

BRUNA BEZERRA LINS

SUPEREXPRESSÃO DE *Slc2a2*/GLUT2 INDUZIDA POR  
ALTA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE EM CÉLULAS  
TUBULARES RENAIIS IRPTC ENVOLVE ATIVAÇÃO DE  
HNF4A E FOXA2 MEDIADA POR AKT

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Fisiologia Humana do  
Instituto de Ciências Biomédicas da  
Universidade de São Paulo, para  
obtenção do título de Mestre em Ciências

São Paulo  
2015

BRUNA BEZERRA LINS

Superexpressão de *Slc2a2*/GLUT2 induzida por alta  
concentração de glicose em células tubulares renais IRPTC  
envolve ativação de HNF4A e FOXA2 mediada por AKT

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Fisiologia Humana do  
Instituto de Ciências Biomédicas da  
Universidade de São Paulo, para obtenção  
do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Ubiratan Fabres  
Machado

Versão corrigida. Versão original eletrônica  
encontra-se disponível tanto na Biblioteca  
do ICB quanto na Biblioteca Digital de  
Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo

2015

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

reprodução não autorizada pelo autor

Lins, Bruna Bezerra.

Superexpressão de Slc2a2/GLUT2 induzida por alta concentração de glicose em células tubulares renais IRPTC envolve ativação de HNF4A e FOXA2 mediada por AKT / Bruna Bezerra Lins. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado.

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

Versão do título para o inglês: High glucose concentration-induced overexpression of Slc2a2/GLUT2 in renal tubular cells involves AKT-mediated activation of HNF4A and FOXA2.

1. Glicose 2. Insulina 3. Túbulo proximal 4. GLUT2 5. AKT 6. Fatores transcricionais I. Machado, Prof. Dr. Ubiratan Fabres II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0148/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Bruna Bezerra Lins.

Título da Dissertação: Superexpressão de *Slc2a2*/GLUT2 induzida por alta concentração de glicose em células tubulares renais IRPTC envolve ativação de HNF4A e FOXA2 mediada por AKT.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**( ) Aprovado(a)**

**( ) Reprovado(a)**

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

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

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



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

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

*Comissão de Ética em Pesquisa*

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

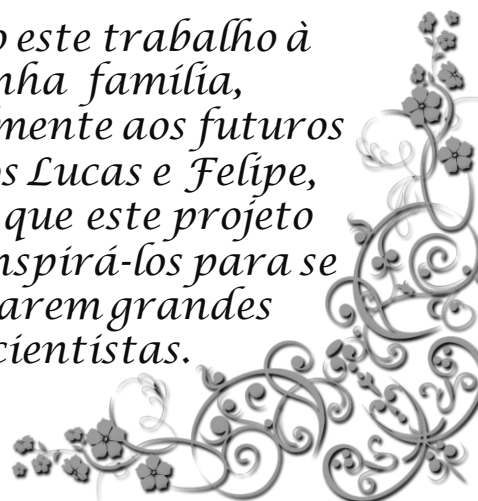
Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° **610/13** referente ao projeto intitulado: *“Efeito da inibição dos SGLTs sobre a expressão dos transportadores de glicose SGLT1, SGLT2 e GLUT2 em células renais IRPTC”* sob a responsabilidade de **Bruna Bezerra Lins**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 27 de junho de 2013.

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

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

*Dedico este trabalho à  
minha família,  
especialmente aos futuros  
biólogos Lucas e Felipe,  
espero que este projeto  
possa inspirá-los para se  
tornarem grandes  
cientistas.*



## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus por todas as oportunidades que tive na vida, por ter me guiado e me capacitado para a realização deste trabalho.

Aos meus maravilhosos pais Valdemar e Ana, por tudo que eles representam para mim e por nunca terem poupado esforços para que eu pudesse me dedicar aos estudos e à realização dos meus sonhos.

Ao amor da minha vida Bruno Pansonato, pela sua enorme paciência, amor, motivação e incentivo ao longo deste trabalho. Obrigada por estar sempre ao meu lado na realização dos meus maiores desejos e por me fazer acreditar que chegaria ao final desta difícil etapa.

Ao meu irmão Lucas e meu sobrinho Felipe, meus grandes amores, a quem dedico este trabalho e que fazem a minha vida muito mais feliz.

A minha irmã Valkiria, a minha vó Isabel e as minhas tias Juliana e Luciana que torceram muito por mim.

A minha super melhor amiga Jessica, por todo o estímulo, carinho e paciência. Obrigada por aguentar minhas reclamações e pelos melhores conselhos, obrigada por nunca me deixar desistir de nada. Você foi a melhor coisa que me aconteceu durante a faculdade.

Ao meu orientador, Prof. Ubiratan Fabres Machado, sou inteiramente grata por sua orientação.

A Helayne Freitas, por sua indescritível atenção, dedicação e apoio em todas as fases desse projeto, sem você esse trabalho não teria sido possível. Agradeço, também o carinho que sempre demonstrou por mim e a amizade, muito obrigada, te admiro demais.

Aos amigos do laboratório, obrigada pela parceria. Em especial a Aline David, obrigada pelas múltiplas contribuições.

Aos meus grandes e melhores amigos do ICB, os quais tenho muito orgulho de ter conquistado, Luciana Tocci, Sinésio Júnior e Daniel Blanc, meu muito obrigada pela paciência, pelas múltiplas risadas e brincadeiras que contribuíram para que o meu dia-a-dia fosse mais prazeroso durante essa jornada.

Aos amigos dos laboratórios vizinho, muito obrigada pela amizade.

Aos meus novos amigos João Andrade e José Augusto, obrigada pela amizade e pela força que vocês tem me dado, vocês são incríveis.

A todos os funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas, em especial ao José Maria e à Paloma, agradeço por toda a ajuda, atenção e dedicação.

Aos professores do departamento de Fisiologia e Biofísica, e com carinho a prof<sup>a</sup> Maria Tereza Nunes, pelo excelente ensino e amizade.

E finalmente agradeço a todos aqueles que, embora não nomeados, contribuíram de alguma forma com esse trabalho e com a minha formação. Finalizo mais uma fase da minha caminhada e certamente eu não teria conseguido sem vocês.



“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a DEUS, não sou o que era antes.”

Marthin Luther King

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Dendrograma da família de transportadores de glicose em humanos (GLUTs).....	22
<b>Figura 2</b> – Reabsorção de glicose no túbulo proximal.....	24
<b>Figura 3</b> – Localização dos fatores transcricionais HNF1A, HNF4A e FOXA2 no promotor do <i>Slc2a2</i> .....	28
<b>Figura 4</b> – Quantificação da proteína cinase AKT fosforilada (p-AKT) em extrato total de células IRPTC.....	40
<b>Figura 5</b> – Quantificação do mRNA do <i>Slc2a2</i> em células IRPTC .....	41
<b>Figura 6</b> – Quantificação da proteína GLUT2 em membrana plasmática de células IRPTC .....	41
<b>Figura 7</b> – Quantificação do mRNA <i>Slc5a2</i> em células IRPTC .....	42
<b>Figura 8</b> – Quantificação da proteína SGLT2 em membrana plasmática de células IRPTC .....	42
<b>Figura 9</b> – Quantificação do mRNA do <i>Hnf1a</i> de células IRPTC.....	43
<b>Figura 10</b> – Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) de proteínas nucleares de células IRPTC .....	44
<b>Figura 11</b> – Quantificação da atividade de ligação de proteínas nucleares (ao sítio de ligação do HNF1A no gene <i>Slc2a2</i> .....	45
<b>Figura 12</b> – Quantificação do mRNA do <i>Hnf4a</i> de células IRPTC.....	46
<b>Figura 13</b> – Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) de proteínas nucleares de células IRPTC .....	47
<b>Figura 14</b> – Quantificação da atividade de ligação de proteínas nucleares (ao sítio de ligação do HNF4A no gene <i>Slc5a2</i> .....	48
<b>Figura 15</b> – Quantificação do mRNA do <i>Foxa2</i> de células de IRPTC .....	49

<b>Figura 16</b> – Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) de proteínas nucleares de células IRPTC .....	50
<b>Figura 17</b> – Quantificação da atividade de ligação de proteínas nucleares (ao sítio de ligação do FOXA2 no gene <i>Slc5a2</i> .....	51
<b>Figura 18</b> – Quantificação da proteína cinase AKT fosforilada (p-AKT) em extrato total de células IRPTC.....	52
<b>Figura 19</b> – Quantificação do mRNA <i>Slc2a2</i> em células IRPTC .....	52
<b>Figura 20</b> – Quantificação da proteína GLUT2 em membrana plasmática de células IRPTC .....	53
<b>Figura 21</b> – Quantificação do mRNA <i>Slc5a2</i> em células IRPTC .....	54
<b>Figura 22</b> – Quantificação da proteína SGLT2 em membrana plasmática de células IRPTC .....	54
<b>Figura 23</b> – Quantificação do mRNA do <i>Hnf1a</i> de células IRPTC.....	55
<b>Figura 24</b> – Quantificação da atividade de ligação de proteínas nucleares (ao sítio de ligação do HNF1A no gene <i>Slc2a2</i> .....	56
<b>Figura 25</b> – Quantificação do mRNA do <i>Hnf4a</i> de células IRPTC.....	57
<b>Figura 26</b> – Quantificação da atividade de ligação de proteínas nucleares (ao sítio de ligação do HNF4A no gene <i>Slc2a2</i> .....	58
<b>Figura 27</b> – Quantificação do mRNA do <i>Foxa2</i> de células IRPTC .....	59
<b>Figura 28</b> – Quantificação da atividade de ligação de proteínas nucleares (ao sítio de ligação do FOXA2 no gene <i>Slc2a2</i> .....	59

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Sequencia de primers e condições de amplificação .....	35
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT/PKB	Proteína AKT ou proteína cinase B
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
ATPase	Enzima que hidrolisa ATP
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
COOH	Terminal carboxila
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DMEM	Do inglês Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EMSA	Do inglês Electrophoretic Mobility Gel Shift Assay
EPM	Erro Padrão da Média
Foxa	Do inglês Forkhead box A
GAPDH	Do inglês Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase
GLUT2	Do inglês Glucose Transporter 2
Hep G2	Células de Hepatoma Humano
HNF	Do inglês Hepatocyte Nuclear Factor
IRC	Insuficiência renal Crônica
IRPTC	Do inglês Immortalized Rat Proximal Tubule Cells
K <sup>+</sup>	Potássio
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis
MODY	Do inglês Maturity-onset Diabetes Mellitus of the Young
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
mTORC2	Complexo 2 de mTOR
Na <sup>+</sup>	Sódio
Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>	Trocador de sódio/hidrogênio
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase	Bomba Sódio/Potássio
NBCe1	Co-transportador de bicarbonato de sódio
ND	Nefropatia Diabética

NH2	Terminal amina
NHE3	Sódio-Próton permutador do tipo 3
p-AKT	AKT fosforilada
PCR	Do inglês Polymerase Chain Reaction
PDK1	Proteína cinase dependente de fosfoinosítídeos 1
PH	Domínio de homologia a plequistrina
PI3K	Fosfoinosítídeo-3-cinase
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PTEN	Fosfatase homóloga à tensina deletada no cromossomo 10
S1	Segmento 1
S2	Segmento 2
S3	Segmento 3
S473	Serina 473
SGLT2	Cotransportador sódio/glicose
<i>Slc2a2</i>	Do inglês Solute Carrier 2A2
<i>Slc5a2</i>	Do inglês Solute Carrier 5A2
TP	Túbulo proximal
T308	Treonina 308

## RESUMO

LINS, B. B. **Superexpressão de *Slc2a2*/GLUT2 induzida por alta concentração de glicose em células tubulares renais IRPTC envolve ativação de HNF4A e FOXA2 mediada por AKT.** 2015. 73 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

No rim, a maior parte da carga de glicose filtrada é rapidamente reabsorvida na porção inicial do túbulo proximal, no qual são co-expressos os dois tipos de transportadores: SGLT2 (cotransportador de Na<sup>+</sup>-glicose tipo 2, codificado pelo gene *Slc5a2*) na membrana apical, e GLUT2 (transportador de difusão facilitada de glicose tipo 2, codificado pelo gene *Slc2a2*), na membrana basolateral. No diabetes mellitus ocorre aumento no fluxo transepitelial de glicose, o que decorre de aumento na expressão desses transportadores, e pode ser revertido pelo tratamento com insulina. Os fatores transcricionais HNF1A e HNF4A (HNF, fator nuclear do hepatócito) e o FOXA2 (forkhead box protein A2) são descritos como potenciais reguladores dos genes *Slc2a2*. A proteína AKT medeia efeitos da insulina, e é descrita como capaz de ativar fatores transcricionais como o FOXA2. O efeito independente da glicose e da insulina sobre a regulação desses genes ainda não é conhecido. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar em linhagem celular (IRPTC, Immortalized Rat Proximal Tubule Cells) o efeito da alta concentração de glicose (25 mM) e de insulina (100 nM) sobre a expressão de *Slc2a2*/GLUT2 e *Slc5a2*/SGLT2, assim como a participação da AKT e dos fatores transcricionais HNF1A, HNF4A e FOXA 2 nas regulações observadas. Nenhuma alteração foi detectada na expressão de *Slc5a2*/SGLT2. Por outro lado, observou-se que a alta concentração de glicose aumentou a expressão do mRNA *Slc2a2* e da proteína GLUT2, efeito este que envolveu aumento na atividade de ligação dos fatores transcricionais HNF4A e FOXA2 na região promotora do gene *Slc2a2*, por mecanismo mediado pela AKT. A insulina reverteu o efeito sobre o mRNA do *Slc2a2*, porém não alterou o conteúdo de GLUT2. Em síntese, os resultados demonstram, em célula tubular renal, que a alta concentração de glicose induz a hiperexpressão de *Slc2a2*/GLUT2, efeito mediado por AKT/HNF4A/FOXA2, o que deve participar do desenvolvimento da nefropatia diabética.

