insulina sobre a captação de $[^{14}\text{C}]$ deoxi-D-glicose pela tireóide de ratos normais e diabéticos por estreptozotocina

Pré-incubação (90 minutos) e incubação (45 minutos) em ausência (□) ou presença (▨) de insulina

Tecido / Meio: dpm / ml de líquido de tecido por dpm / ml do meio de incubação.

Resultados: média \pm erro-padrão da média

() número de amostras

Médias com as mesmas letras não são diferentes significativamente , teste de análise de variância em uma via (ANOVA) e teste de comparação de Duncan $p < 0,05$)

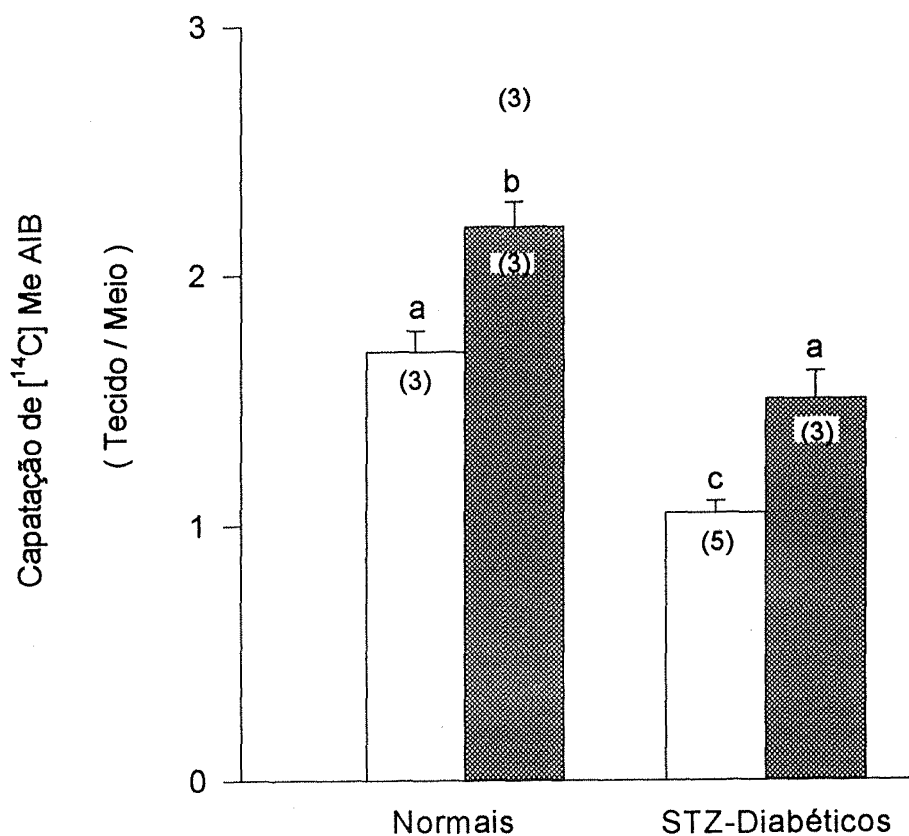


Figura 11. Efeito da insulina sobre a captação de $[^{14}\text{C}]$ ácido α -metil-amino isobutírico pela tireóide de ratos normais e diabéticos por estreptozotocina

Pré-incubação (90 minutos) e incubação (45 minutos) em ausência (□) ou presença (■) de insulina

Tecido / Meio: dpm / ml de líquido de tecido por dpm / ml do meio de incubação

Resultados média \pm erro-padrão da média

() número de amostras

Médias com as mesmas letras não são diferentes significativamente, teste de análise de variância em uma via (ANOVA) e teste de comparação de Duncan $p < 0,05$)

5 - DISCUSSÃO

Nas condições experimentais *in vitro*, do presente trabalho, a tireóide da tartaruga captou eficientemente [¹⁴C]deoxi-D-glicose e [¹⁴C] ácido α -amino isobutírico, fenômeno dependente do tempo de incubação com ambos os substratos (Figuras 1 e 2). O uso da insulina bovina não compromete ou invalida os resultados, porquanto estudos anteriores (CASCONE e col., 1991) referem ser a estrutura primária da insulina da tartaruga *Chrysemys dorbigni* muito similar a dos demais vertebrados, diferindo da insulina bovina em apenas três resíduos (8, 9, 10) na cadeia A e três resíduos (1, 2, 27) na cadeia B. Além disso, a insulina bovina provoca redução da glicemia na *Chrysemys dorbigni* e também liga-se especificamente aos receptores de insulina no fígado, tecido adiposo, hipófise e adrenais (MARQUES e col., 1982) e na própria glândula tireóide (MARQUES e col., 1984; 1985; TURYN e col., 1986).

A insulina bovina adicionada *in vitro* nos meios de pré-incubação e de incubação aumentou significativamente a captação de glicose pela tireóide de tartaruga (Figura 3). Sem o período de pré-incubação da glândula ou com pré-incubação em ausência da insulina exógena, esse efeito não foi observado. Estudos anteriores demonstraram que em hipófise e adrenal de rato, a insulina estimulou a captação da [¹⁴C]deoxi-D-glicose quando adicionada apenas no período de incubação (MACHADO e col., 1982, 1985). É difícil encontrar explicação para essa diferença. No entanto, deve ser considerada a falta de similaridade das condições experimentais, tais como temperatura e

tempo de incubação, tecidos estudados e espécies animais utilizadas. É válido, porém, sugerir que os tecidos de tartaruga -animal que apresenta metabolismo lento- em comparação com os de rato, requerem mais tempo, para que a insulina desencadeie a seqüência de efeitos intracelulares resultantes no aumento do transporte de glicose. Dão suporte a esta hipótese, os resultados obtidos em tireóide de tartarugas, aclimatadas a 6°C e incubadas a essa temperatura em presença de insulina, por um período de tempo mais prolongado. Nessas condições experimentais, o efeito estimulante da insulina sobre a captação de glicose foi evidenciada (Figura 7).

O efeito da insulina, incrementando a captação de glicose pela tireóide de tartaruga, foi dependente da dose do hormônio. A menor concentração de insulina, que induziu um aumento significativo na captação de [¹⁴C]deoxi-D-glicose, foi da ordem de 7×10^{-9} M. Uma concentração similar de insulina aumentando a captação de glicose em músculo sartórius de rã já havia sido demonstrada (NARAHARA & GREEN, 1983).

A insulina provavelmente estimula a captação de glicose pela tireóide de tartarugas via sistema de transporte por difusão facilitada, conforme referido em estudos com muitos outros tecidos (GOLDFINE, 1987). Esse sistema de transporte por difusão facilitada é mediado por glicoproteínas carreadoras da glicose (GLUT 1-5). O GLUT 4 -encontrado exclusivamente em tecidos sensíveis à ação desse

hormônio- parece ser o único regulado pela insulina (BIRNBAUM, 1992).

Constatou-se que a insulina estimula a captação de [^{14}C] AIB pela glândula tireóide de tartaruga. A menor dose efetiva em estimular a captação do aminoácido pela glândula foi da ordem de 7×10^{-9} M. Este efeito tem sido demonstrado numa grande variedade de tecidos -músculo esquelético e cardíaco, adipócitos, hepatócitos, fibroblastos, tecido ósseo e linfócitos (GUIDOTTI e col., 1978; SHOTWELL e col., 1983 ; TESSARI e col., 1994).

Os resultados do presente estudo confirmam os demonstrados por MARQUES e col.(1984) -a existência de receptores específicos à insulina em tireóide de tartarugas e a hipótese do presente trabalho de que a insulina possa exercer uma ação biológica direta na referida glândula.

Considerando que as tartarugas, animais heterotérmicos, apresentam modificações histológicas na glândula tireóide, conforme variações de temperatura nas diferentes estações do ano (temperaturas-médias entre $4-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $35-38\text{ }^{\circ}\text{C}$ na região sul do país) e que adaptam sua atividade metabólica às condições ambientais e, ainda, que mesmo à baixa temperatura ($6\text{ }^{\circ}\text{C}$), a ocorrência da degradação da insulina internalizada após sua ligação ao receptor evidencia certo grau de atividade (MARQUES e col., 1985), julgou-se oportuno avaliar a

influência da temperatura sobre os efeitos da insulina (captação de glicose e aminoácido) na tireóide dessa espécie.

A tireóide da tartaruga *Chrysemys dorbigni* apresenta variações em sua estrutura folicular conforme a estação do ano. Células mais altas com núcleo de maior diâmetro e menor lúmen folicular são encontradas na primavera, indicando que, nessa época, há uma atividade sintética mais intensa (MACHADO e col., trabalho em fase final de redação). Em tartaruga *Chrysemys picta*, que apresenta variações sazonais dos níveis plasmáticos de T_4 , a proteína transportadora da tiroxina, medida por radioimunoensaio, mostrou variações significativas de acordo com a estação do ano, tendo sido mínima no período próximo à hibernação e máxima no final do verão, cerca de um mês depois do pico de T_4 (LICHT e col., 1991). Estudos histológicos feitos em tireóides de lagartos (*Anolis carolinensis*), aclimatados por duas semanas a 15 ou 35°C, mostraram diferenças de acordo com a temperatura testada. Os animais mantidos a altas temperaturas tendem a mostrar evidências histológicas de uma atividade mais intensa da glândula tireóide do que os mantidos a baixas temperaturas (LYNN e col., 1965). Observações semelhantes foram encontradas em muitas espécies de lagartos europeus (BARGMANN, 1939).

Os répteis são animais classificados como heterotérmicos por se adaptarem metabolicamente às diferentes temperaturas ambientais. Variações na temperatura do meio externo levam a ajustes

compensatórios das taxas metabólicas durante o período de aclimatização térmica (SOMERO, 1978). A temperatura influencia interações de enzimas com substratos, com efetores inibitórios e alostéricos, bem como promove alterações conformacionais nas proteínas. Quando um animal heterotérmico é transferido de um meio térmico para outro diferente, muitos aspectos de sua fisiologia e bioquímica são alterados, compensando essa variação de temperatura ambiental. Tais mudanças adaptativas ocorrem para permitir que o organismo, ao longo do tempo, mantenha a atividade fisiológica que lhe é inerente, apesar das diferenças em sua temperatura corporal. As respectivas compensações requerem normalmente vários dias para se completarem. Durante o curso evolutivo, os animais heterotérmicos têm desenvolvido muitas estratégias alternativas e mecanismos para assegurar que seu metabolismo permaneça totalmente ou, pelo menos, parcialmente independente das flutuações ambientais da temperatura (HAZEL & PROSSER, 1974).

Com o objetivo de estudar o efeito da insulina sobre a captação de metil-D-glicose pela tireóide de tartaruga *in vitro*, foi simulada a variação da temperatura do ambiente natural, e as tartarugas foram aclimatadas, no laboratório, a 6, 25 ou 36 °C.

Em tireóide de tartarugas -aclimatadas a 6, 25 ou 36 °C- pré-incubada (60 minutos) e incubada (180 minutos) na respectiva temperatura da aclimação, sem a presença de insulina, constatou-se que a captação de glicose não apresentou variações significativas. O

mesmo foi observado em tireóide de tartarugas -aclimatadas a 6, 25 ou 36 °C- pré-incubada e incubada a 25 °C. Igualmente não se observou diferença na captação da metil-D-glicose pela glândula de tartarugas -aclimatadas a 6 °C- e incubada a essa mesma temperatura por um período prolongado de tempo. Esses resultados estão de acordo com as observações feitas por KONO e col. (1977) em adipócitos de ratos,-a não variação da captação de glicose em diferentes temperaturas (15 e a 37 °C). Aparentemente, baixos níveis de transporte de glicose não são afetados por variações de temperatura. Mesmo em presença de citocalasina B, foi observado, em músculo esquelético de mamíferos, um mínimo de transporte da glicose (SHANAHAN, 1984). Citocalasina B é um potente inibidor do transporte de glicose em sistemas de células e é usado para medir a captação inespecífica de glicose (JUNG & RAMPAL, 1977). Assim, os resultados obtidos na glândula tireóide de tartarugas sugerem que essa captação de glicose, não modificada pela temperatura, possa ser resultante de difusão passiva, ligação não-específica da glicose ou ambos os processos.

Entretanto, o efeito estimulante da insulina sobre a captação de glicose na glândula tireóide de tartaruga foi sensível às variações de temperatura. Em tireóide de tartarugas, aclimatadas a 6 °C, incubada na mesma temperatura da aclimação por 180 minutos, o efeito da insulina não foi observado. É importante destacar que nestas glândulas pré-incubadas e incubadas durante o mesmo período de tempo utilizado nos experimentos com tartarugas aclimatadas a 25 e 36 °C, a insulina

provocou um aumento significativo da captação de glicose (Figura 5). Em adipócitos de rato, a insulina não foi efetiva em estimular o transporte de metil-D-glicose, quando a temperatura da incubação diminuiu para 15 °C. Estes resultados indicam que a ativação hormonal do transporte de glicose é altamente sensível a baixas temperaturas. Os efeitos de baixa temperatura podem ser explicados por um aparente retardo quanto à ligação da insulina a seu receptor específico na membrana celular (KONO e col., 1977).

Em tireóide de tartarugas -aclimatadas a 6, 25 ou 36 °C- pré-incubada e incubada a 25 °C, os resultados mostraram que o já conhecido efeito da insulina em estimular o transporte de glicose só foi observado em tartarugas aclimatadas previamente a 25 °C. Estes resultados parecem indicar ser a temperatura, durante o período de aclimação, muito importante para preparar os ajustes metabólicos da glândula tireóide nestes animais. Sessenta minutos de pré-incubação e 180 minutos de incubação à temperatura diferente daquela usada no período de aclimação não foram suficientes para ajustar a glândula a diferentes condições enzimáticas.

É importante salientar que as tartarugas *Chrysemys dorbigni*, de modo geral, enfrentam na região sul, temperaturas bastante baixas (em torno de 8 °C) durante os meses de inverno e, mesmo assim, elas ainda apresentam atividade. Por essa razão, foi realizado experimento adicional com tireóide de tartarugas -aclimatadas a 6 °C- pré-incubada e incubada, com insulina, na mesma temperatura da aclimação, porém,

por um período prolongado de 300 minutos. A Figura 7 mostra que, mesmo à baixa temperatura, a insulina ainda produziu o clássico efeito de estimular a captação de glicose, encontrado na glândula de tartarugas aclimatadas a 25 °C, incubada na mesma temperatura da aclimação por um tempo menor (60 e 180 minutos): Estes resultados concordam com os apresentados por MARQUES e col. (1985) nos quais demonstraram que a degradação da insulina em tireóide de tartaruga *Chrysemys dorbigni*, mesmo à baixa temperatura, ocorreu quando o período de incubação foi prolongado para 8 horas. Este resultado sugere que, a 6 °C, a glândula tireóide de tartarugas está biologicamente ativa. É interessante mencionar os estudos realizados por LICHT e col. (1990) quanto aos efeitos da baixa temperatura sobre a liberação de T₄ pela tireóide da tartaruga *Pseudemys scripta* em resposta à tireotrofina (TSH). Os autores sugerem que a supressão das ações hormonais pelo frio possa advir, principalmente, de processos pós-receptor, e não, da ligação do hormônio ao receptor em si. Entretanto, os resultados do presente trabalho indicam que o efeito da insulina sobre a captação da glicose pela glândula tireóide da tartaruga foi expresso mesmo a uma baixa temperatura (6 °C), em tempo de incubação suficientemente prolongado. Este fato parece estar indicando que os efeitos hormonais em tartarugas -animais heterotérmicos- não ficam suprimidos a baixas temperaturas, mas apenas retardados.

Estudos têm demonstrado que a composição dos fosfolipídeos de membrana celular apresenta variações durante a adaptação a diferentes

temperaturas, de tal maneira que a fluidez ou a viscosidade da membrana celular é mantida. Essa variação da composição dos lipídeos de membrana representa assim um processo adaptativo importante (SOMERO, 1978).