**Palavras-chave:** AKT. GLUT2. SGLT2. HNF1A. HNF4A. FOXA2.

## ABSTRACT

LINS, B. B. **High glucose concentration-induced overexpression of *Slc2a2*/GLUT2 in renal tubular cells involves AKT-mediated activation of HNF4A and FOXA2.** 2015. 73 p. Masters thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Glucose filtrated load is rapidly reabsorbed in renal proximal tubule by the coordinate action of the glucose transporters SGLT2 (sodium: glucose cotransporter 2, codified by *Slc5a2* gene) in the apical membrane, and GLUT2 (facilitative glucose transporter 2, codified by *Slc2a2* gene), in the basolateral membrane. In diabetes, renal glucose reabsorption increases; that involves overexpression of the glucose transporters, and is reversed by insulin therapy. The transcription factors HNF (hepatocyte nuclear factor) 1A and 4A, and FOXA2 (forkhead box protein A2) have been proposed as modulators of *Slc2a2* gene expression. The AKT protein is an important mediator of insulin action, and has been described as able to activate FOXA2. Independent and clear effect of high concentration of glucose or insulin upon the regulation of these genes is unknown. The present study investigates in immortalized rat proximal tubule cells the effects of high glucose (25 mM) and insulin (100 nM) concentrations upon the *Slc2a2*/GLUT2 and *Slc5a2*/SGLT2 expression, as well as the participation of AKT, HNF1A, HNF4A and FOXA2. No regulation of *Slc5a2*/SGLT2 was observed. On the other hand, 25 mM glucose increased the expression of *Slc2a2* mRNA and GLUT2 protein, which was accompanied by increased HNF4A and FOXA2 binding in the *Slc2a2* promoter, in an AKT-mediated way. Insulin reversed the *Slc2a2* mRNA regulation, but did not alter GLUT2 content. In summary, the results reveal that high glucose concentration induces *Slc2a2*/GLUT2 overexpression in renal proximal tubule cells, which may participate in the development of diabetic nephropathy.

**Key-words:** AKT. GLUT2. SGLT2. HNF1A. HNF4A. FOXA2.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>1.1 Insulina</b> .....	18
<b>1.2 Nefropatia Diabética (ND)</b> .....	20
<b>1.3 Transportadores de glicose no rim</b> .....	20
<b>1.4 Reabsorção de Glicose no Túbulo Proximal</b> .....	23
<b>1.5 Reabsorção de Sódio no Túbulo Proximal</b> .....	25
<b>1.6 Fatores Transcricionais relacionados à expressão de <i>Slc2a2</i> e <i>Slc5a2</i></b> ...26	
1.6.1 <i>HNF1A</i> (codificado em rato pelo gene <i>Hnf1a</i> ).....	26
1.6.2 <i>HNF4A</i> (codificado em rato pelo gene <i>Hnf4a</i> ).....	27
1.6.3 <i>FOXA2</i> (codificado em rato pelo gene <i>Foxa2</i> ) .....	28
<b>1.7 AKT (codificada pelo gene <i>Akt1</i>)</b> .....	29
1.7.1 <i>Ativação da AKT</i> .....	30
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	32
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	33
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	33
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	33
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	34
<b>4.1 Avaliação da expressão de mRNA de <i>Slc2a2</i>, <i>Slc5a2</i>, <i>Hnf1a</i>, <i>Hnf4a</i> e <i>Foxa2</i> por PCR convencional (do inglês, <i>Polimerase Chain Reaction</i>)</b> .....	35
<b>4.2 Ensaio de Mobilidade Eletroforética (Eletrophoretic Mobility Shift Assay - EMSA)</b> .....	36
4.2.1 <i>Extração de proteínas nucleares</i> .....	36
4.2.2 <i>Marcação da Sonda</i> .....	36
4.2.3 <i>Reação de ligação e corrida do gel</i> .....	37
4.2.4 <i>Ensaio de Super Shift</i> .....	388
<b>4.3 Avaliação da abundância das proteínas GLUT2, SGLT2 e AKT por Western blotting</b> .....	38

4.3.1 Preparo das amostras de cultura celular.....	38
4.3.2 Determinação da concentração de proteínas.....	38
4.3.3 Western Blotting.....	38
4.4 Análise estatística dos resultados.....	39
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
5.1 Alta concentração de glicose aumenta a expressão de <i>Slc2a2</i> /GLUT2 ...	40
5.2 Insulina reduz expressão do mRNA <i>Slc2a2</i> na presença de alta concentração de glicose.....	51
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS*.....</b>	<b>66</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Diabetes *mellitus* (DM) é uma síndrome metabólica caracterizada pela elevação anormal de glicose no sangue (hiperglicemia). Esta doença é provocada pela deficiência na secreção e/ou ação do hormônio insulina, produzido pelas células  $\beta$  pancreáticas, que é responsável pela manutenção dos níveis de glicose na corrente sanguínea. O DM pode ser classificado de acordo com a sua etiologia em dois grandes grupos:

- Diabetes *mellitus* Tipo 1 (DM1): é ocasionado por destruição autoimune das células  $\beta$ , que levará a deficiência na produção e secreção de insulina;
- Diabetes *mellitus* Tipo 2 (DM2): é ocasionado por resistência dos tecidos à insulina, o que pode levar a falência das células  $\beta$ , e portanto, também está associado à uma diminuição na produção de insulina.

Atualmente, o DM é considerado uma doença comum e de incidência crescente. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (1), em 2025 haverá cerca de trezentos e cinquenta milhões de pessoas diabéticas no mundo. Segundo o Ministério da Saúde, no Brasil, existem aproximadamente dez milhões de pessoas diabéticas, sendo que 90-95% são do tipo 2 e 5-10% do tipo 1. Além disso, em 2010, foram apresentados dados epidemiológicos apontando o DM como a quarta causa de morte no país. (2)

Os efeitos em longo prazo do DM envolvem disfunção e falência de vários órgãos, tais como rim, retina, sistema nervoso e sistema cardiovascular (3), que são caracterizados como complicações micro e macrovasculares.

### 1.1 Insulina

A insulina é um hormônio anabólico responsável por manter os níveis sanguíneos de glicose e ácidos graxos livres, entre outros efeitos. Nesse sentido, a insulina promove a captação e utilização de glicose pelos tecidos muscular e adiposo; aumenta o estoque de glicogênio e reduz a produção de glicose no fígado; e promove a síntese e reprime a degradação de triglicerídeos no tecido adiposo (4).

A insulina foi descoberta em 1886 por Oskar Minkowski e Josef von Mehring, na cirurgia de extirpação do pâncreas de um cachorro. Anos depois, em 1923 dois pesquisadores da Universidade de Toronto, Frederick Banting e Charles Best,

isolaram pela primeira vez o hormônio produzido nas células do pâncreas e com isso receberam o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina (5). Ao ser testado em animais, a insulina, teve sua eficiência comprovada. Com a técnica de coleta aprimorada, a insulina passou a ser fabricada em série e é, até hoje, o método mais eficiente para o controle da hiperglicemia.

A insulina é um hormônio peptídico, com peso molecular de 5.808 kDa, é constituída por duas cadeias de resíduos de aminoácidos e é expressa por um gene localizado no braço curto do cromossomo 11 das células beta. A cadeia A contém 21 resíduos de aminoácidos; a cadeia B contém 30 resíduos de aminoácidos, e as duas são interligadas por duas pontes de dissulfeto entre os resíduos de cisteína. A síntese ocorre no retículo endoplasmático rugoso, na forma de uma molécula precursora (pró-insulina), que é posteriormente transportada para o complexo de Golgi, onde é empacotada nos grânulos secretores. Nos grânulos secretores a pro-insulina sofre ação de di-peptidases que clivam a molécula gerando a forma ativa da insulina e um fragmento chamado peptídeo C (6).

Assim como ocorre com outros hormônios peptídicos, a insulina permanece armazenada até que um estímulo deflagre a exocitose do conteúdo do grânulo. O estímulo mais importante para a secreção de insulina é a elevação da concentração da glicose no interstício. A glicose é transportada através da membrana das células  $\beta$  pelo GLUT2 (7). Uma vez no interior dessas células, ela é rapidamente metabolizada, aumentando assim a concentração de ATP. Esse aumento inibe os canais para  $K^+$  (potássio) sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ), levando ao acúmulo intracelular de  $K^+$ , gerando, conseqüentemente, a despolarização da membrana, fazendo com que abram os canais de  $Ca^{2+}$  (cálcio) sensíveis a voltagem. A ativação dos canais de  $Ca^{2+}$  aumenta o influxo de  $Ca^{2+}$ , elevando a concentração do mesmo, o que promove a translocação dos grânulos secretores, fusão dos mesmos na membrana, ocorrendo então a liberação de insulina no interstício (8,9).

Em resposta à ingestão de alimentos ocorre aumento na secreção de insulina, e a insulinemia eleva-se rapidamente, o que é fundamental para manter os níveis glicêmicos pós-prandiais dentro da normalidade, e manter a glicemia normal entre as refeições.

De uma forma geral e simplificada, a sinalização intracelular da insulina começa com a sua ligação a um receptor de membrana específico que quando ativado fosforila vários substratos protéicos em tirosina, que cria locais de

reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia a Src 2 (SH2), dentre as quais se destaca fosfatidilinositol 3- cinase (PI3K) (8), a qual é importante para a regulação do transporte de glicose estimulado por insulina.

## **1.2 Nefropatia Diabética (ND)**

O DM é uma causa comum de disfunção renal. A nefropatia diabética é uma doença renal caracterizada por hiperfiltração glomerular (inicial), e que evolui para redução da filtração glomerular, com proteinúria persistente e esclerose glomerular. Tudo isto pode se relacionar com alterações no fluxo tubular de glicose (tubulopatia). O principal determinante na gênese da nefropatia diabética é a hiperglicemia (10), entretanto, o túbulo proximal também desempenha um papel crítico na gênese dessa doença (11), pois um transporte de glicose aumentado, através da célula epitelial pode amplificar os efeitos da hiperglicemia no interstício periglomerular e contribuir para sua progressão (12).

A ND é a principal causa de estágio final da insuficiência renal crônica (IRC) em países desenvolvidos (13). Aproximadamente 20% dos pacientes que tem DM, há mais de dez anos, desenvolvem ND (14), sendo esta uma complicação que envolve alterações estruturais, como a hipertrofia renal, espessamento da membrana basal e acúmulo progressivo de componentes de matriz extracelular no glomérulo e no interstício tubular (15-17). No processo de desenvolvimento da nefropatia, alterações de transportadores de glicose no túbulo proximal parecem desempenhar um importante papel, como será comentado adiante.

## **1.3 Transportadores de glicose no rim**

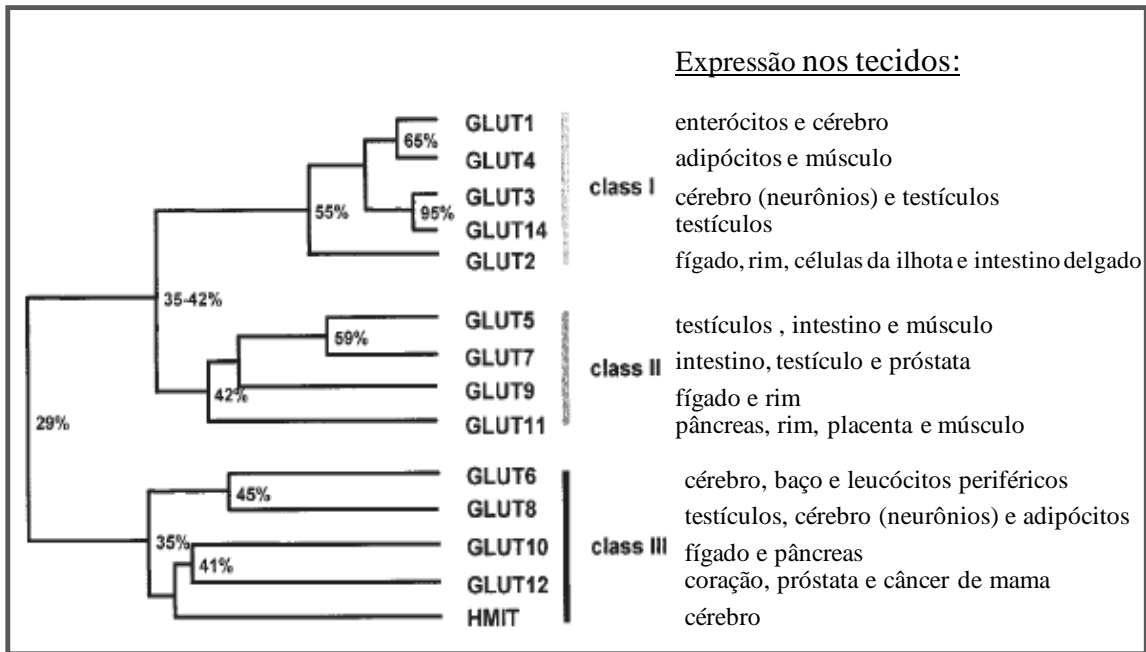
A glicose sanguínea é provida: 1) pela absorção da glicose da dieta; 2) pela liberação de glicose hepática, através da degradação do glicogênio (glicogenólise) e da produção de novas moléculas (gliconeogênese); e 3) pela liberação renal, via gliconeogênese, e reabsorção da glicose filtrada no glomérulo. A reabsorção da glicose filtrada nos túbulos proximais renais é um processo essencial para evitar a excreção deste substrato energético, além de participar da manutenção da

homeostase glicêmica. Estima-se que a quantidade de glicose filtrada no glomérulo e posteriormente reabsorvida no túbulo seja na ordem de 162 g/dia (18).