Comprovou-se, neste trabalho, que a tireóide de tartaruga é capaz de captar eficientemente glicose e aminoácidos e a respectiva captação é estimulada com a presença da insulina no meio de incubação, efeitos dependentes do tempo e da dose de insulina, como também da temperatura. Estes dados reforçam a hipótese da possibilidade de a insulina exercer uma ação direta sobre o metabolismo da tireóide, uma vez que sua presença *in vitro* estimula a captação pela glândula de dois substratos importantes para o seu metabolismo - a glicose e o aminoácido.

Para avaliar se esse efeito direto da insulina constitui um fenômeno fisiológico adicional ao controle da função da glândula tireóide pelo TSH, seria importante demonstrar que, em ausência da insulina, a captação desses substratos fica diminuída ou prejudicada. Para tanto, far-se-ia necessário o emprego de tartarugas com diabetes induzida experimentalmente. A tartaruga *Chrysemys dorsalis* mostra, porém, grande resistência à ação diabetogênica do aloxano (LOPES e col., 1955) e igualmente da estreptozotocina (MUNIZ & MARQUES, 1989), drogas amplamente utilizadas para a indução de diabetes em animais de experimentação. Segundo MUNIZ & MARQUES (1989), apenas 14 % das tartarugas injetadas com estreptozotocina

apresentaram acentuada hiperglicemia. Assim, para dar prosseguimento a este estudo que se propõe avaliar o transporte de glicose e aminoácido em tireóide de animais diabéticos, elegeu-se o rato como modelo experimental.

Demonstrou-se inicialmente que, sob as condições experimentais *in vitro*, a glândula tireóide do rato normal é também capaz de captar eficientemente a glicose. A insulina adicionada ao meio de pré-incubação e de incubação produz um significativo aumento da captação desse substrato, como foi demonstrado em tireóide de tartaruga, confirmando resultados referidos por FIELD (1960) em fatias de tireóide bovina, e por CARRUTHERS, (1990) em músculo e tecido adiposo. A insulina estimula igualmente a captação de aminoácido pela tireóide bovina (DEBONS & PITTMAN, 1966), e em músculo, fígado, osso e fibroblastos (TESSARI, 1994) e em tireóide de tartaruga (no presente trabalho). Esse efeito da insulina sobre a captação de glicose e aminoácidos na tireóide de ratos foi dependente do tempo de incubação (Figuras 8 e 9) e da dose do hormônio (Tabelas 3 e 4). A menor concentração de insulina, adicionada *in vitro*, para induzir um significativo aumento na captação de [¹⁴C]deoxi-D-glicose e [¹⁴C]ácido α -metil-amino isobutírico foi da ordem de 7×10^{-9} M, valor semelhante aos encontrados no átrio esquerdo de ratos (BIHLER e col., 1980), na hipófise (BELLÓ e col., 1982), na

glândula adrenal de ratos (DA SILVA e col., 1984) e na glândula tireóide de tartarugas (Tabelas 1 e 2).

Os resultados estão também de acordo com os obtidos em células FRTL-5 (linha de células de tireóide de ratos Fischer), nas quais a insulina aumentou a captação de glicose e de aminoácido (TRISCHITTA e col., 1987). Entretanto, esta linhagem de células não incorpora o iodeto na tireoglobulina nem é capaz de sintetizar os hormônios da tireóide. Existem notáveis alterações nas respostas morfológicas e funcionais ao TSH, comparadas com as respostas em tireóides normais. Tal perda da diferenciação específica pode estar refletindo a inabilidade das respectivas células em se reorganizarem em dimensão terciária numa forma folicular quando em cultura (BIDEY e col., 1988). A produção de T_3 pode ser mínima, devido a um defeito existente na atividade do gene para a peroxidase (KAMIKUBO e col., 1992). Nas condições experimentais do presente trabalho, entretanto, a cito-arquitetura e o estado funcional da glândula foram, provavelmente, mantidos em condições mais próximas às observadas *in vivo*, do que às obtidas em linhagem de cultura de células FRTL-5.

A identificação, em glândulas tireóides, dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-I e II), seus receptores e características da ligação a esses fatores, e algumas de suas ações biológicas (VAN WYK e col., 1974; ZAP e col., 1978; RECHLER e col., 1980; KASUGA e col., 1981; e FROESCH e col., 1985; TRAMONTANO e col., 1987), aliada à demonstração da presença de

IGF-I em células tireóideas de algumas espécies animais (MAK e col., 1984; BACHRACH e col., 1988), inclusive em tireóide humana (TODE e col., 1989), têm criado controvérsias quanto à ação da insulina na tireóide.

Com o objetivo de identificar a ação desses peptídeos na tireóide, ROTELLA e col. (1989) compararam os efeitos da insulina , do TSH e do IGF-I sobre a captação de aminoácidos em culturas primárias de células tireóideas humanas e de ratos Wistar (WRT), capazes de sintetizar tireoglobulina, captar iodo, e responder ao TSH com aumento do AMP cíclico (monofosfato de adenosina). Em tireócitos de rato, a insulina e o IGF-I estimularam independentemente a captação de ácido α -amino isobutírico e seus efeitos foram aditivos. A insulina e o TSH também mostraram efeitos aditivos, enquanto a combinação de IGF-I com TSH produziu um efeito potenciado, isto é, maior do que a soma teórica dos efeitos de cada um. Já em células de tireóide humana, a insulina foi menos efetiva do que o IGF-I ao estimular a captação de aminoácido. É possível que a ação biológica desses peptídeos possa variar de acordo com a espécie e com o modelo experimental.

Um dos requisitos essenciais para a proliferação de tireócitos, em sistemas de cultura, é a presença de altas concentrações de insulina, e a ação dessas concentrações supra-fisiológicas parece ser mediada por sua ligação com baixa afinidade, aos receptores de IGF-I, (STRAUS, 1981; EGGO e col., 1984; GÄRTNER e col., 1985). O receptor de IGF-I apresenta um alto grau de homologia com o receptor

de insulina, porém mostra baixa afinidade para a insulina, na ordem de 100 a 1000 vezes menos, enquanto os receptores de insulina apresentam alta afinidade para a insulina e 100 vezes menos para o IGF-I. Os receptores dos dois peptídeos, insulina e IGF-I, parecem utilizar o mesmo substrato receptor de insulina (IRS-1) para sinalizar seus efeitos intracelulares. O sinal de divergência pode ocorrer depois da fosforilação do IRS-1. Tal componente pode ser expresso diferencialmente em células que respondem à insulina *versus* células que respondem ao IGF-I através de etapas pós-IRS-I (JONES & CLEMMONS, 1995).

EGGO e col. (1990) demonstraram que concentrações fisiológicas de insulina aumentam a organificação do iodo, a expressão de tireoglobulina e a síntese de DNA em células tireóideas de ovelha. Igualmente, concentrações nanomolares de insulina foram requeridas para a síntese de DNA estimulada pelo TSH em tireócitos de cão, demonstrando, por primeira vez, a importância de uma cooperação sinérgica entre os hormônios (ROGER e col., 1987).

O fato de que o TSH e o IGF-I estimulam a captação de aminoácidos em glândula tireóide não exclui obrigatoriamente a possibilidade de que a insulina também o faça, através de sua ligação a seus próprios receptores. De qualquer modo, com base nos dados da literatura e nos resultados do presente trabalho, é válido considerar que a captação de substratos pela glândula tireóide possa ser controlada de

forma cooperativa por mecanismos neuroendócrino (TRH-TSH, eixo hipotálamo-hipófise), endócrino (insulina) e parácrino (IGF-I).

A diminuição significativa da captação de glicose e aminoácido em tireóide de ratos com acentuada hiperglicemia, após cinco dias da injeção de estreptozotocina, demonstra que a falta ou redução da insulina prejudica o funcionamento normal da glândula. É bem sabido que a glicose e os aminoácidos são indispensáveis para seu metabolismo. A glicose é usada na formação da hexose monofosfato e na geração de H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), que são necessários na produção dos hormônios sintetizados pela glândula tireóide (HARAGUCHI e col., 1988). AHN & ROSENBERG (1981) demonstraram que a glicose potencia o efeito do TSH sobre a biossíntese dos hormônios tireóideos em fatias da glândula de animais não diabéticos através da formação de H_2O_2 . Normalmente, existe uma correlação entre a estimulação hormonal da captação de aminoácidos por seu respectivo órgão-alvo e um aumento subsequente na atividade anabólica das células, tais como a síntese de macromoléculas, produção de energia ou divisão celular (SHOTWELL e col., 1983). O fato de que apenas cinco dias de redução ou falta de insulina deprime a captação de substratos essenciais à atividade metabólica da glândula tireóide parece indicar que esse hormônio desempenha um papel fisiológico relevante para sua função, independente de ser mediado por seus receptores específicos ou pelos de IGF-I.

Com a adição da insulina ao meio de incubação, a glândula tireóide dos ratos diabéticos aumentou a captação de glicose em 21 % e de aminoácidos em 44 %, em comparação com as respectivas glândulas-controle dos ratos diabéticos (sem a presença de insulina). É importante salientar que a captação de glicose e de aminoácido pela tireóide dos animais diabéticos, em presença de insulina *in vitro*, alcançou somente os valores obtidos em glândula dos ratos normais em condições basais, isto é, sem o estímulo hormonal (Figura 10). Semelhante resultado foi encontrado em glândulas adrenais de ratos diabéticos por estreptozotocina, nas quais a insulina estimulou a captação de glicose, mas o aumento não atingiu os valores obtidos na glândula dos ratos normais estimulada pelo hormônio (DA SILVA e col., 1984). As poucas horas de incubação em presença de insulina, provavelmente, não foram suficientes para corrigir as alterações causadas pela falta de insulina.

Estes resultados podem explicar a ocorrência freqüente de anormalidades na tireóide observadas no estado de diabete tais como: redução de 41 % na taxa de secreção da tiroxina em ratos diabéticos por aloxano e aumento da secreção da tiroxina devido à administração de insulina (KUMARESAN & TURNER, 1966); diminuição na taxa de captação de iodeto estável e alterações na distribuição do iodo marcado nos aminoácidos, importantes para a biossíntese hormonal (JOLÍN & GONZÁLEZ, 1978); reduzida sensibilidade ao TSH com conseqüente decréscimo na síntese dos hormônios da glândula tireóide (BAGCHI e

col., 1981); decréscimo significativo nas concentrações de T_3 e T_4 do soro e na atividade da peroxidase da tireóide (MOURA e col., 1986).

Uma análise global dos resultados obtidos na glândula tireóide de duas espécies animais distintas -tartaruga e rato- revela que os efeitos da insulina, estimulando a captação de glicose e aminoácido *in vitro*, foram quase idênticos no que se refere à mínima dose efetiva do hormônio. Já o tempo de incubação requerido para evidenciar esses efeitos na tireóide de tartaruga foi maior do que na glândula de rato. Tal constatação naturalmente se deve a diferenças na temperatura do meio de incubação, realizada de acordo com a temperatura corporal da espécie (36-37 °C no rato; e 25 °C - temperatura preferencial- na tartaruga). Estes fenômenos adaptativos requerem um certo período de tempo para que o animal possa se adaptar às novas condições ambientais, como foi demonstrado na segunda etapa deste trabalho - tireóides de animais, aclimatados a temperaturas diferentes daquela do meio de incubação, não evidenciaram o efeito da insulina.

A constatação de que a insulina estimula *in vitro* a captação de substratos importantes -glicose e aminoácidos- parece dar suporte à hipótese de que esse hormônio pode exercer um efeito direto sobre a tireóide. No entanto, face à controvérsia encontrada na literatura, anteriormente mencionada, quanto ao fato de ser o referido efeito mediado por seus próprios receptores ou por receptores do IGF-I, sugerem-se experimentos futuros.

A diminuição significativa da captação de glicose e de ácido α -amino isobutírico em tireóide de ratos , com apenas cinco dias de diabetes experimental, induzida por estreptozotocina, parece indicar que a insulina é um hormônio importante para o metabolismo normal dessa respectiva glândula, e sua ausência ou redução parecem explicar muitas das anormalidades da função tireóidea associadas com a diabetes mellitus.

Futuros experimentos deverão aprofundar o conhecimento das interações da insulina com o TSH, que igualmente aumenta a captação de aminoácidos nessa glândula, e com o IGF-I que também estimula a captação de substratos, através de uma provável ação parácrina ou autócrina.

Sugerem-se experimentos futuros com animais transgênicos nos quais os receptores de IGF-I não são expressos, para a confirmação do efeito da insulina na captação de nutrientes pela glândula tireóide.

Seria de grande importância, também, investigar outros efeitos metabólicos da insulina nessa glândula, em especial a síntese de tireoglobulina, bem como a presença de transportadores de glicose na tireóide da tartaruga e do rato.

6 - CONCLUSÕES

Nas condições experimentais do presente trabalho, *in vitro*, com glândula tireóide de tartarugas *Chrysemys dorbigni* e de ratos, concluiu-se que:

A captação basal de glicose (sem estímulo da insulina) não sofre influência da temperatura, enquanto a ação hormonal da insulina depende da temperatura; e que as tartarugas, como animais heterotérmicos, requerem um certo tempo para adaptarem seu metabolismo a novas temperaturas; e ainda, que a tireóide da tartaruga, mesmo a 6 °C, é biologicamente ativa.

A captação de glicose e aminoácido de tireóide de ratos diabéticos por estreptozotocina apresenta-se diminuída em ausência da insulina.

Face aos resultados obtidos em glândula tireóide de tartarugas e de ratos *in vitro*, pode-se concluir que a insulina produz um efeito direto sobre a respectiva glândula, aumentando a captação de glicose e de aminoácido, e que em ausência ou redução (ratos diabéticos), a captação desses substratos sofre um decréscimo, explicando, em parte, as freqüentes disfunções da tireóide, associadas com a diabetes mellitus.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, C. S. & ROSENBERG, I. N. Glucose dependence of thyrotropin-stimulated thyroid hormone formation. **Endocrinology**, **107**: 1861-1866, 1981.
- BACHRACH, L. K.; EGGO, M. C.; HINTS, R. L. & BURROW, G. N. Insulin-like growth factors in sheep thyroid cells. Action, receptor and production. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **154**: 861-867, 1988.
- BAGCHI, N.; BROWN, T. R.; SHIVERS, B.; LUCAS, S. & MACK, R. E. Decreased thyroidal response to thyrotropin in diabetic mice. **Endocrinology**, **109**: 1428-1432, 1981.
- BARGMANN, W. Die Schilddrüse. In **Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen**. W. Von Mollendorff ed. Springer, Berlin, VI 2, pp 2-136., 1939.
- BECKS, G. P.; BUCKINGHAM, K. D.; WANG, JIA-F.; PHILLIPS, I. D.; HILL, D. J. Regulation of thyroid hormone synthesis in cultured ovine thyroid follicles. **Endocrinology**, **130**: 2789-2794, 1992.
- BELL, G. I.; KAYANO, T.; BUSE, J. B.; BURANT, C. F.; TAKEDA, J.; LIN, D. FUKUMOTO, H. & SEINO, S. Molecular biology of mammalian glucose transporters. **Diabetes Care**, **13**: 198-208, 1990.

- BELLÓ, A. A, DA SILVEIRA, C. M, WASSERMANN, G. F, TURYN, D & DELLACHA, J.M. Insulin specific uptake degradation and action on deoxyglucose transport in rat pituitary gland. **IRCS Medical Science**, 10: 121-122, 1982.
- BERGERON, J. J. M.; RACHUBINSKI, R.; SEARLE, N.; SIKSTROM, R. & POSNER, B. I. Polypeptide hormone receptors *in vivo*: demonstration of insulin binding to adrenal and gastrointestinal epithelium by quantitative radioautography. **Journal of Histochemical and Cytochemical**, 28: 824-835, 1980.
- BIDEY, S. P.; LAMBERT, A. & ROBERTSON, W. R. Thyroid cell growth, differentiation and function in the FRTL-5 line: a survey. **Journal of Endocrinology**, 119: 365-376, 1988.
- BIHLER, I.; CHARLES, P. & SAWH, P.C. Effects of the calcium ionophoro A 23187 on the regulation of sugar transport in muscle. **Cell Calcium**, 1: 237-336, 1980.
- BIRNBAUM, M. J. The insulin-sensitive glucose transporter. **International Review of Cytology**, 137: 239-297, 1992.
- BLUM, C. & BRISSON-LOUGARRE, A.; DE NAYER, Ph. Effect of insulin on thyroid hormone blood levels in normal and thyroectomized dogs. **Diabete & Metabolism**, 3: 235-238, 1977.

- BRISSON-LOUGARRE, A.; BLUM, C. & De NAYER, Ph. Action of insulin on thyroid protein synthesis in dogs. **Hormone and Metabolism Research**, 10: 396-400, 1978.
- BROWN, T. J.; BROMAGE, N. R. & MATTY, A. J. Thyroxine levels in streptozotocin, insulin and glibenclamide-treated rats. **Journal of Endocrinology**, 68: 21-22, 1976.
- CARRUTHERS, A. Facilitated diffusion of glucose. **Physiological Reviews**, 70: 1135-1176, 1990.
- CASCONE, O. ; TURYN, D. ; DELLACHA, J. M. ; MACHADO, V. L. A. ; MARQUES, M. ; VITA, N. ; CASSAN, C.; FERRARA, P. & GUILLEMOT, J. C. Isolation, purification, and primary structure of insulin from the turtle *Chrysemys dorbigni*. **General and Comparative Endocrinology**, 84: 355-359, 1991.
- CHEATHAM, B & KAHN, R. Insulin action and the insulin signaling network. **Endocrine Reviews**, 16: 117-142, 1995.
- CUATRECASAS, P. Properties of the insulin receptor of isolated fat cell membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, 246: 7265-7274, 1971.
- CUATRECASAS, P. The insulin receptor. **Diabetes**, 21: 396-402, 1972.

- CUSHMAN, S. W. & WARDZALA, L. J. Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. **The Journal of Biological Chemistry**, **255**: 4758-4762, 1980.
- DA SILVA, R. S. M.; MACHADO, V. L. A.; MARQUES, M & WASSERMANN, G. F. Insulin binding sites and action in the adrenal glands from normal and streptozotocin diabetic rats. **Hormone and Metabolic Research**, **16**: 77-81, 1984.
- DE MEYTS, P. & ROTH, J. Cooperativity in ligand a new graphic analysis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **66**: 1118-1126, 1975.
- DE MEYTS, P.; BIANCO, A. R. & ROTH, J. Site-site interactions among insulin receptors. **The Journal of Biological Chemistry**, **251**: 1877-1888, 1976.
- DEBONS, A. F. & PITTMAN, J. A. Stimulation of alpha aminoisobutyric C¹⁴ uptake in thyroid slices by thyrotropin. **Endocrinology**, **70**: 937-940, 1962.
- DEBONS, A. F. & PITTMAN, J. A. Effect of hormones on aminoisobutyric acid uptake by bovine thyroid slices. **American Journal of Physiology**, **210**: 395-398, 1966.

DUNN, J. S.; KIRKPATRICK, J.; McLETCHIE, N. G. B. & TELFERS, S. V. Necrosis of the islet of Langerhans produced experimentally. **Journal of Pathology and Bacteriology**, **55**: 245-257, 1943.

EGGO, M. C.; BACHRACH, L. K. & BURROW, G. N. Interation of TSH, insulin and insulin-like growth factors in regulation thyroid growth and function. **Growth Factors**, **2**: 99-109, 1990.

EPPLE, A. & BRINN, J.E. Insulin. In **The Comparative Physiology of the Pancreatic Islets**, eds. Burggren, W.; Ishii, S.; Langer, H.; Neuweiler, G. Randall, D. J. & Farner, D. S. , Springer-Verlang, Berlin, chap. 10, pp. 82-122, 1987.

FIELD, J. B.; PASTAN, I.; JOHNSON, P. & HERRING, B. Stimulation in vitro of pathways of glucose oxidation in thyroïd by thyroïd-stimulating hormone. **The Journal of Biological Chemistry**, **235**: 1863-1866, 1960.

FOGLIA, V. G.; WAGNER, E. M.; BARROS, M. D. & MARQUES, M. La diabetes por pancreatectomia en la tortuga normal y hipofisopriva. **Revista de la Sociedad Argentina de Biologia**, **31**: 87-95, 1955.

- FORGUE, M. E. & FREYCHET, P. Insulin receptors in the heart muscle. Demonstration of specific binding sites and impairment of insulin binding in the plasma membrane of the obese hiperglycemic mouse. **Diabetes**, **24**: 715-723, 1975.
- FREYCHET, P.; ROSSELIN, G.; RANÇON, F.; FOUCHEREAU, M. & BROER, Y. Interations of insulin and glucagon with isolated rat liver cells. I. Binding of the hormones to specific receptors. **Hormone and Metabolic Research**, **5**: 72-78, 1974.
- FROESCH, E. R.; SHMID, C.; SCHWANDER, J. & ZAPP, J. Actions of insulin-like growth factors. **Annual Review of Physiology**, **47**: 443-467, 1985.
- GAGLIARDINO, J. J.; PESSACQ, M. T.; TURYN, D. & DELLACHA, J. M. Insulin binding to liver cells : a simple and useful in vivo model. **Hormone and Metabolic Research**, **12**: 300-303, 1980.
- GÄRTNER, R.; GREIL, W.; DEMHARTER, P. & HORN, K. Involvement of cyclic AMP, iodine and metabolites of arachidonic acid in the regulation of cell proliferation of isolated porcine thyroid follicles. **Molecular and Cellular Endocrinology**, **42**: 145-155, 1985.
- GINSBERG, B. H.; KAHN, C. R. & ROTH, J. The insulin receptor of the turkey erythrocyte: similarity to mammalian insulin receptors. **Endocrinology**, **100**: 82-90, 1977.

- GOLFINE, I. D. The insulin receptor: molecular biology and transmembrane signaling. **Endocrine Reviews**, 8: 235-255, 1987.
- GOULD, G. W. & HOLMAN, G. D. The glucose transporter family : structure, function and tissue-specific expression. **Biochemistry Journal**, 295: 329-341, 1993.
- GRAY, R. S.; BORSEY, D. Q.; SETH, J.; HERD, R.; BROWN, N. S. & CLARKE, B.F. Prevalence of subclinical thyroid failure in insulin-dependent diabetes. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 50: 1034-1037, 1980.
- GUANSING, A. R.; LEUNG, Y.; AJLOUNI, K. & HAGEN, T. C. The effects of hypoglycemia on TSH release in man. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 40: 755-758, 1975.
- GUIDOTTI, G. G.; BORGHETTI, A. F. & GAZZOLA, G. C. The regulation of amino acid transport in animal cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, 515: 329-366, 1978.
- HARAGUCHI, K.; RANI, C. S. S. & FIELD, J. B. Effects of thyrotropin, carbachol, and protein kinase-C stimulators on glucose transport and glucose oxidation by primary cultures of dog thyroid cells. **Endocrinology**, 123: 1288-1295, 1988
- HAVRANKOVA, J. & ROTH, J. Insulin receptor are widely distributed in the central nervous system of the rat. **Nature**, 272: 827-829, 1978.

- HAVRANKOVA, J.; SCHMECHEL, D. ; ROTH, J. & BROWNSTEIN, M. Identification of insulin in rat brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 75: 5737-5741, 1978.
- HAYES, N. ; BISWAS, C.; STROUT, H. V. & BERGER, J. Activation by protein synthesis inhibitors of glucose transport into L6 muscle cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 190: 881-887, 1993.
- HAZEL, J. R. & PROSSER, C. L. Molecular mechanism of temperature compensation in poikilotherms. **Physiological Reviews**, 54: 620-677, 1974.
- JEN, P. & OLEFSKY, J. Insulin binding to isolated human adipocytes. **Diabetes**, 23: 354, 1974. (Abstract)
- JOLÍN, T. & GONZÁLEZ, C. Thyroid iodine metabolism in streptozotocin-diabetic rats. **Acta Endocrinologica**, 88: 506-516, 1978
- JONES, J. I. & CLEMMONS, D. R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocrine Reviews**, 16: 3-34, 1995.
- JUNG, C. Y. & RAMPAL, A. L. Cytochalasin B binding sites and glucose transport carrier in human erythrocyte ghosts. **The Journal of Biological Chemistry**, 252: 5456-5463, 1977.

- JUNOD, A.; LAMBERT, A. E.; ORCI, L.; PICTET, R.; GONET, A. E. & RENOLD, A. E. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. **Proceedings of the Society for the Experimental Biology and Medicine**, **126**: 201-205, 1967.
- KAMIKUBO, K.; NAYFEH, S.N. & CHAE, C. B. Differential regulation of multiple c-erb A expression by thyrotropin, insulin and insulin-like growth factor I in rat thyroid FRTL-5 cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, **84**: 219-225, 1992.
- KASUGA, M.; VAN OBBERGHEN, E.; NISSLEY, S. P. & RECHLER, M. M. Demonstration of two subtypes of insulin-like growth factors receptors by affinity crosslinking. **Journal of Biological Chemistry**, **256**: 5305-5308, 1981.
- KONO, T. & BARHAM, F. W. The relationship between the insulin binding capacity of fat cells and cellular response to insulin: studies with intact and trypsin-treated fat cells. **The Journal of Biological Chemistry**, **246**: 6210-6216, 1971.
- KONO, T.; ROBINSON, F. W.; SARVER, J. A.; VEGA, F. V. & POINTER, R. H. Actions of insulin in fat cells. Effects of low temperature, uncouplers of oxidative phosphorylation, and respiratory inhibitors. **The Journal of Biological Chemistry**, **252**: 2226-2233, 1977.

- KUMARESAN, P. & TURNER, C. W. Effect of alloxan on thyroid hormone secretion rate and replacement therapy with insulin in rats. **Endocrinology**, 79:828-829, 1966.
- LANG, U.; KAHN, C. R. & CHRAMBACH, A. Characterization of the insulin receptor and insulin degradation activity from human lymphocytes by quantitative polyacrylamide gel electrophoresis. **Endocrinology**, 106: 40-48, 1980.
- LARSEN, P. R. & INGBAR, S. H. The thyroid gland. In: Wilson, J. D. & Foster, D. W (eds.), **Textbook of Endocrinology**, pp. 357-487, W. B. Saunders Company. Harcourt Brace Javanovich, Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo. 8^a Edição, 1992.
- LE CAM, A. & FREYCHET, P. Effect of insulin and amino acid transport in isolated rat hepatocytes. **Diabetologia**, 15 : 117-123, 1978.
- LE MARCHAND-BRUSTEL, Y.; JEANRENAUD, B. & FREYCHET, P. Insulin-binding and effects in isolated soleus muscle of lean and obese mice. **American Journal of Physiology**, 234 : E-348-E-358, 1978.

- LEUNG, Y; GUANSING, A.R.; AJLOUNI, K.; HAGEN, T. C.; ROSENFELD, P. S. & BARBORIAK, J. J. The effect of hypoglycemia on hypothalamic thyrotropin-releasing hormone (TRH) in the rat. **Endocrinology**, **97**: 380-384, 1975.
- LICHT, P.; PAVGI, S. & DENVER, R. J. The role of hormone binding in the cold suppression of hormone stimulation of the pituitary, thyroid and testis of the turtle. **General and Comparative Endocrinology**, **80**: 381-392, 1990.
- LICHT, P.; DENVER, R. J.; PAVGI, S. & HERRERA, B. Seasonality in plasma thyroxine binding in turtles. **The Journal of Experimental Zoology**, **260**: 59-65, 1991.
- LIENHARD, G. E.; SLOT, J. W.; JAMES, D. E. & MUECKLER, M. M. How cells absorb glucose. **Scientific American**, **266** : 34-39, 1992.
- LOPES, N. The action of alloxan in the turtle *Pseudemys d'orbigny* D and B. **Acta Physiologica Latinoamericana**, **5**: 39-45, 1955.
- LYNN, W, G.; McCORNIC, J. J. & GREGOREK, J. C. Environmental temperature and thyroid function in the lizard *Anolis carolinensis*. **General and Comparative Endocrinology**, **5**: 587-595, 1965.

- MACHADO, V. L. A.; DA SILVA, R. S. M. ; MARQUES, M. & WASSERMANN, G. F. Insulin specific uptake and action on deoxyglucose transport in rat adrenal glands. **IRCS Medical Science**, **10**: 459-460, 1982.
- MACHADO, V. L. A.; DA SILVEIRA, C. M.; BELLÓ, A. A. & WASSERMANN, G. F. Influence of preincubation for the *in vitro* study of hormone actions. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, **28**: 461-465, 1985.
- MAK, W. W.; EGGO, M. C. & BURROW, G. N. Thyrotropin regulation of plasminogen activator activity in primary culture of ovine thyroid cell. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **123**: 633-640, 1984.
- MARQUES, M.; BELLÓ, A. A.; MACHADO, V. L. A.; TURYN, D. & DELLACHA, J. M. *In vivo* specific uptake of labeled insulin by liver, adipose tissue, pituitary, and adrenals in the turtle *Chrysemys dorbigni*. **General and Comparative Endocrinology**, **48**: 89-97, 1982.
- MARQUES, M.; COUTINHO, L. M. B.; DA SILVA, R. S. M.; TURYN, D. & DELLACHA, J. M. *In vivo* specific uptake of labeled insulin by turtle (*Chrysemys dorbigni*) thyroid gland. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **17** : 65-74, 1984.

- MARQUES, M.; DA SILVA, R. S. M ; TURYN, D. & DELLACHA, J. M. Specific uptake and degradation of ^{125}I labeled insulin by turtle (*Chrysemys dorbigni*) thyroid glands. **General and Comparative Endocrinology**, 60: 306-314, 1985.
- MASSAGUE, J.; PILCH, P. F. & CZECH, M. P. Electrophoretic resolution of three major insulin receptor structures with unique subunit stoichiometries. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 77: 7137-7141, 1980.
- MIAN, N. ; ANDERSON, C. E. & KENT, P. W. Effect of sulphated glycopeptides on kinetics of 3-O-methyl glucose and 2-deoxyglucose transport by epithelial cells isolated from rabbit small intestine. **European Journal of Biochemistry**, 97: 197-204, 1979.
- MOURA, E. G.; PAZOS, C. C. & ROSENTHAL, D. Insulin deficiency impairs thyroid peroxidase activity: a study in experimental diabetes mellitus. In: Medeiros N & Gaitan E (Eds), **Frontiers in Thyroidology**, 1: 627-630, Plenum Medical Book, New York, 1986.
- MUGGEO, M.; GINSBERG, B. H.; ROTH, J.; NEVILLE, D. M.; DE MEYTS, P. & KAHN, R. The insulin receptor in vertebrates is functionally more conserved during evolution than insulin itself. **Endocrinology**, 104: 1393-1402, 1979.

- MUNIZ, W. W. & MARQUES, M. Glycemia and immunohistochemical changes in the endocrine pancreas of the turtle *Chrysemys dorbigni* treated with streptozotocin. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **22**: 1033-1037, 1989.
- NARAHARA, H. & GREEN, J. D. Action of insulin on the transport of 3-O-Methylglucose in frog sartorius muscles. Kinetic evidence of multiple effects. **The Journal of Biological Chemistry**, **258**: 6120-6124, 1983.
- NIE, N. N.; HULL, C. H.; NKINS, J. G. J.; STETNBRENNER, K. & BENT, D. H. Statistical package for the Social Sciences. McGraw-Hill, New York, 1975.
- OLEFSKY, J. M.; JOHNSON, J.; LIU, F.; EDWARDS, P. & BAUR, S. Comparison of [125 I]insulin binding and degradation to isolated rat hepatocytes and liver membranes. **Diabetes**, **24**: 801-810, 1975.
- OLEFSKY, J. M.; BERHANU, M. P.; SAEKOW, M.; HEIDENREICH, K. & GREEN, A. Internalization and intracellular processing of insulin receptors in adipocytes. **Metabolism**, **31**: 670-690, 1982.
- PACOLD, S. T. & BLACKARD, W. G. Central nervous system insulin receptors in normal and diabetic rats. **Endocrinology**, **105**: 1452-1457, 1979.