A membrana plasmática é impermeável à glicose e, há décadas, estudos utilizando análogos não metabolizáveis marcados radioativamente indicaram que a glicose penetra na maioria das células por difusão facilitada, a favor do gradiente de concentração, e de maneira saturável. Estas características implicam na existência de uma proteína transportadora, com determinada afinidade pelo substrato, cujo transporte se satura quando todas as moléculas estão atuando.

No final dos anos 80, uma proteína transportadora de glicose foi isolada de células de hepatoma humano (Hep G2) e caracterizada como transportador “*erythroid/ brain*” (19). Posteriormente, a partir de bibliotecas de cDNA (*complementary DNA*), várias outras proteínas correlatas foram clonadas em diferentes tecidos. Essas proteínas foram designadas como transportadores de glicose (GLUTs - *Glucose Transporters*) e numeradas de acordo com a ordem cronológica de clonagem: GLUT1 – GLUT14 (20,21), como mostrado na figura 1.

Os GLUTs são expressos pelo gene *Slc2a* e são tecido específicos (21). Possuem um peso molecular entre 42 e 50 kDa, seus domínios transmembrânicos incluem um feixe de 12 alfa-hélices perpendiculares à membrana plasmática, que se distribuem de forma a constituírem um canal hidrofílico por onde a glicose flui. As porções NH<sub>2</sub> (amina) e COOH (carboxila) terminais encontram-se no intracelular.



**Figura 1:** Dendrograma da família de transportadores de glicose em humanos (GLUTs). As porcentagens nos galhos da árvore indicam o grau de identidade entre as isoformas. Fonte: Adaptado de Andrea Scheepers (2004).

O GLUT2, foco do presente estudo, foi identificado por clonagem de cDNA e sua presença foi confirmada pela técnica de microscopia por imunofluorescência na membrana plasmática de hepatócitos e células beta pancreáticas, assim como na membrana basolateral das células epiteliais de rim e intestino (22). O GLUT2 é um transportador de alta capacidade e baixa afinidade, que confere uma propriedade glico-sensora às células em que se expressa. É o membro da família de proteínas GLUTs que apresenta o maior  $K_m$  (capacidade de transporte) para a glicose (até 20 mmol/L, conforme a técnica de análise) (23).

Além dos GLUTs existe outra família de transportadores de glicose, denominada SGLT, cujas proteínas são codificadas pelos genes *Slc5a*. São cotransportadores de  $\text{Na}^+$ -glicose, nos quais o sódio ( $\text{Na}^+$ ) é transportado a favor do seu gradiente eletroquímico, gerando energia para o transporte da glicose contra o seu gradiente de concentração. São conhecidas três isoformas: SGLT1, SGLT2 e SGLT3.

A sequência primária dos SGLTs evidenciou 14 domínios transmembrânicos, e terminações amina e carboxila são altamente hidrofóbicas, parecendo estar justapostas a membrana plasmática. O SGLT1 encontrado em epitélio intestinal e no segmento S3 do túbulo proximal, foi clonado a partir de células de intestino humano

(24). Já o SGLT2 foi clonado a partir de uma biblioteca de rim humano, utilizando o SGLT1 como base.

O SGLT2, expresso pelo gene *Slc5a2*, é um transportador de glicose dependente de Na<sup>+</sup>, com alta capacidade de transporte e baixa afinidade. Transporta um íon Na<sup>+</sup> para cada molécula de glicose. Este transportador é predominantemente expresso em rim, onde medeia a reabsorção da maior parte do filtrado de glicose no segmento S1 (25).

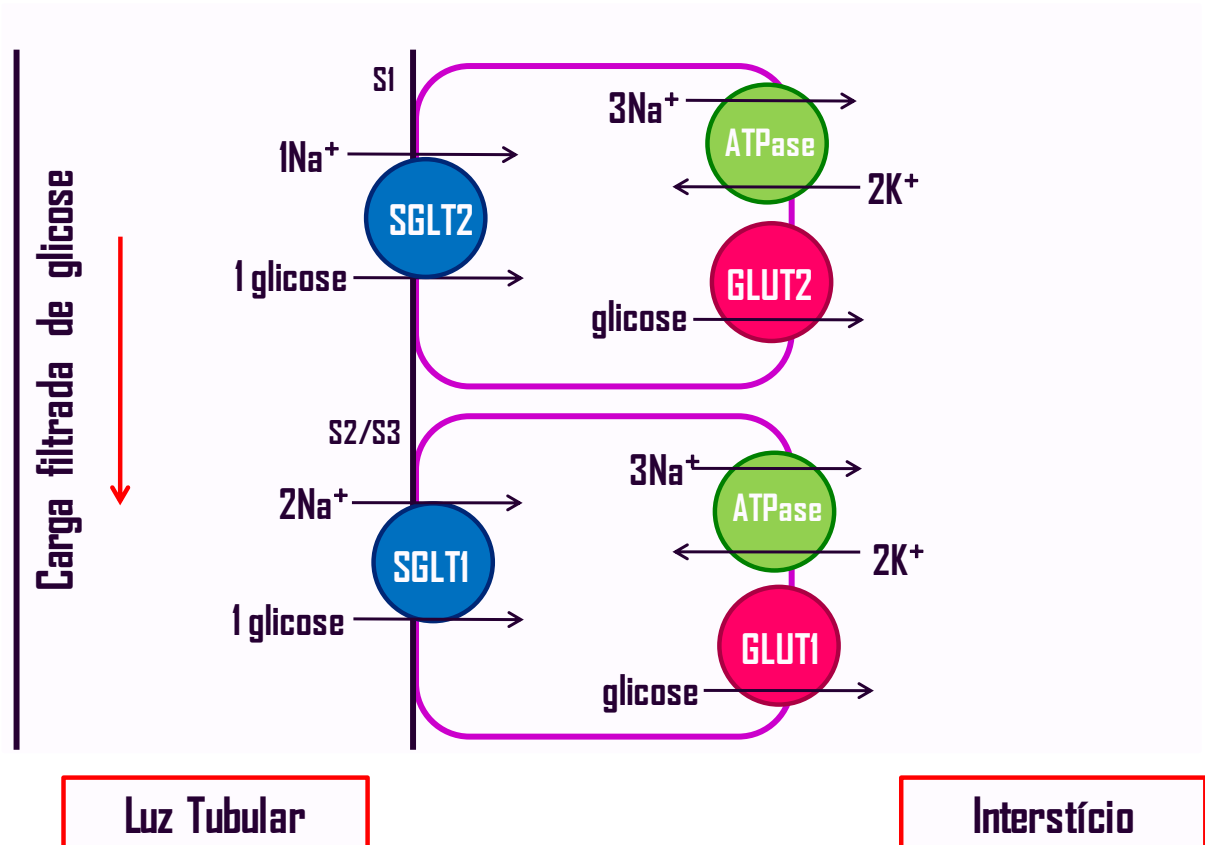
#### **1.4 Reabsorção de Glicose no Túbulo Proximal**

O túbulo proximal (TP) renal é revestido por um epitélio cúbico simples, no qual as células apresentam duas membranas com diferentes características de transporte e permeabilidades: a membrana apical, que separa a célula do lúmen tubular e possui numerosas microvilosidades; e a membrana basolateral, que limita a célula com o interstício (5).

O TP é dividido em 3 segmentos: S1, S2 e S3. Os três segmentos têm mecanismos de transporte de glicose semelhante, o que difere é o aspecto quantitativo. Em condições normais, os túbulos proximais, reabsorvem cerca de 70% do Na<sup>+</sup> e quantidades variáveis de potássio, cálcio, fosfato, magnésio, ácido úrico e uréia do ultrafiltrado glomerular. Além disso, o TP reabsorve toda a glicose e todos os aminoácidos do ultrafiltrado. (5)

A reabsorção renal de glicose é um processo coordenado que ocorre nas células epiteliais do túbulo proximal, envolvendo as duas classes de proteínas transportadoras de glicose: os SGLTs e os GLUTs (26,27). No rim, a maior parte da carga filtrada de glicose é rapidamente reabsorvida na porção inicial do túbulo proximal - segmento S1 (~ 95%). Neste segmento, são co-expressos SGLT2, na membrana apical e GLUT2, na membrana basolateral. O GLUT2 participa da etapa limitante do processo de reabsorção da glicose, que é o efluxo do substrato para o interstício peritubular, de onde será drenado pela circulação sanguínea local (22). Na transição para a porção reta do túbulo proximal (segmento S3), onde uma quantidade residual de glicose é reabsorvida, dois outros tipos de transportadores são co-expressos: SGLT1, na membrana apical; e GLUT1, na membrana basolateral (28,29) como mostrado na figura 2.





**Figura 2.** Reabsorção de glicose no túbulo proximal. A figura representa duas células do túbulo proximal, a primeira do segmento S1 e a segunda do segmento S2/S3. Nelas são demonstrados os transportadores de glicose: SGLT1 e SGLT2 na membrana apical e GLUT1 e GLUT2 na membrana basolateral.

A região cortical do rim é um território que tem sido amplamente investigado, dada a sua relevância na gênese de alterações fisiopatológicas, como a nefropatia diabética. Já se demonstrou que no DM ocorre aumento na reabsorção tubular de glicose, o que envolve um aumento na expressão de SGLT2 e GLUT2 (26,30,31). Além disso, já foi demonstrado também, em células epiteliais de túbulo proximal isoladas da urina de portadores de DM2, aumento no mRNA de SGLT2 (32).

Nosso grupo já investigou os efeitos do diabetes e do tratamento com insulina sobre a expressão do GLUT2 e SGLT2 em rim, demonstrando que cronicamente (6 dias) o controle glicêmico promovido pelo tratamento tanto com insulina como com florizina, reverte a hiperexpressão das proteínas GLUT2 e SGLT2 (26,27).

Recentemente, a participação do SGLT2 na reabsorção tubular de glicose no DM assumiu grande importância, pelo advento dos inibidores de SGLT2 como drogas coadjuvantes no tratamento do DM.

## 1.5 Reabsorção de Sódio no Túbulo Proximal

O movimento de água nos rins está relacionado, de várias maneiras, ao transporte de  $\text{Na}^+$ . No túbulo proximal, a reabsorção de  $\text{Na}^+$  é realizada de modo isosmótico, onde a reabsorção do soluto e da água é acoplada, proporcional uma à outra, e está regulada para manter o volume sanguíneo, o que difere da porção espessa ascendente da alça de Henle, onde a reabsorção do  $\text{Na}^+$  sem água constitui a base tanto para a excreção do excesso de água, como para a conservação da água mediante produção de urina diluída ou concentrada (33).

O  $\text{Na}^+$  é o íon mais importante do meio extracelular e a manutenção do volume do líquido extracelular depende do balanço do mesmo. A energia para a reabsorção proximal de  $\text{Na}^+$  é derivada da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, também conhecida como bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , localizada na membrana basolateral das células epiteliais. A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase é uma proteína integral de membrana expressa em todas as células. Dependendo do tipo celular, esta bomba pode estar distribuída de forma uniforme na superfície celular ou agrupada em certos domínios membranais, como nas células epiteliais de rim e intestino (5). A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase é a responsável pela extrusão de  $\text{Na}^+$  em todos os segmentos do néfron que o absorvem, apesar de terem diferentes níveis de atividade.

O transporte de  $\text{Na}^+$  através dos segmentos dos néfrons é muito importante na regulação da reabsorção do mesmo, assim como da pressão sanguínea. Entre vários reguladores deste processo, a insulina age em quase todos os segmentos dos néfrons e é um forte potencializador da reabsorção de  $\text{Na}^+$  (34). O principal regulador localizado na membrana apical do túbulo proximal é o sódio-próton permutador do tipo 3 (NHE3), onde estudos mostraram que a insulina aumenta diretamente a sua atividade, aumentando a entrada de  $\text{Na}^+$  (35). Na membrana basolateral do túbulo proximal, é encontrado o cotransportador de bicarbonato de sódio  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  (NBCe1) que desempenha um papel importante na saída de bicarbonato de sódio e também é regulado pela insulina (36,37).

Estudos mostraram, que a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase é também um alvo da insulina, contribuindo para o aumento da reabsorção de  $\text{Na}^+$  (38,39), a qual estimula a atividade desta bomba (40).

Portanto, a insulina parece estimular todos os transportadores envolvidos na reabsorção de  $\text{Na}^+$  nos túbulos proximais.

## 1.6 Fatores Transcricionais relacionados à expressão de *Slc2a2* e *Slc5a2*

Fatores transcricionais são proteínas que, quando no núcleo, ligam-se a regiões específicas do promotor gênico, ativando ou reprimindo a transcrição do gene. Fatores Nucleares do Hepatócito (HNFs) são uma família de fatores de transcrição que foram isolados a partir de fígado de rato, onde regulam genes especificamente expressos em hepatócitos. Porém, após a clonagem de seus cDNAs e utilizando sondas em experiências de hibridação, descobriu-se que estes fatores não são restritos aos hepatócitos (41).

Entre os HNFs conhecidos destacam-se: 1) hepatocyte nuclear fator 1A - HNF1A (antigamente conhecido como HNF-1 $\alpha$ ), 2) forkhead box A2 – FOXA2 (antigamente conhecido como HNF-3 $\beta$ ), e 3) hepatocyte nuclear fator 4A – HNF4A (antigamente conhecido como HNF-4 $\alpha$ ). Sabe-se que estes fatores regulam genes alvo, incluindo eles próprios. Por exemplo, a região promotora do gene *Hnf1a* possui local de ligação para FOXA2 e HNF4A (42-45), podendo ser regulado positivamente por ambos os fatores (46-49). Além disso, o FOXA2 pode ligar-se aos promotores tanto do *Hnf1a* como do *Hnf4a*, o que sugere que o FOXA2 seja o principal regulador desses fatores de transcrição (43-45).