- POSNER, B. I.; KELLY, P. A.; SHIU, R. P. C. & FRIESEN, H. G.
Studies of insulin, growth hormone and prolactin binding : tissue distribution, species variation and characterization. **Endocrinology**, **95**: 521-531, 1974.
- RAIZADA, M. K.; YANG, J. W. & FELLOWS, R. E. Binding of ¹²⁵I-insulin to specific receptors and stimulation of nucleotide incorporation in cells cultured from rat brain. **Brain Research**, **200**: 389-400, 1980.
- RECHLER, M. M.; ZAPF, J.; NISSLEY, S. P.; FROESCH, E. R.; MOSES, A. C.; PODSKALNY, J. M.; SCHILLING, E. E. & HUMBEL, R. E. Interactions of insulin-like growth factors I and II and multiplication-stimulating activity with receptors and serum carriers protein. **Endocrinology**, **107**: 1451-1459, 1980.
- RERUP, C. C. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. **Pharmacological Review**, **22**: 485-518, 1970.
- ROGER, P. P.; SERVAIS, P. & DUMONT, J. E. Induction of DNA synthesis in dog thyrocytes in primary culture: synergistic effects of thyrotropin and cyclic AMP with epidermal growth factor and insulin. **Journal of Cellular Physiology**, **130**: 58-67, 1987.
- ROTELLA, C. M.; PIANI, F.; FREDIANI, U. & TOCCAFONDI, R. Regulation of amino acid transport in rat and human thyroid cells. **Acta Endocrinologica**, **121**: 759-766, 1989.

ROTHENBERG, P. L.; LANE, W. S.; KARASIK, A.; BACKER, J.; WHITE, M. & KAHN, C. R. Purification and partial sequence analysis of pp185, the major cellular substrate of the insulin receptor tyrosine kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, **266**: 8302-8311, 1991.

SANVITTO, G. L.; MARQUES, M. TURYN, D. & DELLACHA, J. M.. *In vivo* [¹²⁵I]insulin specific uptake by rat brain areas. **Medical Science Research**, **16** : 691-692, 1988.

SCHRÖDER VAN DER ELTS, J. P. & VAN DER HEIDE, D. Effects of streptozotocin-induced diabetes and food restriction on quantities and source of T₄ and T₃ in rat tissues. **Diabetes**, **41** : 147-152, 1992.

SEGAL, S.; ROTH, H.; BLAIR, A. & BERTOLI, D. Accumulation of amino acids by thyroid gland slices. **Endocrinology**, **79**: 675-680, 1966.

SERIF, G. S. & SIHOTANG, K. Thyroid iodine metabolism in the alloxanized rat. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, **109**: 950-952, 1962.

SHANAHAN, M. F. Modulation of hexose transport in cultured skeletal muscle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, **38**: 171-178, 1984.

- SHOTWELL, M. A.; KILBERG, M. S. & OXENDER, D. L. The regulation of neutral amino acid transport in mammalian cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, **737**: 267-287, 1977.
- SIMON, J.; FREYCHET, P. & ROSSELIN, G. A study of insulin binding sites in the chicken tissues. **Diabetologia**, **13**: 219-228, 1977.
- SINGH, V. N.; NATAF, B. M. & CHAIKOFF, I. L. The effect of insulin on the formation of protein and ribonucleic acid by fetal rat thyroid glands in organ culture. **Life Sciences**, **4** : 1603-1609, 1965.
- SMITH, R.M.; CHARRON, M. J.; SHAH, N.; LODISH, H. F. & JARETT, L. Immunoelectron microscopic demonstration of insulin-stimulated translocation of glucose transporters to the plasma membrane of isolated rat adipocytes and masking of the carboxyl-terminal epitope of intracellular GLUT 4. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, **88**: 6893-6897, 1991.
- SOMERO, G. N. Temperature adaptation of enzymes: Biological optimization through structure function compromises. **Annual Review of Ecology and Systematics**, **9**: 1-29, 1978.
- STUART, C. A.; FURLANETTO, R. W. & LEOVITZ, H. E. The insulin receptor of embryonic chicken cartilage. **Endocrinology**, **105**:1293-1302, 1979.

- STRAUS, D. S. Effects of insulin on cellular growth and proliferation. **Life Science**, **29**: 2131-2139, 1981.
- TESSARI, P. Effects of insulin on whole-body and regional amino acid metabolism. **Diabetes / Metabolism Reviews**, **10**: 253-285, 1994.
- TODE, B.; ROTELLA, C. M.; SERIO, M.; GALLI, G.; FRANCESCHELLI, F.; TANINI, A & TOCCAFONDI, R. Insulin-like growth factor-I: autocrine secretion by human thyroid follicular cells in primary culture. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, **69**: 639-646, 1989.
- TRAMONTANO, D.; MOSES, A. C.; PICONE, R. & INGBAR, S. H. Characterization and regulations of the receptor for insulin-like growth factor I in the FRTL-5 rat thyroid follicular cell line. **Endocrinology**, **120**: 785-790, 1987.
- TRISCHITTA, V.; DAMANTE, G.; FOTI, D. & FILLETI, S. Insulin binding and biological activities in the FRTL-5 rat thyroid cell line. **Metabolism** **36**: 379-383, 1987.
- TURYN, D.; DA SILVA, R. S. M.; MARQUES, M. & DELLACHA, J. M. Characterization of the insulin-binding sites in turtle thyroid microsomes. **Journal of Endocrinology**, **108**: 157-162, 1986.

- VAN WYK, J. J.; UNDERWOOD, L. E.; HINTZ, R. L.; CLEMMONS, D. R.; VOINA, S. J. & WEAVER, R. P. The somatomedins: a family of insulin-like hormones under growth hormone control. **Recent Progress in Hormone Research**, **30**: 259-319, 1974.
- WANG, J. F.; HILL, D. J. & BECKS, G. P. Role of 3',5'cyclic adenosine monophosphate and protein kinase C in the regulation of insulin-like growth factor-binding protein secretion by thyroid-stimulating hormone in isolated ovine thyroid cells. **Journal of Endocrinology**, **141**: 231-242, 1994.
- ZAPF, J.; SCHOENLE, E. & FROESCH, E. R. Insulin-like growth factors I and II: some biological actions and receptor binding characteristics of two purified constituents of nonsuppressible insulin-like activity of human serum. **European Journal of Biochemistry**, **87**: 285-296, 1978.

ANEXO

PUBLICAÇÕES

VERA LÚCIA ANDRADE MACHADO

A partir dos resultados obtidos nos experimentos realizados neste trabalho, foram publicados os seguintes artigos:

Título: *In vitro* effect of insulin on the uptake of glucose and α -aminoisobutyric acid in the thyroid gland of the turtle *Chrysemys dorbigni*.

Autores: V. L. A. MACHADO, G.F.WASSERMANN & M. MARQUES.

**Revista: GENERAL AND COMPARATIVE ENDOCRINOLOGY,
82: 08-13, 1991.**

Título: Effects of insulin on the glucose uptake by the thyroid gland of the turtle *Chrysemys dorbigni* acclimated to different temperatures

Autores: V. L. A. MACHADO & M. MARQUES

**Revista: THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY,
266: 284-289, 1993.**

Título: Decreased basal and insulin-stimulated uptake of glucose and amino acid by the thyroid glands from streptozotocin-diabetic rats

Autores: V. L. A. MACHADO & M. MARQUES

Revista: BRAZILIAN JOURNAL OF MEDICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH (Trabalho enviado para publicação)

In Vitro Effect of Insulin on the Uptake of Glucose and α -Aminoisobutyric Acid in the Thyroid Gland of the Turtle (*Chrysemys dorsbigni*)

VERA LUCIA A. MACHADO, GUILLERMO F. WASSERMANN, AND MARIA MARQUES

Departamento de Fisiologia and Centro de Endocrinologia Experimental, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90049, Porto Alegre-RS, Brazil

Accepted March 21, 1990

The presence of specific insulin binding sites in the thyroid gland of the turtle *Chrysemys dorsbigni* has been previously reported. The purpose of the present work was to investigate the probable action of insulin on the uptake of [14 C]deoxy-D-glucose ([14 C]DG) and [14 C] α -aminoisobutyric acid ([14 C]AIB) in turtle (*C. dorsbigni*) thyroid glands *in vitro*. Thyroid fragments (± 40 mg) were incubated at 25° in Krebs-Ringer-bicarbonate buffer containing 0.2 μ Ci of [14 C]DG or [14 C]AIB without or with bovine insulin at different periods of time. The uptake of [14 C]DG and [14 C]AIB increased with incubation time. The presence of insulin (7×10^{-6} M) in the incubation medium during 240 min did not modify the [14 C]DG uptake. However if the thyroid fragments were previously incubated with insulin (60 min) and then incubated (240 min) with the same concentration of the hormone, the [14 C]DG uptake was markedly increased. This stimulatory effect of insulin was dose-dependent. In similar experimental conditions, insulin also produced a significant increase in the uptake of [14 C]AIB. Therefore, these findings strongly support the hypothesis that insulin might exert a direct action on the thyroid function. © 1991 Academic Press, Inc.

Previous studies employing an *in vivo* technique have demonstrated specific uptake of labeled insulin by the thyroid gland from the turtle *Chrysemys dorsbigni* pre-treated with potassium iodide. The treatment prevented the accumulation of radioactive iodide resulting from degradation of 125 I-insulin (Marques *et al.*, 1984). Further studies on labeled insulin uptake, dissociation, and degradation in isolated turtle thyroid glands (Marques *et al.*, 1985) and on the characteristics of the insulin-binding to thyroid microsomes (Turyn *et al.*, 1986) indicate that this gland contains specific binding sites for insulin. Therefore it seemed valid to investigate whether insulin might exert a direct biological action on the thyroid function.

It is well known that the insulin bound to cell surface receptor stimulates the glucose and amino acid transport in the classical target tissues for this hormone (Goldfine,

1987). The present work was performed to examine insulin stimulation of the uptake of deoxy-D-glucose and α -aminoisobutyric acid in isolated turtle thyroid tissue.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Female adult *C. dorsbigni* turtles (1.2-1.6 kg body wt) were collected from a local natural population in the southern region of Brazil. The animals were housed in a large tank continuously flushed with tap water, with a mound of dry sand in the middle, and kept at environmental temperature. They were fed on fresh meat *ad libitum*. One day before the experiments, the turtles were kept in the laboratory without food at environmental temperature. All the experiments were performed during spring and summer.

Chemicals

Crystalline bovine insulin was purchased from Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO); 1-[14 C]-2-deoxy-D-glucose (sp act 39 mCi/mmol; [14 C]DG) and

α -1- ^{14}C 2-aminoisobutyric acid (sp act 29 mCi/mmol; ^{14}C AIB) were obtained from Amersham International.

Experimental Procedure

Turtles previously anesthetized with sodium pentobarbital (25 mg/kg body wt) were opened on the ventral side of the shell with an electric saw. The thyroid glands were immediately removed and placed in a Petri dish containing cool-incubating medium and cut into four fragments, each one weighing about 40 mg. Each fragment was then incubated at 25° in 1 ml of Krebs-Ringer-bicarbonate buffer (KRB), pH 7.4, in the presence of 0.2 μCi of ^{14}C DG or ^{14}C AIB for different periods of time. The incubation was performed in a Dubnoff incubator with an atmosphere of $\text{O}_2:\text{CO}_2$ (95:5, v/v).

Experiment 1: Time curves. Thyroid fragments were incubated under the above conditions with ^{14}C DG for 60, 120, 240, 360, and 420 min and with ^{14}C AIB for 60, 120, 180, 240, and 300 min.

Experiment 2: Influence of preincubation. The thyroid tissues were previously incubated (60 min) without or with insulin (7×10^{-6} M), and, respectively, incubated (240 min) in the absence or presence of the same concentration of the hormone plus 0.2 μCi of ^{14}C DG.

Experiment 3: Insulin dose-response curves. Thyroid fragments were preincubated (60 min) and incubated (240 min) with different concentrations of insulin (7×10^{-10} to 7×10^{-6} M). ^{14}C DG (0.2 μCi) was added at the beginning of the incubation period. For the studies on the ^{14}C AIB (0.2 μCi) uptake, the thyroid fragments were preincubated (90 min) and incubated (210 min) in the absence or presence of graded concentrations of insulin (7×10^{-10} to 7×10^{-6} M).

Following the incubation, thyroid fragments were rapidly blotted on filter paper, immediately transferred to screw-cap tubes containing 1 ml distilled water, and alternatively frozen and boiled. Aliquots (25 μl) of this solution and of the incubation medium were used for radioactive counting in a LKB-Rack β liquid scintillation spectrometer. The counting efficiency was 85–90%. The results are expressed as tissue/medium (T/M) rate, that is, dpm/ml tissue fluid per dpm/ml incubation medium (mean \pm SEM). The number of thyroid fragments used in each experiment is shown in the figures.

Statistical Analysis

Data from the experiments were analyzed by one-way ANOVA and post hoc tests were carried out by Duncan's multiple range test whenever suitable. All tests were performed with the Statistical Package for

the Social Sciences (SPSS) on an SID-502 in order to facilitate data interpretation (Nie *et al.*, 1975). The unpaired Student's *t* test was also used in some experiments (see figures).

RESULTS

Uptake of ^{14}C DG and ^{14}C AIB

The uptake of ^{14}C DG by the turtle thyroid gland incubated at 25° increased progressively for 2–7 hr after which it reached a plateau (Fig. 1). The ^{14}C AIB uptake by the thyroid tissue also increased as a function of the incubation time (Fig. 2).

Insulin Action on ^{14}C DG and ^{14}C AIB Uptake

When the gland was not preincubated, the addition of insulin (7×10^{-6} M) into the incubation medium containing 0.2 μCi of ^{14}C DG did not modify the tissue/medium rate of radioactivity (Fig. 3). When the thyroid tissue was preincubated only in buffer during 60 min prior to the addition of insulin together with the ^{14}C DG, the T/M ratio

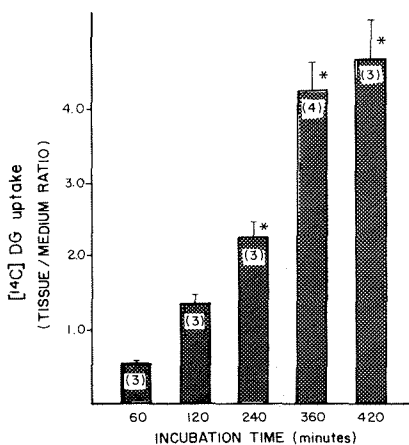


FIG. 1. Uptake of ^{14}C deoxy-D-glucose in turtle thyroid glands incubated at 25° for different times. At the stated times, thyroid tissues were processed as indicated under Materials and Methods. Results are expressed as tissue/medium ratio: dpm/ml tissue fluid per dpm/ml incubation medium. Data are given as means \pm SEM. In parentheses, number of samples. *Significantly different from 60 min, $P < 0.05$ (One-way ANOVA and Duncan's multiple range test).

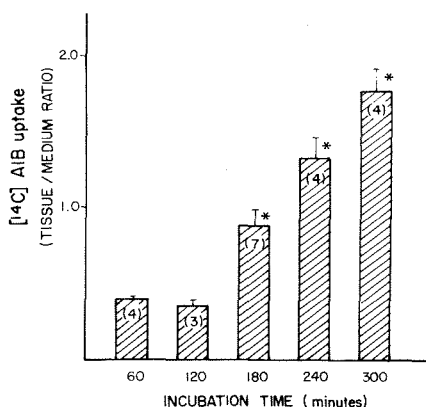


FIG. 2. Uptake of [^{14}C]AIB in turtle thyroid glands incubated at 25° for different times. At the stated times, thyroid tissues were processed as indicated under Materials and Methods. Results are expressed as tissue/medium ratio: dpm/ml tissue fluid per dpm/ml incubation medium. Data are given as means \pm SEM. In parentheses, number of samples. *Significantly different from 60 min, $P < 0.05$ (One-way ANOVA and Duncan's multiple range test).

increased slightly but not significantly. However, when insulin was present in the preincubation (60 min) and in the incubation medium (240 min), the uptake of [^{14}C]DG by the thyroid tissue was markedly increased. Table 1 presents the T/M values obtained in thyroid fragments incubated with graded concentrations of insulin. The lowest insulin dose that produced significant increment on the [^{14}C]DG uptake was $7 \times 10^{-9} M$. Lower concentrations of insulin such as $7 \times 10^{-10} M$ increased [^{14}C]DG uptake (14%), but it was not statistically significant.