Existem alguns casos raros de um subtipo de DM de caráter monogênico, no qual a causa genética está relacionada com um único gene, com padrão de herança autossômico dominante, denominados MODY (maturity-onset diabetes of the young). Os MODY são numerados de acordo com o gene comprometido. Os MODY 1, 3 e 5 resultam de mutações nos genes dos HNF4A, HNF1A e FOXA2, respectivamente, ressaltando sua importância para a regulação de proteínas importantes para a homeostase glicêmica. Esses fatores transcricionais, que são alvos do presente estudo, regulam a expressão de vários genes, como por exemplo, o da insulina nas células  $\beta$  e genes de enzimas do metabolismo da glicose, no fígado (5).

### 1.6.1 HNF1A (codificado em rato pelo gene *Hnf1a*)

HNF1A, antigamente conhecido como HNF-1 $\alpha$ , é um fator transcricional que liga-se ao DNA como homodímero, ou seja, uma molécula é composta por duas unidades similares ou monômeros unidos, e é expresso não apenas no fígado, mas

também em rim, pâncreas e intestino, e já foi relacionado a alterações na expressão dos genes *Slc2a2* (GLUT2) e *Slc5a2* (SGLT2) tanto em rim como em fígado de ratos diabéticos (50).

No embrião, o HNF1A guia o desenvolvimento do fígado e continua a ter importância no indivíduo adulto; muitas funções aparecem ou desaparecem dependendo da expressão destes fatores de transcrição (51).

É interessante ressaltar que mutação no gene *HNF1A* (em letras maiúsculas por referir-se ao gene humano) está associada ao fenótipo de diabetes do tipo MODY3 (52). Os pacientes afetados por MODY3 têm comprometimento da secreção de insulina estimulada por glicose, o que depende da proteína GLUT2, indicando a importância do HNF1A na regulação do gene que codifica o GLUT2 (53-55). Ainda é importante lembrar que os pacientes com MODY3 apresentam deficiência na reabsorção renal de glicose, o que já foi relacionado à redução na expressão do GLUT2 e SGLT2 (56) e frequentemente desenvolvem complicações microvasculares (57). Além disso, camundongos knockout para *Hnf1a* desenvolvem sinais de síndrome de Fanconi, com comprometimento hepático e renal, mostrando que o HNF1A é importante para a expressão dos genes *Slc2a2* e *Slc5a2* (58).

#### 1.6.2 HNF4A (codificado em rato pelo gene *Hnf4a*)

Assim como o HNF1A, o HNF4A é um fator transcricional que se liga ao DNA como homodímero e expressa-se de forma importante em fígado, rim e ilhota pancreática (59). Sua mutação pode causar diabetes do tipo MODY1 (60). O HNF4A também tem sido considerado um importante fator de transcrição dentre os HNFs, pois é um regulador essencial do gene do *Hnf1a* (42,46), o que aponta para um ciclo regulatório positivo entre esses dois fatores. HNF4A é um membro-chave da rede de regulamentação complexa que define o fenótipo de hepatócitos. A atividade de HNF4A é regulada de várias maneiras, incluindo modificações pós-transcricional, tais como fosforilação e interações proteína-proteína com outros fatores transcricionais (60). Estudos de nosso laboratório já demonstraram a participação do HNF4A na regulação do gene *Slc2a2* em fígado e rim de animais diabéticos (50).

### 1.6.3 FOXA2 (codificado em rato pelo gene *Foxa2*)

FOXA1 (HNF-3 $\alpha$ ), FOXA2 (HNF-3 $\beta$ ) e FOXA3 (HNF-3 $\gamma$ ) são codificados respectivamente pelos genes (Forkhead box A) *Foxa1*, *Foxa2* e *Foxa3* (34). Estes fatores transcricionais são capazes de reconhecer a mesma sequência de DNA, mas com afinidades distintas (61,62).

O FOXA2 desempenha papel central na manutenção da homeostase glicêmica pela regulação da expressão gênica de enzimas da glicólise, gliconeogênese e glicogenólise no fígado e no rim. (63,64). Este fator transcricional é diretamente fosforilado por uma “serine/threonine-protein”, a AKT. Uma vez fosforilado, permanece inativo no citoplasma de hepatócitos, resultando na inibição da sua atividade. Assim, a insulina plasmática inibe a atividade do FOXA2 no período pós-prandial, e quando os níveis de insulina estão reduzidos, no jejum, este fator transcricional se transloca para o núcleo e é capaz de ativar genes.

O FOXA2 é essencial para a regulação do GLUT2 tanto em fígado como em rim de animais diabéticos (48,50). Além disso, já se sabe que a super-expressão do gene *Slc2a2*, regulada pelo FOXA2, pode ser inibida por insulina através da via de sinalização PI3K-AKT (64).

Com base em dados da literatura (50,65), as localizações dos sítios de ligação dos HNFs na região promotora do gene *Slc2a2* são mostradas na **figura 3**.



**Figura 3:** Localização dos sítios de ligação dos fatores transcricionais HNF1A, HNF4A e FOXA2 no promotor do *Slc2a2*.

## 1.7 AKT (codificada pelo gene *Akt1*)

A AKT (serine/threonine-protein kinase), também conhecida como PKB, é uma cinase, responsável por transferir o grupo fosfato terminal do ATP para um ou mais aminoácidos [serina ou treonina] de uma proteína-alvo. Seu peso molecular é de aproximadamente 60 kDa, e possui dois sítios de fosforilação: um na Treonina 308 (T308) e o outro na Serina 473 (S473). Esta cinase desempenha um papel regulador em diversos processos celulares, como apoptose, proliferação celular e metabolismo da glicose.

Com a descoberta do vírus mutante de leucemia em camundongos, chamado de Akt8, pesquisas envolvendo AKT foram iniciadas. Esse vírus tem a capacidade de formar focos malignos em linhagens celulares e foi encontrado em alta incidência em linfomas espontâneos (66).

Em 1991, estudos identificaram os genes correspondentes a AKT (67) e em seguida foram descritas suas diferentes isoformas em mamíferos (68):

- AKT1/PKB $\alpha$ : tem uma ampla distribuição nos tecidos e está envolvida no processo de sobrevivência celular, inibindo processos de apoptose e induzindo via de síntese de proteínas;
- AKT2/PKB $\beta$ : é encontrada, predominantemente, em células adiposas e musculares e é importante para via de sinalização da insulina e transporte de glicose.
- AKT3/PKB $\gamma$ : é expressa em cérebro e testículos, porém o seu papel ainda não está bem esclarecido.

As três isoformas têm domínio com aproximadamente 85% de identidade com a plequistrina (PH), e os resíduos do local ativo são idênticos, o que nos mostra que a inibição da AKT está diretamente ligada ao domínio PH (69). Esse domínio estruturalmente se liga ao grupo inositol de fosfoinosítídeos e direciona as proteínas ligadas a ele para a superfície interna da membrana plasmática. Seus efeitos dependem da ativação de várias cinases intracelulares envolvidas na transmissão do sinal de insulina até a captação de glicose, a síntese de glicogênio e a síntese proteica. A AKT é alvo da enzima fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) na cascata de reações que medeiam os efeitos da insulina na produção de glicose hepática, glicogênio e síntese proteica.

Estudos em camundongos knockout do gene Akt2/PKB $\beta$  apresentaram importante resistência à insulina, acompanhada de retardo de crescimento e perda de tecido adiposo (68).

### 1.7.1 Ativação da AKT

A ativação da cascata de sinalização da AKT depende da fosforilação em uma ou ambas as posições (T308 e S473) para alinhar corretamente os resíduos para criar uma conformação cataliticamente competente, sendo que duas cinases diferentes estão envolvidas na fosforilação destes sítios.

Esta ativação começa por um sinal extracelular que ativa um receptor de tirosina-cinase, recrutando a PI3K para a membrana plasmática, ativando-a. Esta, por sua vez, fosforila PIP2 (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato) e gera o segundo mensageiro PIP3 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato), que recruta duas proteínas-cinases para a membrana plasmática, via domínio PH, a AKT e a PDK1 (proteína cinase dependente de fosfoinosítídeos 1). A PDK1, por sua vez, fosforila o resíduo T308 da AKT. Porém, é necessária uma segunda fosforilação, em S473, que é considerada como passo limitante para a atividade cinase, uma vez que corresponde ao estado de conformação ativa da AKT.

A mTOR também é uma serine/threonine-protein cinase, membro da via PI3K/AKT, que se encontra envolvida em múltiplas funções biológicas como controle da tradução, transcrição e degradação protéica, além disso regula o crescimento celular e organiza o citoesqueleto da actina (70). Essa proteína existe nas células em dois complexos multiproteicos distintos: mTORC1, que contém proteínas específicas RAPTOR, este complexo é sensível a rapamicina e estimula o crescimento e a sobrevivência celular; e mTORC2, que contém a proteína RICTOR e é insensível à rapamicina, este ajuda na ativação da AKT e regula o citoesqueleto de actina (71).

Portanto, para que ocorra a ativação total da AKT, a segunda fosforilação ocorre quando a PI3K ativa mTORC2, fazendo com que esta, fosforile o resíduo S473 da AKT, ativando-a. Uma vez ativada a AKT se dissocia da membrana plasmática e fosforila várias proteínas-alvo.

Estudos em hepatócitos mostraram que a ativação, pela insulina, da via PI3K/AKT induz fosforilação do FOXA2, o que é importante para a sua atividade transcricional (64).

Porém, como em todas as rotas de sinalização, existe um mecanismo para o término da atividade da via PI3K/AKT. Uma fosfatase específica chamada de PTEN, remove o grupo fosfato da posição 3 do PIP3, gerando PIP2, onde a cadeia de sinalização é rompida, uma vez que PIP2 não serve como sítio de ligação para AKT.



## 2 JUSTIFICATIVA

Alterações no fluxo transtubular de glicose determinam variações na quantidade de glicose reabsorvida, o que é fundamental na fisiopatologia renal do diabetes. Neste processo, estudos *in vivo* indicam que os fatores transcricionais HNF1A, HNF4A e FOXA2 participam da hiperexpressão do gene *Slc2a2* em rim de ratos diabéticos, o que reverte com a insulinoterapia. Contudo, o controle da glicose e/ou da insulina nessa regulação não está definido. Esse conhecimento deve trazer grande contribuição no estabelecimento de medidas que possam prevenir e/ou brevar a progressão da tubulopatia diabética.

Assim, utilizando células imortalizadas de túbulo proximal de ratos - IRPTC (72,73), o presente estudo investiga os efeitos da insulina e da glicose sobre a regulação dos genes *Slc2a2* e *Slc5a2*, buscando determinar a participação dos fatores transcricionais HNF1A, HNF4A e FOXA2, assim como a possível mediação da AKT, nesta regulação.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Investigar o papel da alta concentração de glicose e da insulina na expressão gênica do *Slc2a2* e *Slc5a2*, em células renais IRPTC.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Investigar a participação dos fatores transcricionais HNF1A, HNF4A e FOXA2, assim como da cinase AKT, nas regulações da expressão dos genes *Slc2a2* e *Slc5a2* induzidas por glicose e/ou insulina.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Células imortalizadas de túbulo proximal de ratos (IRPTC) foram tratadas de acordo com o protocolo padrão em ambiente umidificado composto por 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram propagadas em meio DMEM (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), contendo 10% de Soro Fetal Bovino (Cultilab), 0,2% de L-Glutamina (Sigma) e 100 U/mL de Penicilina e Estreptomicina (Sigma), de forma a atingirem confluência. As células foram inicialmente propagadas em DMEM contendo 5 mM de glicose, durante 14 dias, realizando-se um replaqueamento no 7º dia. Então, as células foram replaqueadas novamente, e passaram a ser tratadas em meios contendo glicose 5 mM (baixa glicose) ou 25 mM (alta glicose) por mais 14 dias. Nesse último período, foram feitos 3 replaqueamentos, uma vez que a proliferação celular em alta glicose é acelerada. O replaqueamento foi feito no mesmo momento para ambas as condições (baixa e alta glicose), ajustando-se o volume de células utilizadas no plaqueamento a fim de que a confluência ocorresse de forma similar. Adicionalmente, no 13º dia, as células foram tratadas com insulina (100 nM de insulina, Sigma, St Louis, USA, durante as últimas 24 horas), e no 14º dia com inibidor de AKT (2 µM de inibidor de AKT1/2, Sigma, St Louis, MO, USA, ref.: A6730, durante a última hora). Foram estudados os seguintes grupos:

**B** - baixa glicose;

**A** - alta glicose.

**Ai** – alta glicose com 1 hora com inibidor de AKT;

**AI** – alta glicose com 24 horas com insulina;

**Ali** – alta glicose com 24 horas com insulina e com 1 hora com inibidor de AKT (conforme explicado para cada tratamento isolado).

Assim, todos os tratamentos encerraram-se após 28 dias de cultivo celular (14 dias de propagação + 14 de tratamento).

#### 4.1 Avaliação da expressão de mRNA de *Slc2a2*, *Slc5a2*, *Hnf1a*, *Hnf4a* e *Foxa2* por PCR convencional (do inglês, *Polimerase Chain Reaction*)

Amostras de células IRPTC, após os tratamentos, foram processadas para extração de RNA total, a partir do qual 1 ug foi submetido à reação de transcrição reversa com a enzima ImProm-IITM Transcriptase Reversa (Promega, Madison, WI, EUA), conforme descrito pelo fabricante. A partir dos cDNAs obtidos foram realizadas as curvas de ciclos de amplificação para cada primer. Os ensaios foram realizados com um número de ciclos equivalente a, no mínimo, 20% abaixo do ponto de saturação da reação (platô). Para cada gene estudado foi realizada em paralelo a amplificação de 1 gene constitutivo, GAPDH, cuja expressão gênica não se mostrou alterar pelos tratamentos. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose–EtBr e visualizados com iluminação UV. As imagens foram adquiridas em equipamento de fotovídeo documentação (UVP Biolumin System), para análise densitométrica das bandas obtidas com software apropriado para este fim (Scion Image). A expressão do RNA para cada gene foi normalizada pela expressão de GAPDH, calculada pela razão entre os valores da densitometria do gene de interesse e do gene constitutivo. Posteriormente, os resultados foram normalizados considerando-se a média dos grupos B ou A como 100 (conforme esses grupos representem o grupo controle na análise comparativa).