Table 2 shows the effects of graded concentrations of insulin on the [^{14}C]AIB uptake by the turtle thyroid. The lowest insulin dose that significantly increased the [^{14}C]AIB uptake was $7 \times 10^{-9} M$. Lower concentrations ($7 \times 10^{-10} M$) induced an increment of 13% on the [^{14}C]AIB uptake (not significant).

Figure 4 illustrates the stimulatory effect of insulin ($7 \times 10^{-6} M$) on the uptake of [^{14}C]DG and [^{14}C]AIB in the turtle thyroid gland. In spite of differences on the uptake

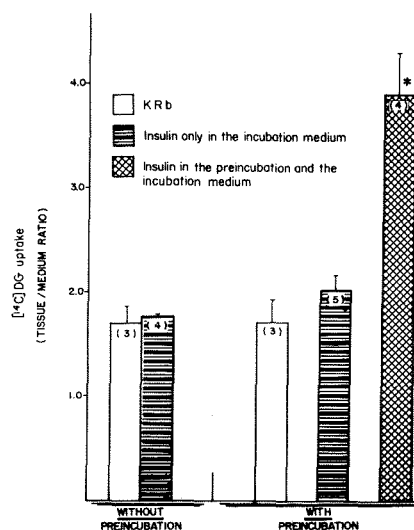


FIG. 3. Effect of preincubation on the insulin action on the [^{14}C]deoxy-D-glucose uptake by turtle thyroid glands. Thyroid tissues were incubated at 25° in KRb without or with insulin ($7 \times 10^{-6} M$) plus $0.2 \mu\text{Ci}$ of [^{14}C]DG. Preincubation (60 min) and incubation (240 min). Results are expressed as tissue/medium ratio: dpm/ml tissue fluid per dpm/ml incubation medium. Data are given as means \pm SEM. In parentheses, number of samples. No significant difference without preincubation (Student's t test, left side). *Significantly different from control and from tissue preincubated without insulin, $P < 0.05$ (One-way ANOVA and Duncan's multiple range test).

of both substrates, the presence of insulin in the preincubation and incubation medium induces similar marked increases on the uptake of [^{14}C]DG (72%) and of [^{14}C]AIB (96%).

DISCUSSION

Under our *in vitro* experimental conditions, the turtle thyroid was able to transport efficiently [^{14}C]deoxy-D-glucose and [^{14}C]aminoisobutyric acid. This phenomenon was time-dependent for both substrates. Mammalian insulin was used in this study since sufficient amount of purified turtle hormone was not available. However, we have recently identified the complete insulin sequence of *C. dorbigni* and have found that it retains the common fea-

TABLE 1
EFFECTS OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF
INSULIN ON [¹⁴C] DEOXY-D-GLUCOSE UPTAKE BY
TURTLE THYROID GLANDS INCUBATED AT 25°

Insulin (mol)	No. of fragments	[¹⁴ C]DG uptake (tissue/medium ratio)	Increase over thyroids without insulin (%)
None	8	2.71 ± 0.20 ^a	—
7 × 10 ⁻¹⁰	3	3.09 ± 0.06	14
7 × 10 ⁻⁹	4	4.01 ± 0.64*	48
7 × 10 ⁻⁸	3	4.22 ± 0.48*	56
7 × 10 ⁻⁷	4	4.25 ± 0.56*	57
7 × 10 ⁻⁶	9	4.26 ± 0.17*	57

Note. Thyroid fragments were preincubated without or with different concentrations of insulin during 60 min followed by incubation for 240 min in the presence of the same concentration of the hormone plus [¹⁴C]DG (0.2 μCi/mmol).

^a Mean ± SEM.

* Significantly different ($P < 0.05$) from thyroid glands incubated without insulin (One-way ANOVA and Duncan's multiple range test).

tures of vertebrate insulins and differs from bovine insulin by three residues (8,9,10) in the A-chain and three (1,2,27) in the B-chain (unpublished results). Furthermore it

TABLE 2
EFFECTS OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF
INSULIN ON [¹⁴C] AMINO ACID UPTAKE BY TURTLE
THYROID GLANDS INCUBATED AT 25°

Insulin (mol)	No. of fragments	[¹⁴ C]AIB uptake (tissue/medium ratio)	Increase over thyroids without insulin (%)
None	9	0.58 ± 0.06 ^a	—
7 × 10 ⁻¹⁰	4	0.66 ± 0.02	13
7 × 10 ⁻⁹	3	1.04 ± 0.04*	79
7 × 10 ⁻⁸	4	0.93 ± 0.17*	60
7 × 10 ⁻⁷	3	1.11 ± 0.05*	91
7 × 10 ⁻⁶	4	1.26 ± 0.11*	117

Note. Thyroid fragments were preincubated without or with different concentrations of insulin during 90 min followed by incubation for 210 min in presence of the same concentration of the hormone plus [¹⁴C]AIB (0.2 μCi/mol).

^a Mean ± SEM.

* Significantly different ($P < 0.05$) from thyroid glands incubated without insulin (One-way ANOVA and Duncan's multiple range test).

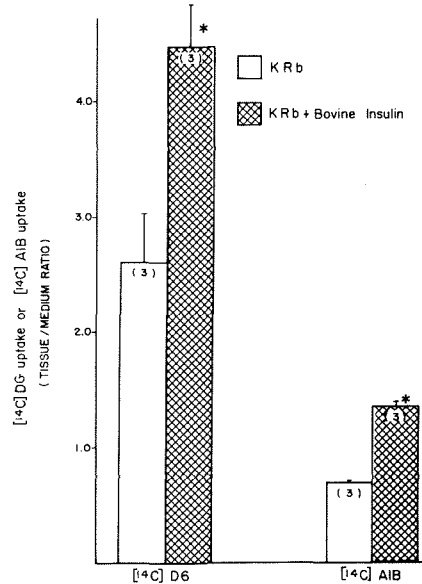


FIG. 4. Comparative effect of insulin on the uptake of [¹⁴C]deoxy-D-glucose and [¹⁴C]aminoisobutyric acid by turtle thyroid glands incubated at 25°. Bovine insulin (7 × 10⁻⁶ M) was present in both preincubation and incubation medium. [¹⁴C]deoxy-D-glucose (0.2 μCi/ml): 60 min preincubation and 240 min incubation. [¹⁴C]AIB (0.2 μCi/ml): 90 min preincubation and 210 min incubation. Data are given as means ± SEM. In parentheses, number of samples. *Significantly different from the respective control, $P < 0.05$ (Student's *t* test).

has been previously reported that bovine insulin is able to cause a decrease in blood glucose as well as to compete with labeled insulin uptake by the liver and adipose tissue in turtles (Marques *et al.*, 1982). Bovine insulin was used to demonstrate the presence of specific insulin-binding sites in the turtle thyroid gland (Marques *et al.*, 1984, 1985; Turyn *et al.*, 1986).

Bovine insulin produced a marked stimulatory effect on the uptake of glucose when the thyroid tissue was preincubated and incubated in the presence of the hormone (Fig. 3). Without a preincubation period or with a preincubation period free of exogenous insulin no significant increase of DG uptake was seen. A preincubation period was also absolutely indispensable in order to detect the FSH effect on rat testes (Cruz Curte and Wasserman, 1985). In rat

pituitary and adrenal gland a preincubation period without insulin was sufficient to allow a full manifestation of the hormone stimulatory action on DG as well as on AIB uptake (Machado *et al.*, 1985). In the turtle thyroid the presence of the hormone was necessary during the preincubation period. The explanation for this discrepancy is not known. It is difficult to compare our finding with those obtained in the pituitary and adrenal gland of the rat due to differences in the experimental conditions such as temperature and incubation time, as well as the differences in the tissues and animal species involved. Further studies will be required to explain these differences.

In addition, the stimulatory effect of insulin on the uptake of glucose in the turtle thyroid gland was dose-dependent. The lowest concentration of insulin that induced a significant increase on [¹⁴C]DG uptake was in the order of 7×10^{-9} M. This value is similar to those found in the rat left atria (Bihler *et al.*, 1980), in rat pituitary (Belló *et al.*, 1982), and in rat adrenal gland (da Silva *et al.*, 1984). Probably insulin increases glucose transport via the facilitated diffusion system as has been shown in many tissues (Goldfine, 1987).

We have also shown that insulin stimulated the [¹⁴C]AIB uptake in the turtle thyroid gland. The lowest effective dose was also 7×10^{-9} M. A stimulatory effect of insulin on amino acid uptake has been reported for a variety of biological preparations including skeletal and cardiac muscle, fat cells, and hepatocytes (Guidotti *et al.*, 1978). Recently, a similar action of insulin was also reported on rat adrenal gland (Wassermann *et al.*, 1989). Brisson-Lougarre *et al.* (1978) demonstrated a stimulatory action of insulin on protein biosynthesis in the dog thyroid. It has also been found in thyroid glands of fetal rats that the insulin increases considerably the incorporation of [¹⁴C]adenine into ribonucleic acid (Singh *et al.*, 1965).

The evidences for a direct action of insulin on the thyroid metabolism shown in this

paper might explain various abnormalities of thyroid function described in diabetes mellitus. Clinical as well as subclinical hypothyroidism has been shown to occur with frequency in insulin-dependent diabetes (Gray *et al.*, 1980). A decreased release of ¹³¹I or iodinated compounds from labeled thyroid glands was observed in alloxan-treated rats (Kumaresan and Turner, 1966). Streptozotocin-diabetic mice showed decreased thyroidal response to thyrotropin, which was restored upon treatment with insulin (Bagchi *et al.*, 1981). Decrease of thyroid peroxidase activity and the thyroid hormone biosynthesis has been found in streptozotocin-diabetic rats (Moura *et al.*, 1986). In nonmammalian vertebrates, reports on insulin-thyroid function interaction are scarce. It is worthwhile mentioning that acute insulin deficiency obtained by the administration of antimammalian insulin serum to the pacific hagfish (*Eptatretus stouti*) produced elevation of plasma glucose and decreased levels of plasma triiodothyronine (Plisetskaya *et al.*, 1983).

The present study supports our previous data on the presence of specific insulin-binding sites in the turtle thyroid gland and the hypothesis that this hormone might exert a direct biological action on this gland. Further investigations must be extended to other metabolic aspects of the thyroid function under the influence of insulin as well as to this hormonal interaction in other animal species.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from Financiadora de Estudos e Projetos (Convênio No. 43.87.0846.00) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. We are very grateful to Ms. Maria Alice Ferreira Machado for her technical assistance.

REFERENCES

- Bagchi, N., Brown, T. R., Shivers, B., Lucas, S., and Mack, R. E. (1981). Decreased thyroidal response to thyrotropin in diabetic mice. *Endocrinology* 109, 1428-1432.

- Belló, A. A., da Silveira, C. M., Wassermann, G. F., Turyn, D., and Dellacha, J. M. (1982). Insulin specific uptake, degradation and action on deoxyglucose transport in rat pituitary gland. *IRCS Med. Sci.* 10, 121-122.
- Bihler, I., Charles, P., and Sawh, P. C. (1980). Effects of the calcium ionophore A-23187 on the regulation of sugar transport in muscle. *Cell Calcium* 1, 237-336.
- Brisson-Lougarre, A., Blum, C., and De Nayer, Ph. (1978). Action of insulin on thyroid protein synthesis in dogs. *Horm. Metab. Res.* 10, 396-400.
- Cruz Curte, A., and Wassermann, G. F. (1985). Identification of amino acid transport system stimulated by FSH in rat testis. *J. Endocrinol.* 106, 291-294.
- da Silva, R. S. M., Machado, V. L. A., Marques, M., and Wassermann, G. F. (1984). Insulin binding sites and action in the adrenal glands from normal and streptozotocin diabetic rats. *Horm. Metab. Res.* 16, 77-81.
- Goldfine, I. D. (1987). The insulin receptor: Molecular biology and transmembrane signaling. *Endocr. Rev.* 8, 235-255.
- Gray, R. S., Borse, D. O., Seth, J., Herd, R., Brown, N. S., and Clarke, B. F. (1980). Prevalence of subclinical thyroid failure in insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 50, 1034-1037.
- Guidotti, G. G., Borghetti, A. F., and Gazzola, G. C. (1978). The regulation of amino acid transport in animal cells. *Biochim. Biophys. Acta* 515, 329-366.
- Kumaresan, P., and Turner, C. W. (1966). Effect of alloxan on thyroid hormone secretion rate and replacement therapy with insulin in rats. *Endocrinology* 79, 828-829.
- Machado, V. L. A., da Silveira, C. M., Belló, A. A., and Wassermann, G. F. (1985). Influence of preincubation for the *in vitro* study of hormone actions. *Arq. Biol. Tecnol.* 28, 461-465.
- Marques, M., Belló, A. A., Machado, V. L. A., Turyn, D., and Dellacha, J. M. (1982). *In vivo* uptake of labeled insulin by liver, adipose tissue, pituitary and adrenals in turtle *Chrysemys dorsibigni*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 48, 89-97.
- Marques, M., Coutinho, L. M. B., da Silva, R. S. M., Turyn, D., and Dellacha, J. M. (1984). *In vivo* specific uptake of labeled insulin by turtle (*Chrysemys dorsibigni*) thyroid gland. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 17, 65-74.
- Marques, M., da Silva, R. S. M., Turyn, D., and Dellacha, J. M. (1985). Specific uptake, dissociation and degradation of ¹²⁵I-labeled insulin in isolated turtle (*Chrysemys dorsibigni*) thyroid glands. *Gen. Comp. Endocrinol.* 60, 306-314.
- Moura, E. G., Pazos, C. C., and Rosenthal, D. (1986). Insulin deficiency impairs thyroid peroxidase activity: A study in experimental diabetes mellitus. In "Frontiers in Thyroidology" (G. Medeiros-Neto and E. Guitan, Eds.), pp. 627-630. Plenum, New York.
- Nie, N. N., Hull, C. H., Nkins, J. G. J., Stetnbrenner, K., and Bent, D. H. (1975). "Statistical Package for the Social Sciences." McGraw-Hill, New York.
- Plisetskaya, E., Sower, S. A., and Gorbman, A. (1983). The effect of insulin insufficiency on plasma thyroid hormones and some metabolic constituents in pacific hagfish *Eptatretus stouti*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 49, 315-319.
- Singh, V. N., Nataf, B. M., and Chaikoff, I. L. (1965). The effect of insulin on the formation of protein and ribonucleic acid by fetal rat thyroid glands in organ culture. *Life Sci.* 4, 1603-1609.
- Turyn, D., da Silva, R. S. M., Marques, M., and Dellacha, J. M. (1986). Characterization of the insulin-binding sites in turtle thyroid microsomes. *J. Endocrinol.* 108, 157-162.
- Wassermann, G. F., Fauth, M. G., and Machado, V. L. A. (1989). Insulin action on amino acid uptake by rat adrenal glands *in vitro*. *Med. Sci. Res.* 17, 675-676.

Effects of Insulin on the Glucose Uptake by the Thyroid Gland of the Turtle *Chrysemys dorbigni* Acclimated to Different Temperatures

VERA L.A. MACHADO AND MARIA MARQUES

Departamento de Fisiologia and Centro de Endocrinologia Experimental, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050-170, Porto Alegre, Brazil

ABSTRACT Insulin stimulation of the glucose uptake by the thyroid gland of the turtle (*Chrysemys dorbigni*) has been previously reported. The aim of the present study was to examine the influence of different temperatures (6, 25, or 36°C) on this effect. Insulin-stimulated glucose uptake was evident when turtles were acclimated for 15 days at 25° or 36°C, and their glands studied at the respective temperatures. In glands from turtles acclimated at 6°C, this effect was only seen when the preincubation and incubation time was extended from 60 to 300 min. The findings show that in this ectotherm species (1) the insulin effect is temperature dependent, and (2) can be expressed at very low temperature. © 1993 Wiley-Liss, Inc.