As sequências dos primers e as condições de amplificação estão descritas a seguir:

**Tabela 1:** Sequencia de primers e condições de amplificação.

Gene	Primer sense	Primer antisense	Produto (pb)	TM (°C)	Ciclos
<i>Slc2a2</i>	5`CATTGCTGGAAGAAGCGTATCAG 3`	5`GGAGACCTTCTGCTCAGTCGACG3`	408	55,5	40
<i>Slc5a2</i>	5` TCTGGTCATTGCCGCGTATT 3`	5` ATGTTGCTGGCGAACAGAGA 3`	150	57,0	40
<i>Gapdh</i>	5`ACATCATCCCTGCATCCACT3`	5`GGGAGTTGCTGTTGAAGTCA3`	258	55,7	34
<i>Hnf1a</i>	5`AAGATGACACGGATGACGATGG 3`	5`TGTTGAGGTGCTGGGACAGG3`	237	58,0	40
<i>Foxa2</i>	5` AAAAAGGCCTGAGGTGGCTG 3`	5` TCACGGAAGAGTAGCCCTCA 3`	213	57,5	40
<i>Hnf4a</i>	5`AAATGTGCAGGTGTTGACCA 3`	5`CACGCTCCTCTGAAGAATC 3`	178	58,0	36

## 4.2 Ensaio de Mobilidade Eletroforética (Electrophoretic Mobility Shift Assay - EMSA)

Este ensaio consiste na reação de ligação de proteínas nucleares com uma sequência de nucleotídeos específica para o fator de transcrição, e presente na região promotora do gene alvo, sendo esta previamente marcada com  $^{32}\text{P}$  pela  $\text{T}_4$  polinucleotídeo cinase. Quando o meio reacional é submetido a uma eletroforese em gel de poliacrilamida, a sonda livre (oligonucleotídeo) migra mais que a sonda ligada ao fator nuclear (banda de retardo).

### 4.2.1 Extração de proteínas nucleares

O método a ser utilizado foi modificado a partir do descrito por Andrews e Faller (1991). As células foram lavadas com 1 ml de tampão fosfato-salina gelado (PBS: NaCl 137 mM; KCl 2,68 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,27 mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,06 mM), seguindo-se uma centrifugação (1.000 x g, 4 °C, 10 min). O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 500  $\mu\text{l}$  de tampão de lise (HEPES-KOH pH 7,9 10 mM;  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM; KCl 10 mM; DTT 0,5 mM; PMSF 0,2 mM; leupeptina 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; aprotinina 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). As amostras foram incubadas em gelo por 10 min, seguido de agitação vigorosa por 30 s. Após a centrifugação (12.000 x g, 4 °C, 10 min), o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 100  $\mu\text{l}$  de tampão de extração (HEPES-KOH pH 7,9, 20 mM;  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM; EDTA 0,5 mM; DTT 0,2 mM; NaCl 420mM; Glicerol 25%; PMSF 0,2 mM; leupeptina 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; aprotinina 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) e incubado 20 minutos em gelo. A amostra foi novamente centrifugada (12.000 x g, 4 °C, 2 min), e o sobrenadante (contendo as proteínas nucleares) foi recolhido. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford utilizando o reagente Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, CA) e as amostras foram estocadas a  $-70$  °C.

### 4.2.2 Marcação da Sonda

Foram utilizados os seguintes oligos (com sequências específicas da região promotora do gene *Slc2a2*):

- HNF1A (5'-AAGGTATATTGATTGAATTACC-3'; 3,5 pmol, região +492/+513 (65)
- HNF4A (5'- CATTGTCTCTTAGAACTGCACC- 3', 3,5 pmol, -1328/-1305) (50)
- FOXA2 (5'- GTATATTGATTGA-3'; 3,5 pmol, região +495/+507) (65)

Os oligos foram marcados com a adição de 4  $\mu$ l  $\gamma$ -<sup>32</sup>P ATP (3 Ci/mmol) numa solução contendo 1  $\mu$ l de Tampão de reação (5 X), T<sub>4</sub> polimerase cinase (1 U/ $\mu$ l) em 20  $\mu$ l de volume de reação, para cada . Após incubação a 37 °C por 1 hora e meia, o excesso de  $\gamma$ -<sup>32</sup>P ATP foi retirado com resina YM-3 (Millipore). A atividade radioativa da sonda foi determinada, e utilizou-se no ensaio aproximadamente 10<sup>5</sup> cpm/ $\mu$ l.

#### *4.2.3 Reação de ligação e corrida do gel*

Em um tubo de microcentrífuga contendo 6  $\mu$ l de tampão de ligação 3X (HEPES 60 mM pH 7,6; glicerol 10%; KCl 150 mM; EDTA 0,6 mM); BSA 1,93 mg/ml; DTT 2,3 mM; Poly dIdc 0,25  $\mu$ g/ $\mu$ L; água para 15  $\mu$ l de volume final e, extrato nuclear foi adicionado sonda marcada. A fim de confirmar a especificidade da banda, foi realizado o ensaio de competição onde o oligonucleotídeo frio em excesso foi adicionado em algumas amostras. Após a adição de sonda marcada (1  $\mu$ l), as amostras foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. O conteúdo total do meio de reação foi aplicado no gel de poli-acrilamida 4% [acrilamida/bisacrilamida (30,8/1)], não desnaturante. O gel foi submetido a uma pré-corrida a 90 V por 60 min a 4 °C em tampão TBE 0,5 X (TBE1X= Tris 90 mM, Ácido Bórico 90 mM, EDTA 1 mM). Ao final dessa pré-corrida, o tampão de corrida foi substituído por um novo e as amostras foram aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada por 3 horas a 170 V. Ao final da corrida, o gel foi cuidadosamente transferido para um filtro de papel Whatman, seco à vácuo por 1 hora a 80 °C e exposto ao filme RX em cassete a -70 °C.

#### 4.2.4 Ensaio de Super Shift

O ensaio de *Super Shift* foi realizado para confirmar a identidade da banda de cada fator transcricional. Para tal procedimento, foi adicionado anticorpo para HNF1A, HNF4A e FOXA2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) na mistura de amostra.

### 4.3 Avaliação da abundância das proteínas GLUT2, SGLT2 e AKT por Western blotting

#### 4.3.1 Preparo das amostras de cultura celular

Após o tratamento, as placas contendo as células foram lavadas com PBS gelado, e homogeneizadas em 1 ml de tampão (Tris 10 mM; EDTA 1 mM; sacarose 250 mM) para o protocolo de extração de proteínas de membranas plasmática (avaliação de GLUT2 e SGLT2) (26), e em PBS para o protocolo de extrato total (avaliação da AKT).

#### 4.3.2 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas totais na amostra foi determinada pelo método de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), conforme as instruções do fabricante.

#### 4.3.3 Western Blotting

As amostras foram fervidas por 5 minutos e submetidas a eletroforese em SDS/PAGE 10%. Após a separação das frações proteicas foi realizada transferência eletroforética das amostras para uma membrana de nitrocelulose Hybond-C Super (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido), a qual seguiu para o procedimento de imunodeteção, que consistiu em: a) Incubação em PBS pH 7,2 [NaCl 0,8%;

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot (12\text{H}_2\text{O})$  0,115%; KCl 0,02%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,02%] acrescido de BSA 8%; b) Incubação por 4 horas a 37 °C com anticorpo específico (p-Akt 1,2,3 [Ser 473] – Santa Cruz; SGLT2 – Abcam; GLUT2 – Milipore); c) Incubação com anticorpo secundário conjugado a peroxidase (anti IgG de coelho, 1:12000, Chemicon) em PBS/BSA 1%; d) Incubação em solução de detecção por quimioluminescência [solução 1 (luminol 2,5 mM; ácido p-cumárico 400 mM; Tris 1 M, pH 8,5) e solução 2 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  5,4 mM; Tris 1 M, pH 8,5)] por 1 minuto. As etapas descritas foram intercaladas com lavagens sucessivas de TBS acrescido de 0,05% Tween 20. A membrana foi exposta a filme RX. A intensidade dos “blots” foi avaliada por densitometria óptica, utilizando-se o programa IMAGE MASTER 1D (AMERSHAM Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Reino Unido) e normalizados por Ponceau.

#### **4.4 Análise estatística dos resultados**

Todos os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. As médias foram comparadas utilizando-se ANOVA de uma via, com Student-Newman-Keuls como pós-teste, após confirmação de aprovação no teste de Bartlett. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

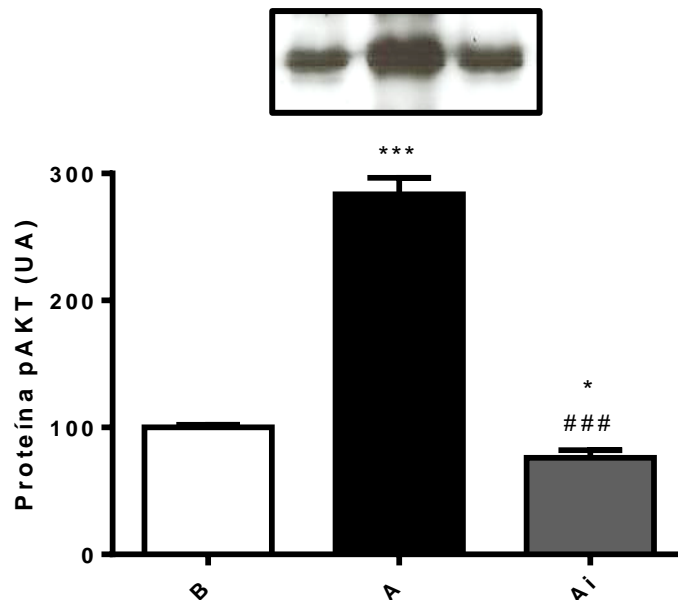


## 5 RESULTADOS

### 5.1 Alta concentração de glicose aumenta a expressão de *Slc2a2*/GLUT2

- Avaliação da AKT fosforilada (p-AKT).

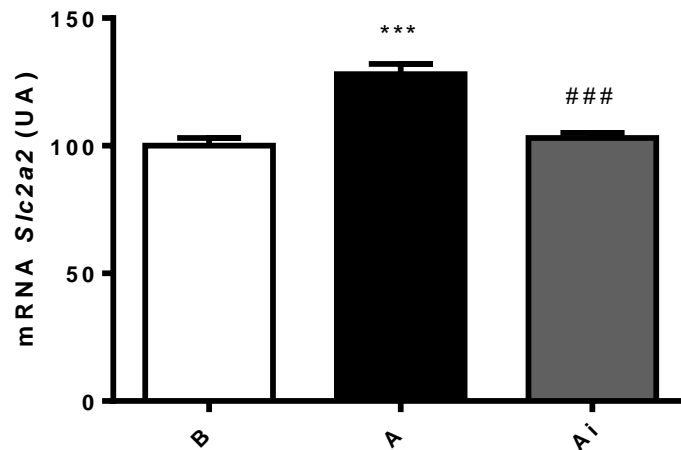
A quantificação da proteína p-AKT está apresentada na **figura 4**. O conteúdo de AKT fosforilada aumentou na presença de alta glicose ( $P < 0,001$ ), efeito este que foi abolido com uso de inibidor de AKT ( $P < 0,001$ ).



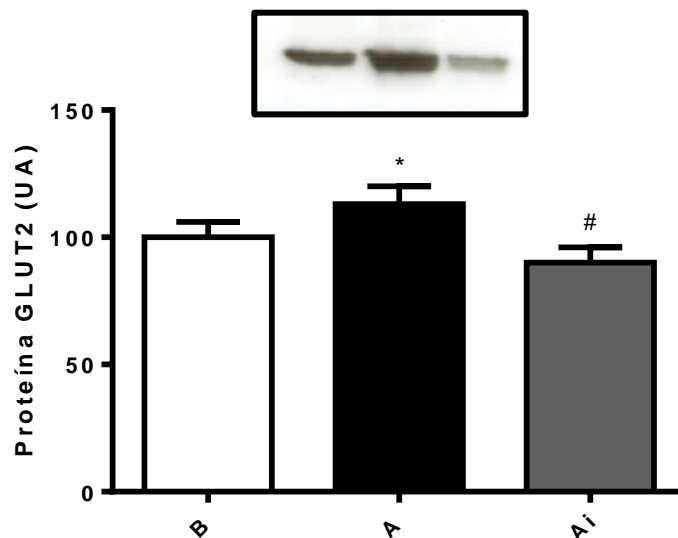
**Figura 4.** Quantificação da proteína cinase AKT fosforilada (p-AKT) em extrato total de células IRPTC cultivadas em meio com: baixa glicose (**B**), alta glicose (**A**) e alta glicose com inibidor da AKT (**Ai**). Os valores p-AKT foram normalizados considerando-se o grupo **B** como 100. Valores são média  $\pm$  EPM de 4 a 8 placas de cultivo celular. ANOVA de uma via; \*  $P < 0,05$  e \*\*\*  $P < 0,001$  vs B; ###  $P < 0,001$  vs A.

- Avaliação do mRNA *Slc2a2* e da proteína GLUT2 em células IRPTC

A quantificação do mRNA de *Slc2a2* (**figura 5**) e da proteína GLUT2 (**figura 6**), revelou que a alta concentração de glicose aumentou a expressão de *Slc2a2*/GLUT2, efeito esse que foi abolido na presença de inibidor de AKT.



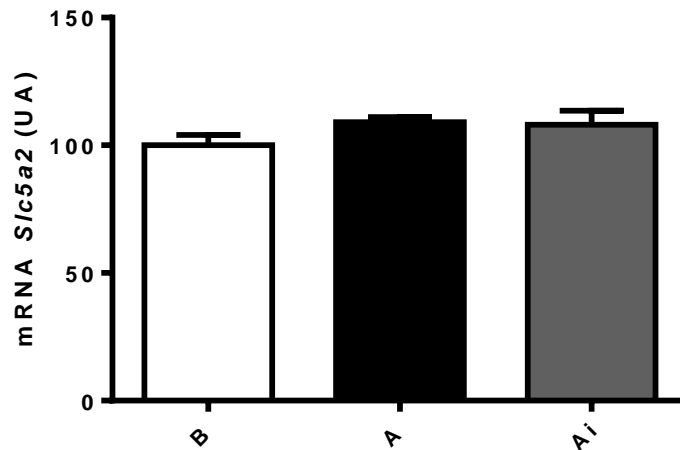
**Figura 5.** Quantificação do mRNA do *Slc2a2* em células IRPTC cultivadas em meio com: baixa glicose (**B**), alta glicose (**A**) e alta glicose com inibidor da AKT (**Ai**). Os valores de densidade do mRNA do *Slc2a2* foram normalizados considerando-se o grupo **B** como 100. Valores são média  $\pm$  EPM de 7 a 10 placas de cultivo celular. ANOVA de uma via, \*\*\*  $P < 0,001$  vs B; ###  $P < 0,001$  vs A.



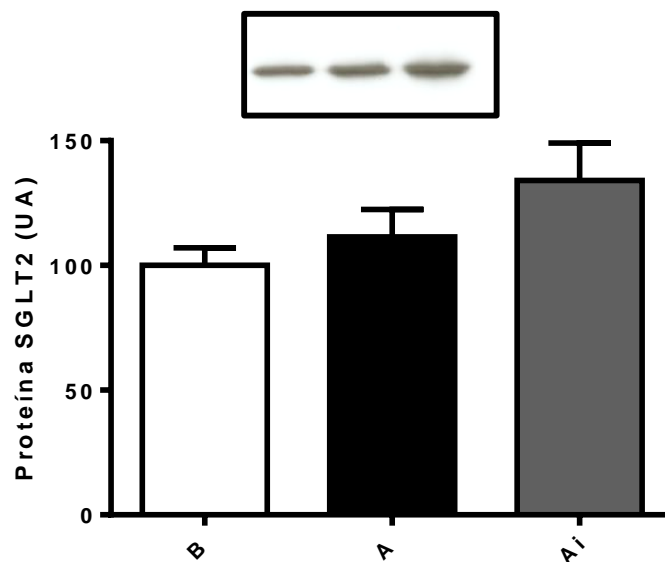
**Figura 6.** Quantificação da proteína GLUT2 em membrana plasmática de células IRPTC cultivadas em meio com: baixa glicose (**B**), alta glicose (**A**) e alta glicose com inibidor da AKT (**Ai**). Os valores de densidade da proteína GLUT2 em Membrana Plasmática foram normalizados considerando-se o grupo **B** como 100. Valores são média  $\pm$  EPM de 5 a 14 placas de cultivo celular. ANOVA de uma via. \*  $P < 0,05$  vs B; #  $P < 0,05$  vs A.

- Avaliação do mRNA *Slc5a2* e da proteína SGLT2 em células IRPTC

O conteúdo do mRNA *Slc5a2* (**figura 7**) e da proteína SGLT2 (**figura 8**) não se alterou em presença de alta concentração de glicose.



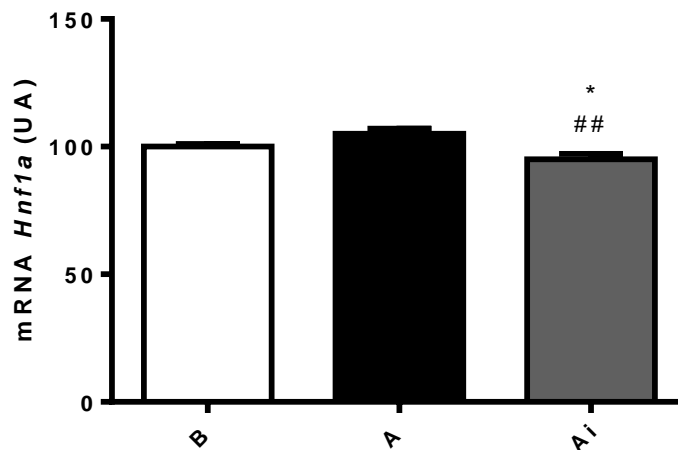
**Figura 7.** Quantificação do mRNA *Slc5a2* em células IRPTC cultivadas em meio com: baixa glicose (**B**), alta glicose (**A**) e alta glicose com inibidor da AKT (**Ai**). Os valores de densidade do mRNA do *Slc5a2* foram normalizados considerando-se o grupo **B** como 100. Valores são média  $\pm$  EPM de 5 a 6 placas de cultivo celular.



**Figura 8.** Quantificação da proteína SGLT2 em membrana plasmática de células IRPTC cultivadas em meio com: baixa glicose (**B**), alta glicose (**A**) e alta glicose com inibidor da AKT (**Ai**). Os valores de densidade da proteína SGLT2 em membrana plasmática foram normalizados considerando-se o grupo **B** como 100. Valores são média  $\pm$  EPM de 5 a 6 placas de cultivo celular.

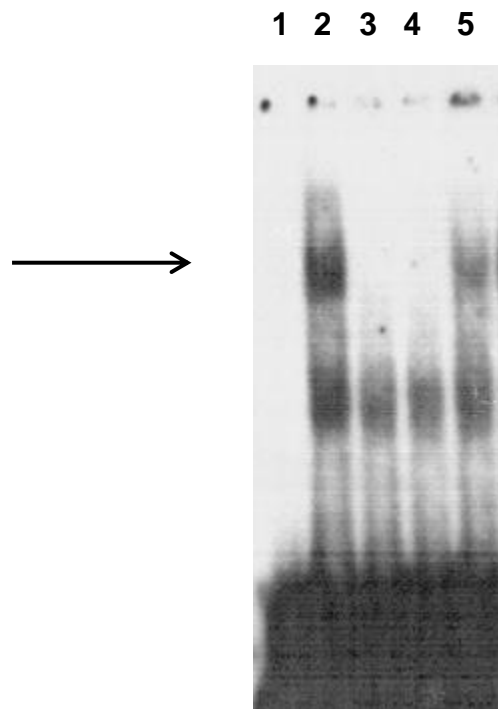
- Avaliação do mRNA do *Hnf1a* e da atividade de ligação das proteínas nucleares ao sítio de ligação do HNF1A na região promotora do gene *Slc2a2*.

A **figura 9** mostra a quantificação do mRNA do *Hnf1a*. Observa-se que houve uma diminuição no grupo **Ai** em relação aos grupos **B** e **A** ( $P < 0,05$  e  $P < 0,01$ , respectivamente).



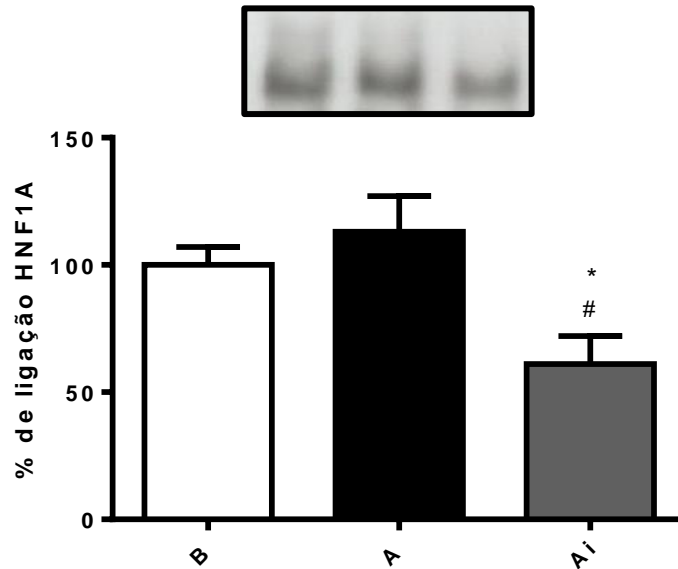
**Figura 9.** Quantificação do mRNA do *Hnf1a* de células IRPTC cultivadas em meio com: baixa glicose (**B**), alta glicose (**A**) e alta glicose com inibidor da AKT (**Ai**). Os valores de densidade do mRNA do *Hnf1a* foram normalizados considerando-se o grupo **B** como 100. Valores são média  $\pm$  EPM de 10 a 17 placas de cultivo celular. ANOVA de uma via, \*  $P < 0,05$  vs B; ##  $P < 0,01$  vs A.

Para o estudo da atividade de ligação do fator transcricional ao promotor do *Slc2a2*, primeiramente testamos a especificidade da ligação de proteínas nucleares à sonda, o que foi comprovado pelo enfraquecimento/desaparecimento da banda quando se adicionou excesso de sonda não marcada (**Figura 10**). Ainda, observa-se que a adição de anticorpo anti-HNF-1 $\alpha$  também resultou em redução da intensidade da banda, comprovando assim que o complexo molecular formado contém o fator transcricional HNF1A.



**Figura 10. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) de proteínas nucleares de células IRPTC.** A banda indicada pela seta revela proteínas nucleares ligadas ao oligo que representa o sítio de ligação do fator de transcrição HNF1A na região promotora do gene *Slc2a2*, como descrito por Cha et al. (2000). Autoradiografia do ensaio de competição e supershift. A imagem mostra: oligo marcado livre (lane 1); proteínas nucleares incubadas com oligo marcado (lanes 2, 3, 4 e 5); adição de oligo não marcado em excesso (50 x, lane 3; e 100 x lane 4); adição de anticorpo anti-HNF1A (lane 5).

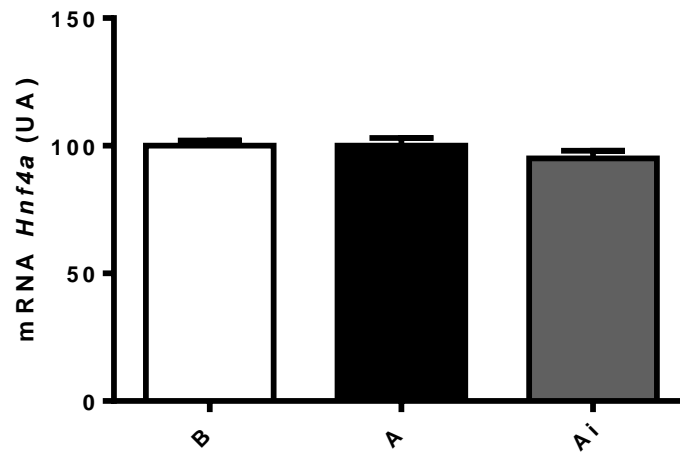
Na **figura 11** temos a quantificação da atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do HNF1A no gene *Slc2a2*. Observa-se que a glicose alta induz leve aumento (não significativo). Por outro lado, a inibição da AKT reduz de maneira importante a atividade de ligação ( $P < 0,05$ ) do HNF1A.



**Figura 11.** Quantificação da atividade de ligação de proteínas nucleares (ao sítio de ligação do HNF1A no gene *Slc2a2*) extraídas de células IRPTC cultivadas em meio com baixa glicose (**B**), alta glicose (**A**) e alta glicose com inibidor da AKT (**Ai**). Os valores de densidade óptica foram normalizados considerando-se o grupo B como 100. No topo, imagem representativa do resultado. Valores são média  $\pm$  EPM de 5 a 7 placas de cultivo celular. ANOVA de uma via, \*  $P < 0,05$  vs B; #  $P < 0,05$  vs A.

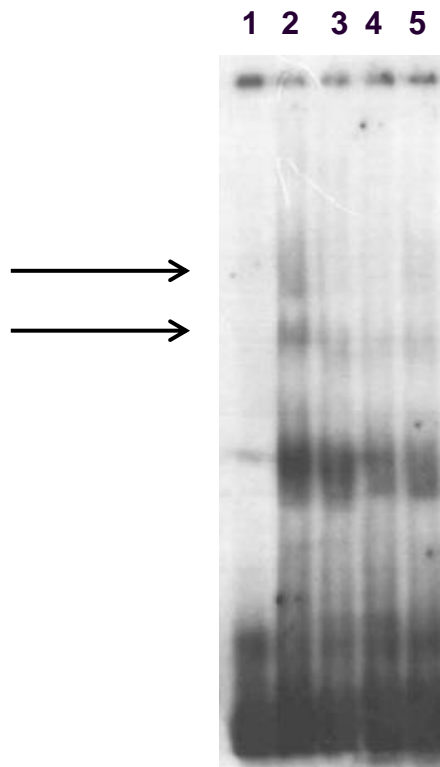
- Avaliação do mRNA do *Hnf4a* e da atividade de ligação das proteínas nucleares aos sítio de ligação do fator transcricional HNF4A na região promotora do gene do *Slc2a2*.

Na, **figura 12** vimos que o mRNA do *Hnf4a* não se alterou nas condições experimentais avaliadas.



**Figura 12.** Quantificação do mRNA do *Hnf4a* de células IRPTC cultivadas em meio com: baixa glicose (**B**), alta glicose (**A**) e alta glicose com inibidor da AKT (**Ai**). Os valores de densidade do mRNA do *Hnf4a* foram normalizados considerando-se o grupo **B** como 100. Valores são média  $\pm$  EPM de 9 a 10 placas de cultivo celular.