Previous studies in vivo and in vitro showed the presence of specific insulin-binding sites in the thyroid gland of the turtle *Chrysemys dorbigni* (Marques et al., '84, '85; Turyn et al., '86). At 6°C, the thyroid gland of these animals degraded insulin after a long incubation time with the labelled hormone. These data, indicating an insulin effect on the turtle's thyroid gland at these low temperatures, are in apparent contrast to findings on mammalian adipocytes where internalization and intracellular processing of insulin and insulin receptors are inhibited at low temperatures (Olefsky et al., '82). However, when turtles are subjected to a long-term, persistent thermal change, adaptive alterations will allow the animals to continue physiological activities. The underlying biochemical adjustments occur gradually and generally require weeks for completion (Hazel and Prosser, '74).

Since insulin stimulates glucose and amino acid uptake in the thyroid gland of turtles in vitro (Machado et al., '91), we wondered to what degree different temperatures (6, 25, or 36°C) affect the process in these poikilotherms. We here report that exposure of the turtles to 6°C greatly delays the glucose uptake, which indicates an impaired function of the thyroid at low temperature.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Female adult *C. dorbigni* turtles (1.2–1.6 kg body wt) were collected from a local natural population

in the southern region of Brazil. Turtles were collected and used with permission from the authorities of the Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (License 138/91-DEVIS). The animals were housed for a minimal period of 1 month in a large tank continuously flushed with tap water, with a mound of dry sand in the middle and kept at environmental temperature. They were fed on fresh meat ad libitum. After this time, the animals were acclimated for 15 days at different temperatures: 6°C (cold room), 36°C (heater), or 25°C (controlled temperature room). Mortality occurred only among turtles acclimated to 36°C (40%). The animals used in the experiments showed an apparently good nutritional and health status. The cloacal temperature was measured before each experiment. All the experiments were performed during the summer.

Chemicals

Crystalline bovine insulin was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO); [U-¹⁴C] 3-O-Methyl-D-Glucose, ([¹⁴C] MG, sp. act. 325.0 mCi/mmol) was obtained from DuPont, NEN Products, Boston, MA.

Experimental procedure

Turtles anesthetized with sodium pentobarbital (25 mg/kg body wt) were opened on the ventral side

Received September 28, 1992; revision accepted March 12, 1993.

of the shell with an electric saw. The thyroid gland was removed and placed in a Petri dish containing cool-incubation medium, and cut into four fragments. Two fragments with similar weights (about 40 mg) were used for the control and experimental group, respectively. Each fragment was then preincubated in 1 ml of Krebs-Ringer bicarbonate buffer (KRb), pH 7.4, without or with insulin (7×10^{-6} M) under an atmosphere of $O_2:CO_2$ (95:5 v/v), in a Dubnoff incubator at different temperatures (6, 25, or 36°C according to the experiment). At the start of the incubation period the glands were placed in fresh KRb without or with insulin plus 0.2 μ Ci of [14 C] MG and incubated at the same temperature as the preincubation. The time of preincubation and incubation, and the insulin dose used were determined according to previous study on time and dose response curves (Machado et al., '91).

After incubation, the thyroid fragments were carefully blotted on filter paper wetted with cold buffer in order to remove the excess of the nonspecific radioactivity bound to the thyroid tissue. Immediately the fragments were transferred to screw-cap tubes containing 1 ml distilled water. Afterward they were boiled twice (15 min each time) and frozen to achieve complete balance between the water in the tissue and the suspended solution. Aliquots (25 μ l) of this solution and of the incubation medium were taken to measure the radioactivity. [14 C]MG radioactivity was counted using Bray β liquid scintillation counter model 1209. The counting efficiency was 95%. The results are expressed as tissue/medium (T/M) rate:dpm/ml tissue fluid per dpm/ml incubation medium (mean \pm SEM). The number of thyroid fragments used in each experiment is shown in the figures.

Experiment I: [14 C]methylglucose uptake at 6, 25, or 36°C

Thyroid fragments from turtles acclimated to 6, 25, or 36°C were preincubated (60 min) and incubated (180 min) at the same temperature of the respective acclimated period, under conditions described above.

Experiment II: [14 C] methylglucose uptake at 25°C

Thyroid fragments from turtles acclimated to 6, 25, or 36°C were preincubated (60 min) and incubated (180 min) at the temperature of 25°C under similar experimental conditions.

Experiment III: [14 C] methylglucose uptake at 6°C after longer incubation time

Thyroid fragments from turtles acclimated at 6°C were preincubated 300 min in KRb without or with insulin (7×10^{-6} M), following incubation at 6°C for 300 min in presence or absence of insulin plus 0.2 μ Ci of [14 C] MG under the same conditions related in experimental procedure.

Statistical analysis

Data from the experiments, comparing the effects of different temperatures (Experiment I and II), were analyzed by one-way ANOVA, and post hoc tests were carried out by Duncan's multiple range test whenever suitable. All tests were performed with the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) on an SID-502 in order to facilitate data interpretation (Nie et al., '75). The difference between pair of means (Experiment III) were compared using the Student's t-test.

RESULTS

Thyroid [14 C] MG uptake from turtles acclimated at 6, 25, or 36°C, preincubated and incubated at the same temperature.

The [14 C] MG uptake by thyroid glands preincubated and incubated only in KRb without insulin did not show significant changes at the different temperatures (Fig. 1). The presence of insulin in the medium significantly increased the uptake of methylglucose when the thyroids were preincubated and incubated at 25 or 36°C, although this effect was more pronounced at 25°C than at 36°C. At 6°C the insulin did not increase glucose uptake. Comparing the effects of insulin in increasing the uptake of methylglucose at different temperatures, significant changes were found only between the thyroids incubated at 25 and 6°C.

Thyroid [14 C] MG uptake from turtles acclimated at 6, 25, or 36°C, preincubated and incubated at 25°C

The uptake of [14 C] MG by the turtle thyroid gland from animals acclimated at 6, 25 or 36°C, preincubated (60 min) and incubated (180 min) without insulin at 25°C, was similar under the three experimental conditions. The stimulatory effect of insulin (7×10^{-6} M) on the uptake of methylglucose was not observed when the thyroid fragments from turtles acclimated at 6 or 36°C were preincubated and incubated at 25°C. The stimulatory effect of the hormone on the [14 C] MG uptake was evident ($P < 0.05$) only in glands from turtles acclimated at 25°C,

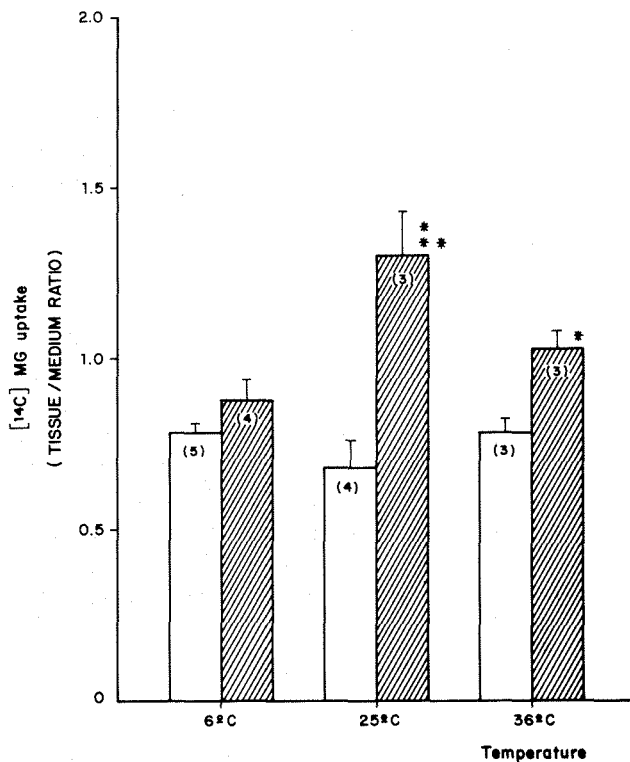


Fig. 1. [^{14}C] Methylglucose uptake by thyroid glands from turtles acclimated at 6, 25, or 36°C and preincubated and incubated at the same temperature. Thyroid fragments were preincubated (60 min) and incubated (180 min) without (\square) or with bovine insulin (7×10^{-6} M) (\boxtimes) at the same temperature at which the turtles had been acclimated for 15 days. [^{14}C]MG was added to the incubation medium. After the incubation time the thyroid tissues were processed as indicated under Materials and Methods. Results are expressed as tissue/medium ratio:dpm/ml tissue fluid per dpm/ml incubation medium. Data are given as mean \pm SEM. In parentheses: number of thyroid fragments. * = Significantly different from the respective control glands (KRB without insulin); ** = statistically different from insulin effect at 6°C. (One-way ANOVA and Duncan's multiple range test, $P < 0.05$).

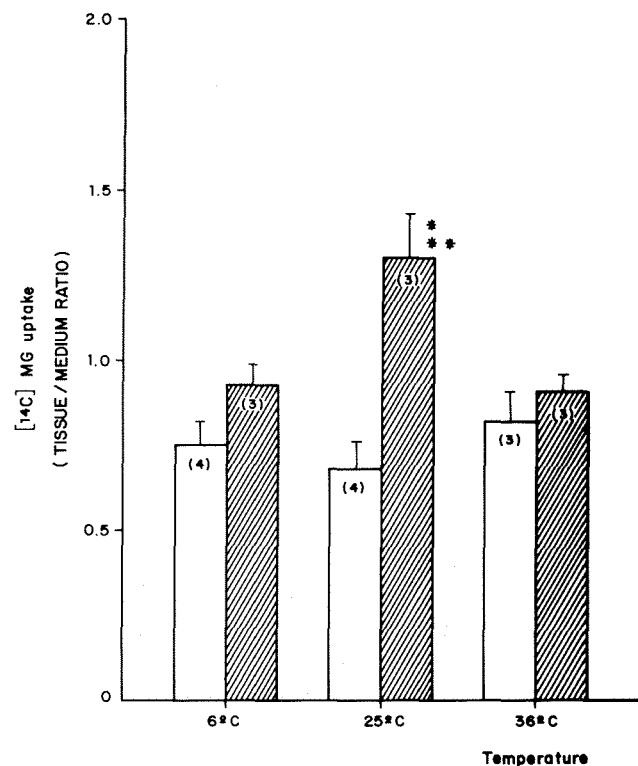


Fig. 2. [^{14}C] Methylglucose uptake by thyroid glands from turtles acclimated at 6, 25, or 36°C and preincubated and incubated at 25°C. Thyroid fragments from turtles acclimated (15 days) at 6, 25, or 36°C were preincubated (60 min) and incubated (180 min) without (\square) or with bovine insulin (7×10^{-6} M) (\boxtimes) at 25°C. [^{14}C]MG was added to the incubation medium. After the incubation time the thyroid tissues were processed as indicated under Materials and Methods. Results are expressed as tissue/medium ratio:dpm/ml tissue fluid per dpm/ml incubation medium. Data are given as means \pm SEM. In parentheses: number of thyroid fragments. * = Significant difference from the respective control glands (KRB without insulin); ** = significant difference from insulin effect from turtles acclimated at 6°C (one-way ANOVA and Duncan's multiple range test, $P < 0.05$).

preincubated and incubated at the same temperature (Fig. 2).

Thyroid [^{14}C] MG uptake from turtles acclimated at 6°C, preincubated and incubated at the same temperature

When the temperature of the acclimation period was 6°C and the preincubation and the incubation times were 300 min each, instead of 60 and 180 min, respectively, the stimulatory effect of the insulin on the glucose uptake could be demonstrated ($P < 0.05$ compared with control glands) (Fig. 3). The T/M ratio of the control glands did not show significant changes when it was compared with the control ratios from the preceding experiments (Figs.

1, 2), when we used different temperatures and a shorter incubation time.

DISCUSSION

Recent studies have demonstrated that under in vitro conditions the turtle thyroid is able to efficiently transport [^{14}C]deoxy-D-glucose and [^{14}C]aminoisobutyric acid, and that this phenomenon is time-dependent. Bovine insulin produced a marked stimulatory effect on the uptake of glucose and amino acid, and this effect was dose-dependent, indicating that the insulin might exert direct biological action on this gland (Machado et al., '91).

The thyroids from turtles *Chrysemys dorsignii* showed seasonal histological variations with respect

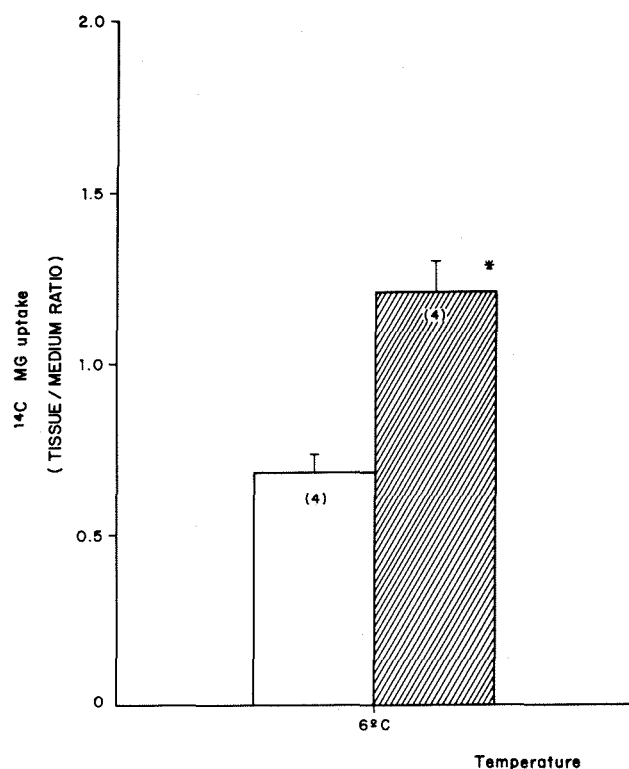


Fig. 3. [¹⁴C] Methylglucose uptake by thyroid glands from turtles acclimated, preincubated and incubated at 6°C. Thyroid glands from turtles acclimated (15 days) at 6°C were preincubated (300 min) and incubated (300 min) without (□) or with bovine insulin (7×10^{-6} M) (▨) at the same temperature. [¹⁴C] MG was added to the incubation medium. After the incubation time, the thyroids were processed as indicated in Materials and Methods. Results are expressed as tissue/medium ratio:dpm/ml tissue fluid per dpm/ml incubation medium. Data are given as means \pm SEM. In parentheses: number of thyroid fragments. * = Significant difference from the respective control glands (KRb without insulin). Student's t-test, $P < 0.05$.

to the follicular cell height, nuclear diameter, and follicular lumen, suggesting more intense synthetic activity in the springtime (Machado et al., unpublished observations). *Chrysemys picta*, a turtle with great seasonal changes in plasma T_4 , the binding protein, measured by activity and RIA, showed significant seasonality, minimal upon emergence from hibernation and maximal in late summer, about a month after the peak in plasma T_4 (Licht et al., '91). Histological studies on thyroids from lizards (*Anolis carolinensis*) acclimated for 2 weeks at 15 or 35°C showed differences according to the temperature. Animals kept at high temperature tended to show histological evidence of a somewhat more intense thyroid activity than those kept at low temperatures (Lynn et al., '65). Similar observations have been reported for several species of European lizards (Bargmann, '39).

In order to simulate the natural temperature variations of their natural habitat, we acclimated the turtles in the laboratory to 6, 25, or 36°C to study the stimulatory effect of insulin on the thyroid [¹⁴C] MG uptake under these conditions.