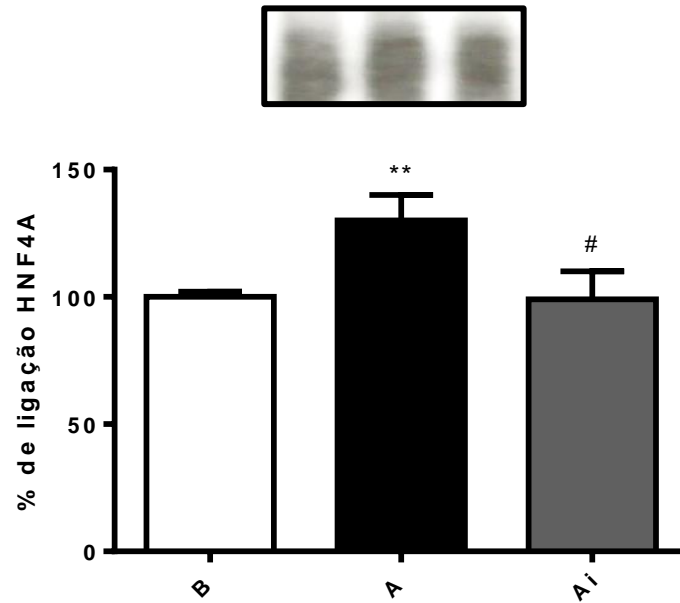
Para análise de mobilidade eletroforética, a especificidade da ligação das proteínas à sonda do HNF4A foi primeiramente testada em ensaio de competição conforme mostra a **figura 13**. Dois complexos moleculares foram observados.



**Figura 13. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) de proteínas nucleares de células IRPTC.** As bandas indicadas pelas setas revelam proteínas nucleares ligadas ao sítio de ligação do fator de transcrição HNF4A na região promotora do gene *Slc2a2*. A imagem mostra: oligo marcado livre (lane 1); proteínas nucleares incubadas com oligo marcado (lanes 2, 3 e 4); adição de oligo não marcado em excesso (50 x, lane 3; 150 x, lane 4), e adição de anticorpo anti-HNF4A (lane 5).

Na **figura 14** temos a quantificação da atividade de ligação das proteínas nucleares ao sítio de ligação do HNF4A. Observa-se um aumento em resposta à alta concentração de glicose ( $P < 0,01$  vs. B), o qual é revertido pela adição de inibidor da AKT ( $P < 0,05$  vs. A).

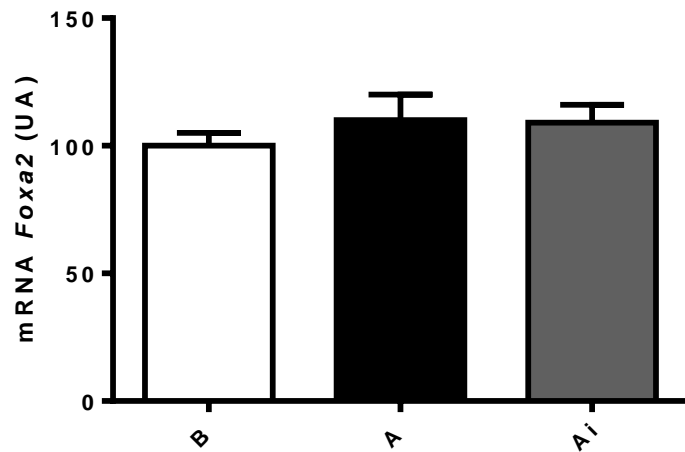




**Figura 14.** Quantificação da atividade de ligação de proteínas nucleares (ao sítio de ligação do HNF4A do promotor do *Slc2a2*) em células IRPTC cultivadas em meio com baixa glicose (**B**), alta glicose (**A**) e alta glicose com inibidor da AKT (**Ai**). Os valores de densidade óptica foram normalizados considerando-se o grupo **B** como 100. No topo, imagem representativa do resultado. Valores são média  $\pm$  EPM de 5 a 8 placas de cultivo celular. ANOVA de uma via. \*\*  $P < 0,01$  vs B; #  $P < 0,05$  vs A.

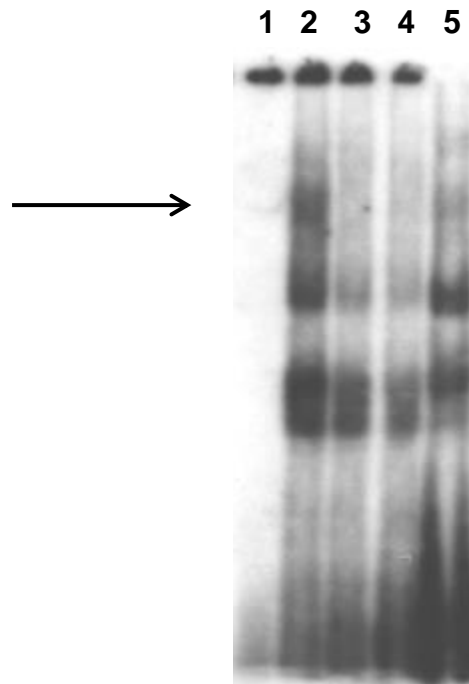
- Avaliação do mRNA do *Foxa2* e da atividade de ligação das proteínas nucleares aos sítio de ligação do fator transcricional FOXA2 na região promotora do gene do *Slc2a2*.

O conteúdo do mRNA *Foxa2* (**figura 15**) não revelou alteração significativa.



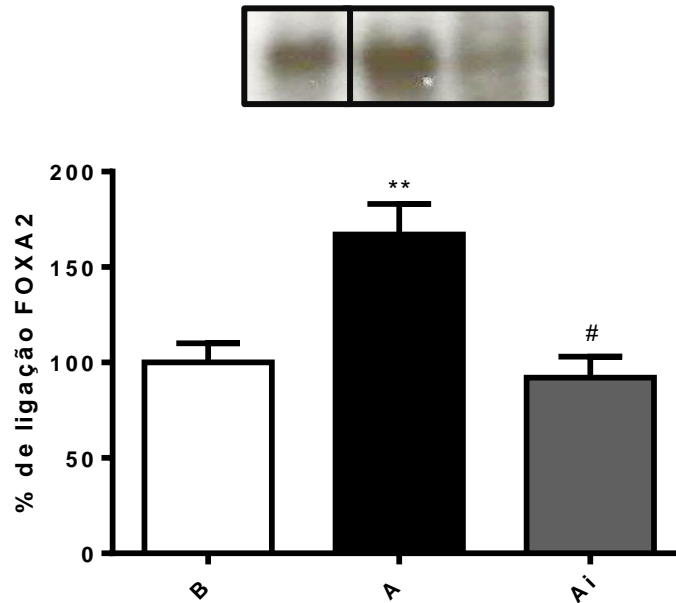
**Figura 15.** Quantificação do mRNA do *Foxa2* de células IRPTC cultivadas em meio com: baixa glicose (**B**), alta glicose (**A**) e alta glicose com inibidor da AKT (**Ai**). Os valores de densidade do mRNA do *Foxa2* foram normalizados considerando-se o grupo **B** como 100. Valores são média  $\pm$  EPM de 6 placas de cultivo celular.

A ligação das proteínas nucleares à sonda que representa o sítio de ligação do FOXA2 no promotor do *Slc2a2* foi comprovada com ensaio de competição conforme mostra a **figura 16**. Observa-se enfraquecimento/desaparecimento da banda pela adição de excesso de sonda não marcada e de anticorpo anti-FOXA2.



**Figura 16. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) de proteínas nucleares de células IRPTC.** A banda indicada pela seta revela proteínas nucleares ligadas ao sítio de ligação do fator de transcrição FOXA2 na região promotora do gene *Slc2a2*. A imagem mostra: oligo puro livre (lane 1); proteínas nucleares incubadas com oligo marcado (lanes 2, 3 e 4); adição de oligo não marcado em excesso (50 x, lane 3; 150 x, lane 4) e adição de anticorpo anti-FOXA2 (lane 5).

A quantificação da atividade de ligação das proteínas nucleares ao sítio de ligação do FOXA2 está representada na **figura 17**. Observa-se um aumento em resposta à alta concentração de glicose ( $P < 0,01$  vs. B), o qual é revertido pela adição de inibidor da AKT ( $P < 0,05$  vs. A).

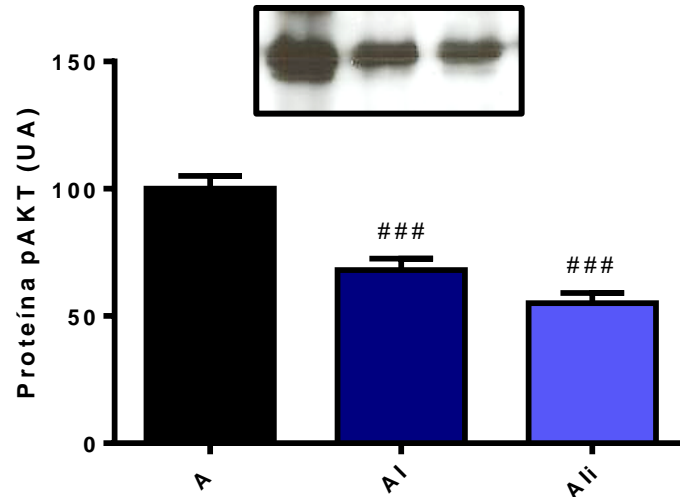


**Figura 17.** Quantificação da atividade de ligação de proteínas nucleares (ao sítio de ligação do FOXA2 no promotor do *Slc2a2*) em células IRPTC cultivadas em meio com baixa glicose (**B**), alta glicose (**A**) e alta glicose com inibidor da AKT (**Ai**). Os valores de densidade óptica foram normalizados considerando-se o grupo **B** como 100. No topo, imagem representativa do resultado. Valores são média  $\pm$  EPM de 4 a 6 placas de cultivo celular. ANOVA de uma via. \*\*  $P < 0,01$  vs B; #  $P < 0,05$  vs A.

## 5.2 Insulina reduz expressão do mRNA *Slc2a2* na presença de alta concentração de glicose

- Avaliação da AKT fosforilada.

O conteúdo de p-AKT (**figura 18**) reduziu ( $P < 0,001$ ) na presença de insulina, e a adição do inibidor de AKT não foi capaz de alterar essa resposta.

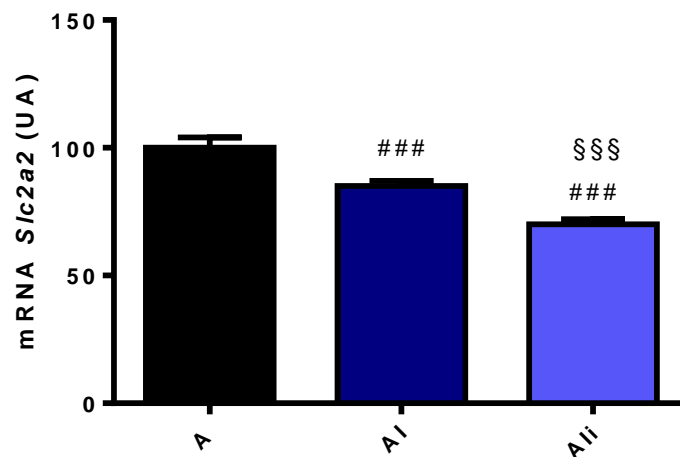


**Figura 18.** Quantificação da proteína cinase p-AKT em extrato total, de células IRPTC cultivadas em meio com: alta glicose (**A**), alta glicose com insulina (**AI**) e em meio com alta glicose, insulina e inibidor de AKT (**Ali**). Os valores de densidade da proteína cinase p-AKT foram normalizados considerando-se o grupo **A** como 100. Valores são média  $\pm$  EPM de 4 a 6 placas de cultivo celular. ANOVA de uma via. ###  $P < 0,001$  vs A.

- Avaliação do mRNA *Slc2a2* e da proteína GLUT2 em células IRPTC

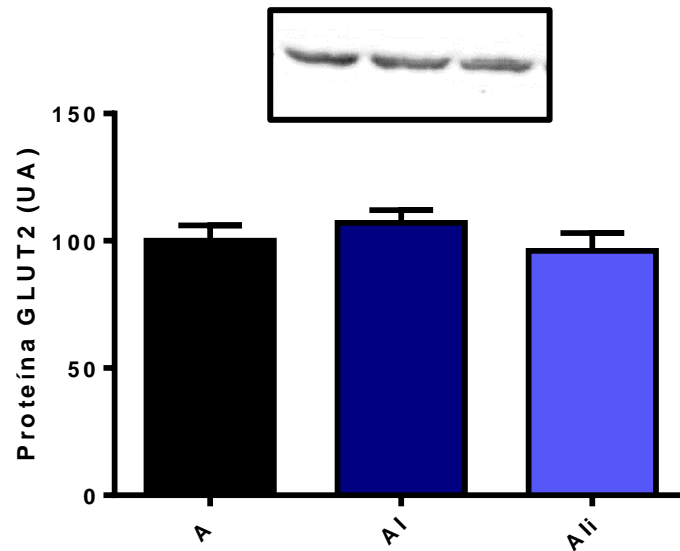
O mRNA do *Slc2a2* (**figura 19**) diminuiu nas células do grupo **AI** ( $P < 0,001$ ).

Essa redução exacerbou-se no grupo **Ali** ( $P < 0,001$  vs. AI).



**Figura 19.** Quantificação do mRNA do *Slc2a2* de células IRPTC cultivadas em meio com; alta glicose (**A**), alta glicose com insulina (**AI**) e em meio com alta glicose, insulina e inibidor de AKT (**Ali**). Os valores de densidade do mRNA do *Slc2a2* foram normalizados considerando-se o grupo **A** como 100. Valores são média  $\pm$  EPM de 5 a 8 placas de cultivo celular. ANOVA de uma via, ###  $P < 0,001$  vs A; §§§  $P < 0,001$  vs AI.