When the thyroids from turtles acclimated at 6, 25, or 36°C were preincubated (60 min) and incubated (180 min) at the respective acclimation temperature, we found that the control glucose uptake did not change significantly. The same was observed in thyroids from turtles acclimated to 6, 25, or 36°C and preincubated and incubated at 25°C and even in those experiments in which the glands were incubated at 6°C for a longer period of time. The present results are consistent with the observations by Kono et al. ('77) in fat cells of rats. The authors determined the sugar transport at 37 and 15°C and found that the control uptake of glucose did not vary with different temperatures, as reported in this paper. Apparently, low levels of glucose transport are not affected by temperature variations. Furthermore, even in the presence of cytochalasin B there is a low level of sugar transport in mammalian skeletal muscle (Shanahan, '84). Cytochalasin B is a potent inhibitor of glucose transport in cell systems and is used to measure the unspecific uptake of glucose (Jung and Rampal, '77). Thus, our results suggest that glucose transport that is not modified by temperature may be associated with passive diffusion, nonspecific glucose binding, or a combination of both.

However, the stimulatory effect of the insulin on the glucose uptake in turtle thyroid glands was sensitive to temperature. In thyroids from turtles acclimated to 6°C and incubated at the same temperature for 180 min the stimulatory effect of the hormone on the glucose uptake was not observed. It is important to note that the glands were preincubated and incubated during the same time used in experiments with thyroids from turtles acclimated at 25 and 36°C in which insulin produced a significant increase on the glucose uptake (Fig. 1). In rat fat cells the insulin was not effective in stimulating the methylglucose transport when the incubation temperature decreased to 15°C. These results imply that the hormonal activation of sugar transport is highly sensitive to low temperature. It was reported that the effects of low temperature may be explained as a result of the apparent delay in forming the insulin-receptor complex on the cell surface (Kono et al., '77).

When the thyroid glands from turtles acclimated at 6, 25, or 36°C were preincubated and incubated at 25°C, the results showed that the well-known

stimulatory effect of insulin was only observed in turtles acclimated previously at 25°C and no effect was found in the glands from animals acclimated at 6 or 36°C. These results seem to indicate that the temperature during the acclimation period was very important in preparing the metabolic adjustments of the gland. Sixty minutes of preincubation and 180 min of incubation at another temperature, different from that of the acclimated period, were not sufficient to adjust the gland to different enzymatic conditions.

It is worthwhile to point out that the turtles used in our experiments usually face temperatures as low as 8°C during the winter, at which they are still active. Therefore, in additional experiments, we acclimated the turtles at 6°C and preincubated and incubated the thyroid gland with insulin at the same temperature for a period of 300 min. Figure 3 shows that at a very low temperature insulin still produced its well-known stimulatory effect on the glucose uptake, and this effect was similar to those found in glands from acclimated turtles at 25°C and incubated at the same temperature for a shorter time (60 and 180 min). These results agree with those of Marques et al. ('85) which demonstrated that insulin degradation in thyroid glands from *C. dorbignii* was present even at very low temperature, provided they were incubated for a prolonged time (8 h). It suggests that at 6°C the thyroid gland from turtles is biologically active. It is worthwhile to mention the studies of Licht et al. ('90) on the effects of low temperature on the T₄ release by turtle (*Pseudemys scripta*) thyroid stimulated by TSH. The authors suggest that the cold suppression of hormonal actions may be due primarily to postreceptor processes rather than binding per se. However, our results indicated that the insulin effect on glucose transport on the turtle thyroid gland was evident at cold temperature provided the incubation time is sufficiently prolonged. It seems to indicate that the hormonal action in this poikilothermic animal is not suppressed at low temperatures but its effects are delayed.

Studies have shown that the fatty acid composition of membrane phospholipids is altered during temperature adaptation in such a manner that the "fluidity" or viscosity of the membrane is maintained, i.e., membrane lipid viscosity displays an adaptive pattern (Somero, '78).

Our findings in this work show that in thyroids from turtles *C. dorbignii*, the glucose uptake without insulin was independent of temperature, indicating a simple passive diffusion phenomenon. However, the stimulatory effect of insulin on glu-

cose uptake by the turtle thyroid gland depends on the temperature. In most mammalian tissues, insulin first binds to its receptors on plasma membrane and then increases the translocation of sugar transporters from an intracellular site to the plasma membrane in a temperature-sensitive manner (Goldfine, '87). In the turtle thyroid, using a prolonged time at low temperature (6°C), this effect also could be shown.

Therefore these data indicate that the turtles can be used as a model for studies on the influence of body temperature variations upon hormone effects.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was partially supported by grants from Financiadora de Estudos e Projetos (Convênio FINEP 439001185000) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

We thank Mr. Laurentino Freitas for help in collecting the animals and Mr. Cid Gomes Freitas for his technical assistance.

LITERATURE CITED

- Bargmann, W. (1939) Die Schilddrüse. In: Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen. W. von Mollendorff, ed. Springer, Berlin, VI/2, pp. 2-136.
- Goldfine, I.D. (1987) The insulin receptor: Molecular biology and transmembrane signaling. *Endocrinol. Rev.* 8:235-255.
- Hazel, J.R., and L. Prosser (1974) Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms. *Physiol. Rev.* 54:621-677.
- Jung, C.Y., and A.L. Rampal (1977) Cytochalasin B binding sites and glucose transport carrier in human erythrocyte ghosts. *J. Biol. Chem.*, 242:5456-5463.
- Kono, T., F.W. Robinson, J.A. Sarver, F.V. Vega, and R.H. Pointer (1977) Actions of insulin in fat cells. *J. Biol. Chem.*, 23: 2226-2233.
- Licht, P., S. Pavgi, and R.J. Denver (1990) The role of hormone binding in the cold suppression of hormone stimulation of the pituitary, thyroid, and testis of the turtle. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 80:381-392.
- Licht, P., R.J. Denver, S. Pavgi, and B. Herrera (1991) Seasonality in plasma thyroxine binding in turtles. *J. Exp. Zool.*, 260:59-65.
- Lynn, W.G., J.J. MaCormic, and J.C. Gregorek (1965) Environmental temperature and thyroid function in the lizard *Anolis carolinensis*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 5:587-595.
- Machado, V.L.A., G.F. Wassermann, and M. Marques (1991) In vitro effect of insulin on the uptake of glucose and α -aminoisobutyric acid in the thyroid gland of the turtle *Chrysemys dorbignii*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 82:08-13.
- Marques, M., L.M.B. Coutinho, R.S.M. da Silva, D. Turyn, and J.M. Dellacha (1984) In vivo specific uptake of labeled insulin by turtle (*Chrysemys dorbignii*). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 17:65-74.
- Marques, M., R.S.M. da Silva, D. Turyn, and J.M. Dellacha (1985) Specific uptake, dissociation and degradation of ¹²⁵I-labeled insulin in isolated turtle (*Chrysemys dorbignii*) thyroid glands. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 60: 306-314.

- Nie, N.N., C.H. Hull, J.G.J. Nkins, K. Stetnbrenner, and D.H. Bent (1975) *Statistical Package for the Social Sciences*. McGraw-Hill, New York.
- Olefsky, J.M., S. Marchall, P. Berhanu, M. Saekow, K. Heidenreich, and A. Green (1982) Internalization and intracellular processing of insulin and insulin receptors in adipocytes. *Metabolism*, *31*:670-690.
- Shanahan, M.F. (1984) Modulation of hexose transport in cultured skeletal muscle. *Mol. Cell. Endocrinol.*, *38*:171-17.
- Somero, G.N. (1978) Temperature adaptation of enzymes. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* *9*:1-29.
- Turyń, D., R.S.M. da Silva, M. Marques, and J.M. Dellacha (1986) Characterization of the insulin binding sites in turtle thyroid microsomes. *J. Endocrinol.*, *108*:157-162.

**DECREASED BASAL AND INSULIN-STIMULATED UPTAKE OF GLUCOSE
AND AMINO ACID BY THYROID GLANDS FROM
STREPTOZOTOCIN- DIABETIC RATS**

V. L. A. Machado, A. C. Ludwig and M. Marques

Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050-170,
Porto Alegre -RS, Brasil

Research supported by FINEP (N^o. 66.91.0509.00), FAPERGS and PROPESP-UFRGS

Correspondence:

V.L.A.Machado

Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Rua Sarmiento Leite n^o 500 CEP 90 050-170
Porto Alegre - RS - Brasil
Telephone / Fax : 0512267191

Running title

Glucose and amino acid uptake by thyroids from STZ-rats

Key words: **insulin, thyroid, diabetic rat**

ABSTRACT

Experimental diabetes in rats and mice is associated with impairment of several aspects of thyroid function. In the present study we determined glucose and amino acid uptake *in vitro* in isolated thyroid glands from normal and streptozotocin-diabetic rats. Adult male Wistar rats, weighing 150-200 g, were used. Diabetes was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (65 mg / kg b.w.) and only rats with blood glucose levels more than 250 mg / dl were used. The thyroid glands were preincubated in Krebs-Ringer bicarbonate buffer in the presence or absence of insulin (7×10^{-10} to 7×10^{-6} M) for 90 min and thereafter incubated with the same concentration of the hormone or its vehicle plus 0.2 μ Ci of [$1\text{-}^{14}\text{C}$]Deoxy-D-glucose ([^{14}C]DG) or [$1\text{-}^{14}\text{C}$]Methylaminoisobutyric acid ([^{14}C]MeAIB), for 15 to 180 min, according to the experiment. The uptake of [^{14}C]DG or [^{14}C]MeAIB by the thyroid from normal rats increased as a function of the incubation time, and the presence of insulin (7×10^{-6} M) induced a significant increment in the uptake of both substrates. The lowest concentration of insulin that increased [^{14}C]DG and [^{14}C]MeAIB transport was 7×10^{-9} M. Thyroid glands from STZ rats exhibited lower basal values of [^{14}C]DG or [^{14}C]MeAIB uptake than glands from normal rats. Insulin produced a stimulatory effect on the transport of both substrates in STZ-rats. However the maximal stimulating concentration of the hormone did not restore the [^{14}C]DG and [^{14}C]MeAIB to control values. These results indicate that insulin exerts a direct action on the thyroid gland, and its absence or reduction affects its metabolism contributing, at least in part, to the abnormality in thyroid function associated with diabetes mellitus.

INTRODUCTION

Clinical and subclinical hypothyroidism have been shown to occur with frequency in insulin-dependent diabetes (1, 2). Experimental diabetes in rats is associated with decreased basal and TSH-stimulated thyroid function (3, 4), and treatment with insulin largely corrects this dysfunction in streptozotocin-diabetic mice (5). Reduction in the hypothalamic TRH content has been observed in diabetic rats, which suggests an alteration in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis (6). However plasma TSH has been reported to be either normal or decreased in diabetic mice, although plasma T_4 and T_3 were markedly reduced (7, 8). A highly significant decrease in thyroid peroxidase activity has been found in experimental diabetes mellitus, which cannot be related to a decrease in serum TSH, indicating that lack of insulin may induced a thyroid dysfunction, at least in part, by an impairment of thyroid hormone biosynthesis (9).

On the other hand, the presence of insulin receptors has been demonstrated in turtle thyroid glands (10, 11, 12), and in rat thyroid cells in culture (13), which strongly supports the hypothesis that insulin might exert a direct action on thyroid function. In fact, insulin increased dog thyroid protein synthesis, *in vivo* and *in vitro* (14), glucose uptake by calf thyroid slices (15), and formation of protein and ribonucleic acid in fetal rat thyroidal cells (16). Furthermore, TSH action on DNA synthesis in dog thyroid epithelial cells in primary culture in serum-free medium depended on or was potentiated by nanomolar concentrations of insulin (17)

Thus, the present study was undertaken to investigate the basal and insulin-stimulated transport of glucose and amino acid in isolated thyroid glands from

streptozotocin- diabetic rats, and to evaluate whether these transports are impaired in insulin deficiency.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Crystalline bovine insulin was a gift from Biobras Bioquímica do Brasil, S/A. Streptozotocin (STZ) was purchased from Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO). 1-[¹⁴C]-2-Deoxy-D-Glucose, sp. Act. 2.1 Gbq / mmol ([¹⁴C]DG), and [1-¹⁴ C] Methylaminoisobutyric Acid, sp. act. 1.8 Gbq / mmol ([¹⁴ C]MeAIB) were obtained from DuPont, NEN Products, Boston, Mass, USA.

Animals

Experiments were performed in normal and streptozotocin-diabetic male Wistar rats, weighing between 150-200 g. The animals were maintained on normal light / dark cycle in a temperature-controlled room at 22 - 26 °C, with food and water *ad libitum*. Twelve hours before the experiments, food was withheld. Diabetes was induced in rats fasted 24 h by intra-peritoneal injection of streptozotocin (65 mg / kg body weight) dissolved just before use in 0.1 M citrate buffer, pH 4.0. Plasma glucose concentration was determined five days after STZ injection and only rats with glucose levels over 250 mg / dl were used in the experiments (STZ rats). Control rats received an equal volume of citrate-buffer vehicle. Plasma glucose concentration was determined by the glucose oxidase method (Kit glucose enzyme color of Biodiagnostica).

Experimental procedure

All experiments were performed during the morning. The animals were killed by decapitation and the thyroid gland was removed and immediately placed in a Petri dish containing cold-incubation medium (Krebs Ringer-bicarbonate buffer, pH 7.4; KRb). The gland was then cleaned from the connective tissue and separated in two halves. The left and right lobes were weighed and a small opening in the capsula was performed. The glands were incubated in KRb (1 ml) with or without insulin (control). The incubation was performed in a Dubnoff metabolic incubator at 37°C in an atmosphere of O₂:CO₂ (95:5, v/v), during different periods for a time curve study (see Figure). For the other experiments all glands were preincubated in KRb with or without insulin for 90 min, and thereafter incubated with 0.2 µCi of [¹⁴C]DG or [¹⁴C]MeAIB for another 45 min (incubation period). An insulin concentration of 7 x 10⁻⁶ M was used in all experiments, both during preincubation and incubation, except for the dose response curve when different concentrations were used (7 x 10⁻¹⁰ to 7 x 10⁻⁶ M).

Following incubation, the thyroid glands were rapidly blotted on filter paper, and then washed with cold buffer in order to remove the excess of the nonspecific radioactivity bound to the thyroid tissue. Immediately the thyroid lobes were transferred to screw-caps tubes containing 1 ml of distilled water. Afterward they were alternately frozen and boiled twice to achieve complete balance between the water in the tissue and that in medium. Aliquots (500 µ l) of this solution and of the incubation medium were taken to measure the radioactivity using a LKB-Rack Beta counter. The counting efficiency was 97 %. The results are expressed as tissue / medium (T/M) rate: dpm / ml

tissue fluid per dpm / ml incubation medium (mean \pm SEM). The number of thyroid glands used in each experiment is shown in the Figures or Tables.

Statistical analysis

Data from the experiments were analyzed by one-way ANOVA and *post hoc* tests were carried out by Duncan test whenever appropriate (18). The unpaired Student's *t* test was also used in some experiments (see Figures).

RESULTS

A time-dependent increase in [14 C]DG uptake was observed in thyroid glands from normal rats incubated in KRb from 15 to 60 min. The presence of insulin (7×10^{-6} M) in both the preincubation and incubation media produced a significant increment in [14 C]DG at 45 and 60 min when compared to respective control glands without insulin (Figure 1). The uptake of [14 C]MeAIB by the normal thyroid gland increased progressively from 15 to 180 min, and the addition of insulin (7×10^{-6} M) to the preincubation and incubation media significantly increased this uptake from 45 to 180 min (Figure 2).

Table 1 shows the T/M values obtained in normal thyroid glands incubated with graded concentrations of insulin. The lowest insulin dose that produced a significant increase in the [14 C]DG uptake and [14 C]MeAIB was 7×10^{-9} M.

Thyroid glands from streptozotocin-diabetic rats showed a significant decrease in the uptake of [^{14}C] DG compared to glands from normal rats (4.03 ± 0.11 and 4.62 ± 0.13 T/M ratio in STZ and normal rats respectively: $p < 0.05$). A similar decrease in [^{14}C]MeAIB uptake was observed in STZ rats (1.05 ± 0.05 T/M ratio compared to controls 1.70 ± 0.08 T/M ratio: $p < 0.05$). When the incubation was performed in the presence of insulin, a significant increase in the uptake of both substrates occurred. However, despite this increment, the uptake by thyroid glands from STZ rats did not reach the values of [^{14}C]DG and [^{14}C]MeAIB found in thyroid glands from normal rats incubated with the same amount of insulin (4.89 ± 0.17 T/M ratio in STZ rats versus 5.44 ± 0.17 in controls for [^{14}C]DG, and 1.51 ± 0.11 T/M ratio in STZ rats versus 2.19 ± 0.10 T/M ratio for [^{14}C] MeAIB) (Figure 3 A and B).

DISCUSSION

Under our *in vitro* experimental conditions the thyroid gland from normal rats was able to efficiently transport [^{14}C]DG and [^{14}C]MeAIB. Deoxy-D-glucose is a glucose synthetic analogue which is transported by the same mechanism as glucose but is only metabolized to 2-deoxy-D-glucose-6-phosphate (19). MeAIB is not also metabolized by the cells and is transported similarly to natural amino acids (20). Thus the use of both substrates allows to evaluate only the transport without interference with its metabolism in the cells. The addition of insulin to the preincubation and incubation media produced stimulatory effect on that transports in thyroid glands, just as in other tissues, in which

insulin enhances glucose transport (adipocytes and muscle, 21), or amino acid transport (muscle, liver, bone and fibroblasts, 22). The stimulatory effect of insulin on uptake of glucose and amino acid in the rat thyroid gland was time and dose-dependent (Figures 1 and 2; Table 1). The lowest concentration of insulin that induced a significant increase in DG and MeAIB uptake in thyroid glands was in the order of 7×10^{-9} M, a concentration similar to that producing similar effect in the rat left atria (23), rat pituitary (24), rat adrenal gland (25) and in the turtle thyroid gland (26).

The present results are in agreement with studies using FRTL-5 cells (Fisher rat thyroid line) in which insulin increases the membrane transport of both glucose and amino acid (13). However, the FRTL-5 line does not incorporate iodide into thyroglobulin nor synthesize thyroid hormones, and shows notable differences from normal thyroid gland in morphological and functional responses to TSH. Such loss of thyroid specific differentiation may reflect the inability of these cells to reorganize into a three-dimensional "pseudofollicular" form in culture (27). The T_3 production in these cells may be minimal due to a defect in thyroid peroxidase gene activity (28). Under our experimental conditions, where whole lobe was incubated the morphological and functional state is probably maintained in conditions closer to those observed *in vivo* than when using FRTL-5 cells.

In the Wistar rat thyroid cell line which can synthesize thyroglobulin, take up iodine, and display a TSH-dependent adenylate cyclase system, insulin, TSH and insulin-like growth factor I (IGF-I) were able independently to induce amino acid transport. The combined effects of insulin and TSH were equal to the theoretical sum of the activities, whereas those of IGF-I and TSH were greater than the theoretical one (29). IGF-I receptors on thyroid cells has been demonstrated in different species (30, 31, 32) and

there is strong evidence suggesting an autocrine secretion of IGF-I by ovine and human thyroid cells (33,34). Thus it has been postulated that IGF-I is involved in a paracrine mechanism of action at the thyroid level (35). On the other hand, nanomolar concentration of insulin was required to evidence the TSH action on DNA synthesis in dog thyroid epithelial cells in primary culture in serum-free medium (17). These data seems to indicate a complex or synergic interaction between insulin, TSH and IGF-I on the thyroid metabolism, which deserves further studies.

In order to investigate whether insulin is required for normal metabolism of the thyroid gland, similar experiments on glucose and amino acid transport were performed in streptozotocin-diabetic rats. Our results show a significant decrease in the transport of both substances in thyroid glands from STZ-diabetic rats (Figure 3A and B), and indicate a deficiency in the metabolism of the gland in an absence or reduction of the hormone. This finding may explain the frequent occurrence of abnormalities of the thyroid gland seen in the diabetic state such as: a 41% reduction in thyroxine secretion rate (36); a reduced percentage of T_3 , MIT/DIT, T_3/T_4 ratios in thyroid gland (37); a decreased rate of stable iodine uptake and changes in the distribution of labeled iodo amino acids in the gland (4); a reduced sensitivity to TSH with consequent decrease in the synthesis of the thyroid hormones (5); a significant decrease in serum T_4 and T_3 , and in thyroid peroxidase activity (9).

When insulin was added to the incubation media, the thyroid gland from diabetic rats was able to increase the glucose (21%) and amino acid transport (44%) in comparison with the respective control gland from STZ rats. It is important to note that the transport stimulated by insulin was sufficient to allow the gland to reach the basal condition observed in normal control rats, without the presence of the insulin. Similar

results were found in adrenal glands from STZ rats where insulin stimulated the transport of glucose, but the increase did not reach the values obtained in normal rats (25). Glucose and amino acid are indispensable for normal function of the thyroid gland. After uptake by the thyroid tissue, glucose is used by the hexose monophosphate shunt generation NADPH and in H_2O_2 formation, which are indispensable for the thyroid hormone biosynthesis (38).

In conclusion, the finding that *in vitro* insulin increased the glucose and amino acid transport in the isolated rat thyroid gland demonstrates that this hormone must have a direct action *in vivo*, as suggested by the presence of insulin receptors in this gland. In addition, the decrease in the uptake of both substrates found in the thyroid gland from streptozotocin-diabetic rats may indicate that this hormone exerts an important role in the metabolism of this gland, and its absence or reduction may be, at least in part, another deficiency that explains the frequent abnormalities of thyroid function associated with diabetes mellitus. Further studies may be extended to other metabolic aspects of thyroid function under the influence of the insulin, such as the thyroglobulin biosynthesis, and the identification of the glucose transporters in this gland.

REFERENCES

1. Nabarro JDN, Mustaffa BE, Morris DV, Walport MJ & Kurtz AB (1979). Insulin deficient diabetes. Contrasts with other endocrine deficiencies. *Diabetologia*, 16: 5-12.
2. Gray RS, Borseley DO, Seth J, Herd R, Brown NS & Clarke BF (1980). Prevalence of subclinical thyroid failure in insulin-dependent diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 50: 1034-1037.

3. Serif GS & Sihotang K (1962). Thyroid iodine metabolism in the alloxanized rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 119: 950-952.
4. Jolin T & Concepción G (1978). Thyroid iodine metabolism in streptozotocin-diabetic rats. *Acta Endocrinologica*, 88: 506-516.
5. Bagchi N, Brown T, Shivers B, Lucas S & Mack R (1981). Decreased thyroidal response to thyrotropin in diabetic mice. *Endocrinology*, 109: 1428-1432.
6. González C, Montoya E & Jolin T (1980). Effect of streptozotocin diabetes on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in the rat. *Endocrinology*, 107: 2099-2103.
7. Chopra I J, Wiersinga W & Frank H (1981). Alterations in hepatic monodeiodination of iodothyronines in diabetic rat. *Life Sciences*, 28: 1765-1776.
8. Pastor R M & Jolin T (1983). Peripheral metabolism and secretion rate of thyrotropin in streptozotocin-diabetic-rats. *Endocrinology*, 112: 1454-1459.
9. Moura EG, Pazos CC & Rosenthal D (1986). Insulin deficiency impairs thyroid peroxidase activity: a study in experimental diabetes mellitus. In: Medeiros G & Gaitan E (Eds), *Frontiers in Thyroidology*, 1:627-630, Plenum Medical Book, New York.
10. Marques M, Coutinho LMB, da Silva RSM, Turyn D & Dellacha JM (1984). *In vivo* specific uptake of labeled insulin by turtle (*Chrysemys dorbigni*) thyroid gland. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 17: 65-74.
11. Marques M, da Silva RSM, Turyn D & Dellacha JM (1985). Specific uptake and degradation of ¹²⁵I labeled insulin by turtle (*Chrysemys dorbigni*) thyroid glands. *General and Comparative Endocrinology*, 60: 306-314.

12. Turyn D, da Silva RSM, Marques M & Dellacha JM (1986). Characterization of the insulin-binding sites in turtle thyroid microsomes. *Journal of Endocrinology*, 108: 157-162.
13. Trischitta V, Damante G, Foti D & Filetti S (1987). Insulin binding and biological activities in FRTL-5 rat thyroid cell line. *Metabolism*, 36: 379-383.
14. Brisson-Lougarre A, De Nayer PH & Blum C (1978). Action of insulin on thyroid protein synthesis in dogs. *Hormone and Metabolism Research*, 10: 396-400.
15. Field JB, Pastan I, Johnson P & Herring B (1960). Stimulation in vitro of pathways of glucose oxidation in thyroid by thyroid-stimulating hormone. *The Journal of Biological Chemistry*, 235 (III): 863-1866.
16. Sing VN, Nataf BM & Chaikoff IL (1965). The effect of insulin on the formation of protein and ribonucleic acid by fetal rat thyroid glands in organ culture. *Life Sciences*, 4: 1603-1609.
17. Roger PP, Servais P & Dumont JE (1987). Induction of DNA synthesis in dog thyrocytes in primary culture: synergistic effects of thyrotropin and cyclic AMP with epidermal growth factor and insulin. *Journal of Cellular Physiology*, 130: 58-67.
18. Nie NN, Hull CH, Nkins JGJ, Stetnbrenner K & Bent DH (1975). Statistical Package for the Social Sciences. McGraw-Hill, New York.
19. Mian N, Anderson CE & Kent PW (1979). Effect of sulphated glycopeptides on kinetics of 3-O-methylglucose and 2-deoxyglucose transport by epithelial cells isolated from rabbit small intestine. *European Journal of Biochemistry*, 97: 197-204.
20. Debons AF & Pittman JA (1966). Effects of hormones on the aminoisobutyric acid uptake by bovine thyroid slices. *American Journal of Physiology*, 210: 395-398.

21. Carruthers A (1990). Facilitated diffusion of glucose. *Physiological Reviews*, 70: 1135-1176.
22. Tessari P (1994). Effects of insulin on whole-body and regional amino acid metabolism. *Diabetes /Metabolism Reviews*, 10 (3): 253-285.
23. Bihler I, Charles P & Sawh PC (1980). Effects of the calcium ionophore A 23187 on the regulation of sugar transport in muscle. *Cell Calcium*, 1 : 237-336.
24. Belló AA, da Silveira CM, Wassermann GF, Turyn D & Dellacha JM (1982). Insulin specific uptake, degradation and action on deoxyglucose transport in rat pituitary gland. *IRCS Medical Science*, 10: 121-122.
25. da Silva RSM, Machado VLA, Marques M & Wassermann GF (1984). Insulin binding sites and action in the adrenal glands from normal and streptozotocin diabetic rats. *Hormone and Metabolism Research*, 16: 77-81.
26. Machado VLA, Wassermann GF & Marques M (1991). *In vitro* effect of insulin on the uptake of glucose and α -aminoisobutyric acid in the thyroid gland of the turtle *Chrysemys dorsibigni*. *General and Comparative Endocrinology*, 82:08-13.
27. Bidey SP, Lambert A & Robertson WR (1988). Thyroid cell growth, differentiation and function in the FRTL-5 line: a survey. *Journal of Endocrinology*, 119:365-376.
28. Kamikubo K, Nayfeh SN & Chae CB (1992). Differential regulation of multiple c-erb A expression by thyrotropin, insulin and insulin-like growth factor I in rat thyroid FRTL-5 cells. *Molecular and Cell Endocrinology*, 84: 219-225.
29. Rotella CM, Piani F, Frediani U & Toccafondi R (1989). Regulation of amino acid transport in rat and human thyroid cells. *Acta Endocrinologica*, 121: 759-766.

30. Mak WW, Eggo MC & Burrow GN (1984). Thyrotropin regulation of plasminogen activator activity in primary culture of ovine thyroid cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123: 633-640.
31. Bachrach LK, Eggo MC, Hints RL & Burrow GN (1988). Insulin like growth factors in sheep thyroid cells. Action, receptor and production. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 154: 861-867.
32. Tramontano D, Moses AC, Picone R & Ingbar SH (1987). Characterization and regulation of the receptor for insulin like growth factors I in the FRTL-5 rat thyroid follicular cell line. *Endocrinology*, 120: 785-790.
33. Mak WW, Bhaumick B, Bala RM, Eggo MC & Burrow GN (1986). TSH regulation of the production of insulin-like growth factors and binding proteins in the ovine thyroid cells. *Endocrinology*, 119 Abstract.
34. Tode B, Rotella CM, Serio M, Galli G, Franceschelli F, Tanini A & Toccafondi R (1989). Insulin-like growth factor-I: autocrine secretion by human thyroid follicular cells in primary culture. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 69: 639-646.
35. Gartner R, Bechtner G, Stubner D & Greil W (1987). Paracrine interaction between thyrocytes and fibroblasts. *Acta Endocrinologica*, 115: 225.
36. Kumaresan P & Turner CW (1966). Effect of alloxan on thyroid hormone secretion rate and replacement therapy with insulin in rats. *Endocrinology*, 79: 828-829.
37. Montoya E, González C, Lamas L & Jolin T (1978). Changes of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in streptozotocin-diabetic rats during adaptation to a low iodine diet. *Acta Endocrinologica*, 88: 721-728.

38. Ahn CS & Rosenberg IN (1980). Glucose dependence of thyrotropin stimulated thyroid hormone formation. *Endocrinology*, 107: 1861-1866.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 Time course of [14 C] DG transport in normal rat thyroid gland incubated in presence (•) or absence (o) of insulin (7×10^{-6} M). Results are expressed as tissue/medium ratio (T/M): dpm/ml tissue fluid per dpm/ml incubation medium. Data are given as means \pm SEM. In parentheses: number of thyroid glands. *Significantly different from the respective control gland (KRb without insulin), $p < 0.05$. Student's *t* test.

Fig. 2 Time course of [14 C] MeAIB transport in normal rat thyroid gland incubated in presence (•) or absence (o) of insulin (7×10^{-6} M). Results are expressed as tissue/medium ratio (T/M): dpm/ml tissue fluid per dpm/ml incubation medium. Data are given as means \pm SEM. In parentheses: number of thyroid glands. *Significantly different from the respective control gland (KRb without insulin), $p < 0.05$. Student's *t* test.

Fig. 3 Effects of insulin on glucose ([14 C] DG) and amino acid [14 C] MeAIB transport in thyroid glands from normal and streptozotocin-diabetic rats. (A) 1-[14 C] 2-deoxy-D-glucose and (B) [1- 14 C] α -methylaminoisobutyric acid. The glands were preincubated with (□) or without (□) insulin (7×10^{-6} M) during 90 min, followed by incubation with [14 C] DG or [14 C] MeAIB (0.2 μ Ci/mmol) in the absence or presence of insulin for 45 min. Results are expressed as tissue/medium ratio (T/M): dpm/ml tissue fluid per dpm/ml incubation medium. Data are given as means \pm SEM. In parentheses: number of thyroid glands. Means with the same letters are not significantly different as determined by the *post hoc* Duncan test, $p < 0.05$.

Table 1: Effects of different concentrations of insulin on [14 C]DG and [14 C]MeAIB uptake by thyroid glands from normal rats

Insulin (mol)	[14 C] uptake (tissue/medium ratio)		Increase over thyroids without insulin (%)	
	[14 C] DG	[14 C] MeAIB	[14 C] DG	[14 C] MeAIB
None	^a 3.30 ± 0.11	1.97 ± 0.06	-	-
7 x 10 ⁻¹⁰	3.47 ± 0.16	2.03 ± 0.07	5	3
7 x 10 ⁻⁹	4.04 ± 0.11*	2.68 ± 0.27*	22	36
7 x 10 ⁻⁸	4.06 ± 0.11*	2.77 ± 0.05*	23	41
7 x 10 ⁻⁷	4.02 ± 0.11*	2.92 ± 0.13*	22	48
7 x 10 ⁻⁶	4.16 ± 0.12*	3.10 ± 0.17*	26	57

Thyroid glands were preincubated with or without different concentrations of insulin during 90 min, followed by incubation for 45 min in the presence of the same concentration of the hormone plus [14 C]DG or [14 C]MeAIB (0.2 μ Ci/ml).

^aMean \pm SEM.

Results are expressed as tissue medium ratio: dpm / ml tissue fluid per dpm / ml incubation medium.

* Significantly different ($p \leq 0.05$) from thyroid glands incubated without insulin (one way ANOVA and Duncan test).