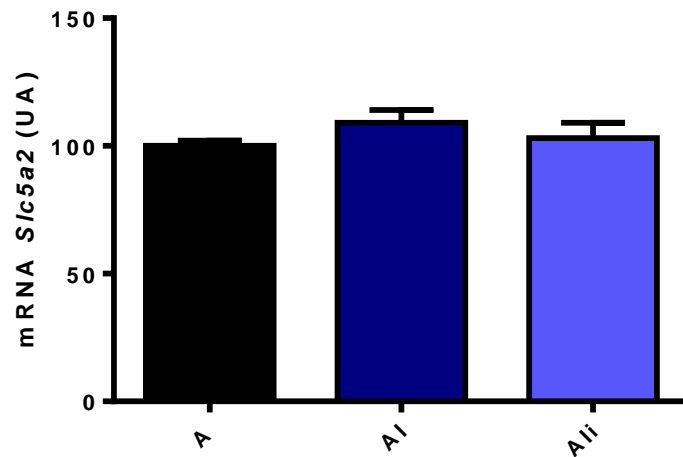
O conteúdo da proteína GLUT2 em fração de membrana plasmática pode ser observado na **figura 20**. Não detectamos diferenças significativas.



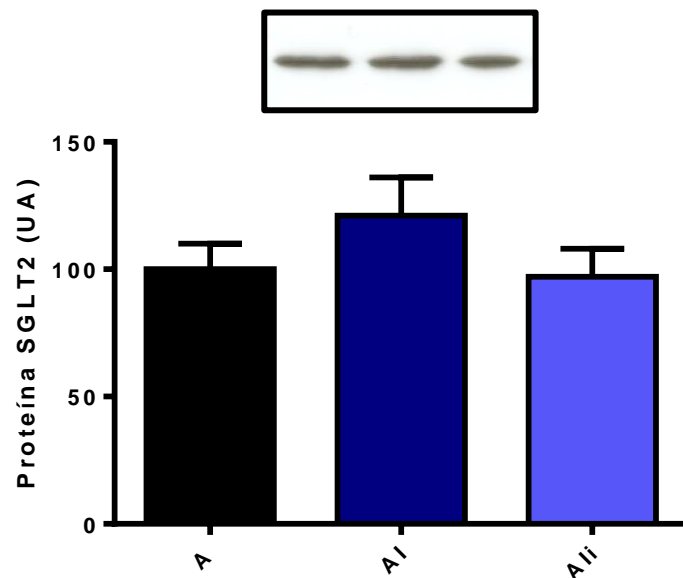
**Figura 20.** Quantificação da proteína GLUT2 em membrana plasmática de células IRPTC cultivadas em meio com: alta glicose (**A**), alta glicose com insulina (**AI**) e em meio com alta glicose, insulina e inibidor de AKT (**AII**). Os valores de densidade da proteína GLUT2 foram normalizados considerando-se o grupo **A** como 100. Valores são média  $\pm$  EPM de 6 a 10 placas de cultivo celular.

- Avaliação do mRNA *Slc5a2* e da proteína SGLT2 de células IRPTC

Nem o conteúdo do mRNA *Slc5a2*, nem o conteúdo da proteína SGLT2 (**figura 21** e **figura 22**, respectivamente) alteraram-se na presença da insulina, independentemente da presença do inibidor da AKT.



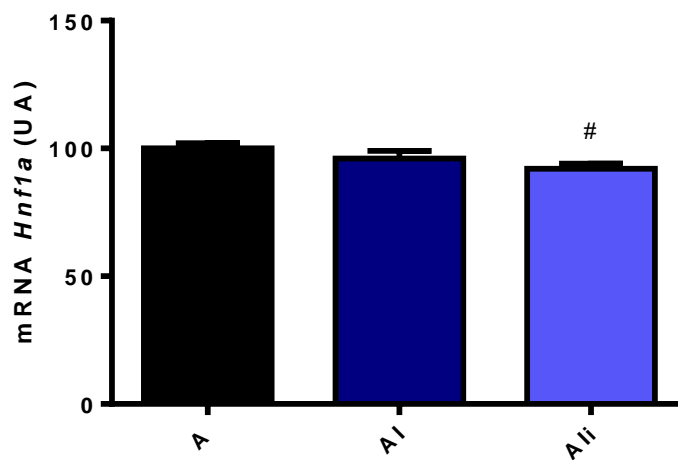
**Figura 21.** Quantificação do mRNA do *S/c5a2* de células IRPTC cultivadas em meio com alta glicose (**A**), alta glicose com insulina (**AI**) e em meio com alta glicose, insulina e inibidor de AKT (**AII**). Os valores de densidade do mRNA foram normalizados considerando-se o grupo **A** como 100. Valores são média  $\pm$  EPM de 5 a 6 placas de cultivo celular.



**Figura 22.** Quantificação da proteína SGLT2 em membrana plasmática de células IRPTC cultivadas em meio com: alta glicose (**A**), alta glicose com insulina (**AI**) e em meio com alta glicose, insulina e inibidor de AKT (**AII**). Os valores de densidade da proteína SGLT2 foram normalizados considerando-se o grupo **A** como 100. Valores são média  $\pm$  EPM de 5 a 6 placas de cultivo celular.

- Avaliação do mRNA do *Hnf1a* e da atividade de ligação das proteínas nucleares ao sítio de ligação do HNF1A na região promotora do gene *Slc2a2*.

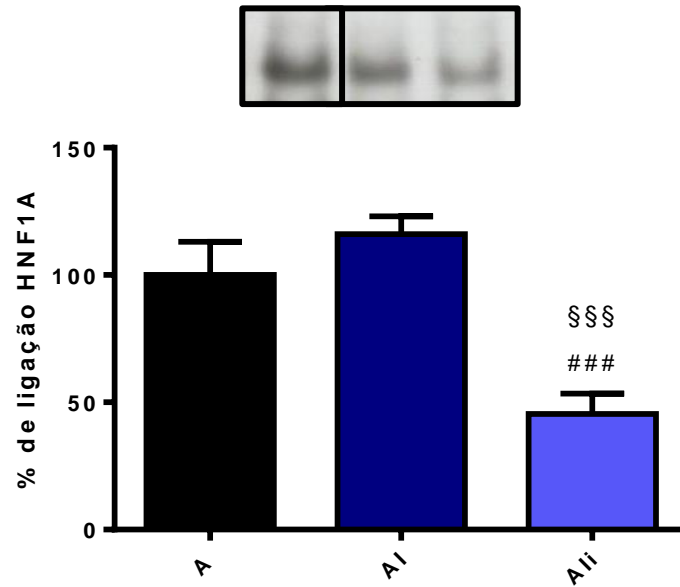
A quantificação do mRNA do *Hnf1a* (**figura 23**) mostrou que houve uma diminuição (pequena mas significativa) no grupo **Ali** em relação ao grupo **A** ( $P < 0,05$ ).



**Figura 23.** Quantificação do mRNA do *Hnf1a* de células IRPTC cultivadas em meio com: alta glicose (**A**), alta glicose com insulina (**AI**) e em meio com alta glicose, insulina e inibidor de AKT (**Ali**). Os valores de densidade do mRNA foram normalizados considerando-se o grupo **A** como 100. Valores são média  $\pm$  EPM de 10 a 11 placas de cultivo celular. ANOVA de uma via, #  $P < 0,05$  vs A.

A quantificação da atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do HNF1A no gene *Slc2a2* está mostrada na **figura 24**. Ocorreu uma diminuição significativa da atividade de ligação nas células **Ali**, quando comparadas com as células dos grupos **A** e **AI** ( $P < 0,001$ ).

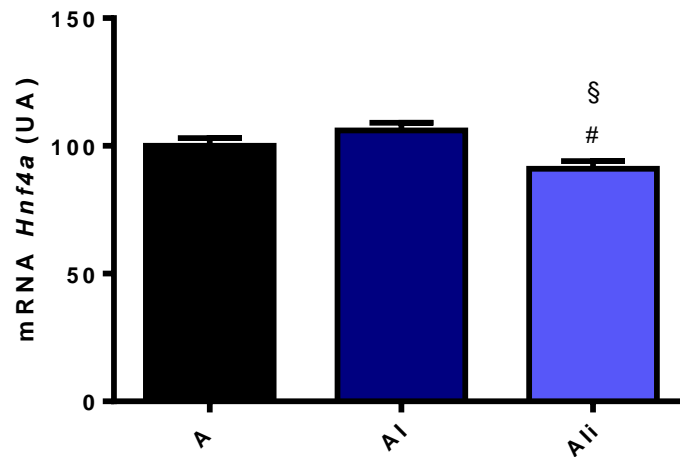




**Figura 24.** Quantificação da atividade de ligação de proteínas nucleares (ao sítio de ligação do HNF1A do promotor do gene *Slc2a2*) em células IRPTC cultivadas em meio com: alta glicose (**A**), alta glicose com insulina (**AI**) e com alta glicose, insulina e inibidor de AKT (**Ali**). Os valores de densidade óptica foram normalizados considerando-se o grupo **A** como 100. No topo, imagem representativa do resultado. No topo, imagem representativa do resultado. Valores são média  $\pm$  EPM de 5 a 10 placas de cultivo celular. ANOVA de uma via, ###  $P < 0,001$  vs A; §§§  $P < 0,001$  vs AI.

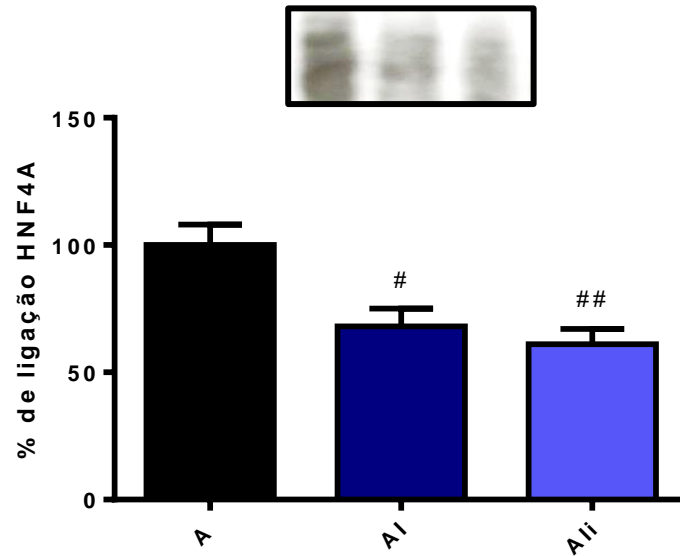
- Avaliação do mRNA *Hnf4a* e da atividade de ligação das proteínas nucleares ao sítio de ligação do fator transcricional HNF4A na região promotora do gene *Slc2a2*.

Na, **figura 25** vimos que o mRNA do *Hnf4a* sofreu uma redução no grupo **Ali** quando comparado aos grupos **A** e **Ai** ( $P < 0,05$ ).



**Figura 25.** Quantificação do mRNA do *Hnf4a* de células IRPTC cultivadas em meio com: alta glicose (**A**), alta glicose com insulina (**AI**) e em meio com alta glicose, insulina e inibidor de AKT (**Ali**). Os valores de densidade do mRNA foram normalizados considerando-se o grupo **A** como 100. Valores são média  $\pm$  EPM de 6 a 9 placas de cultivo celular. ANOVA de uma via, #  $P < 0,05$  vs A; §  $P < 0,05$  vs AI.

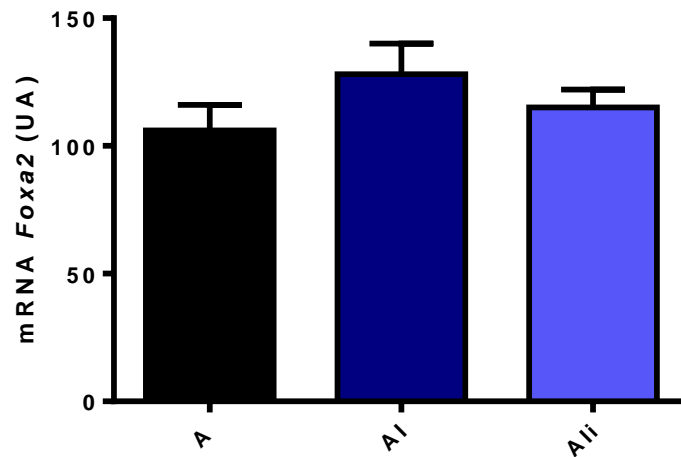
A atividade de ligação das proteínas nucleares no sítio do HNF4A (**figura 26**) foi menor nos grupos **AI** e **Ali** ( $P < 0,05$  e  $P < 0,01$ , respectivamente) quando comparados ao grupo **A**.



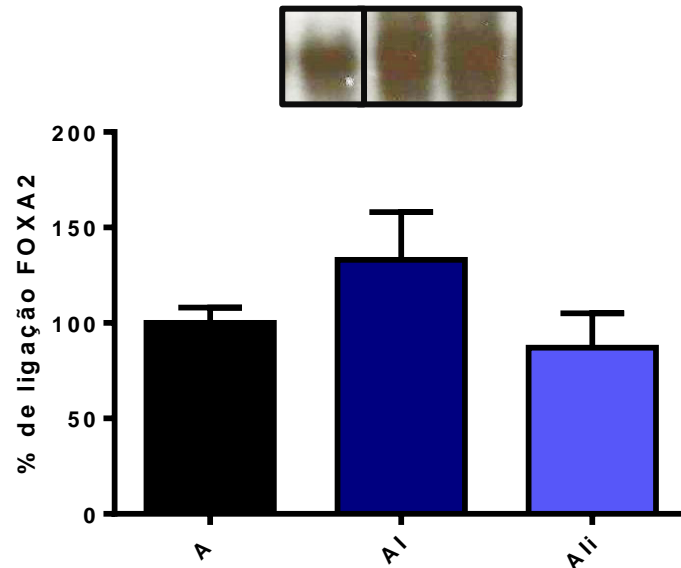
**Figura 26.** Quantificação da atividade de ligação de proteínas nucleares (ao sítio de ligação do HNF4A no promotor do *Slc2a2*) de células IRPTC cultivadas em meio com: alta glicose (**A**), alta glicose com insulina (**AI**) e em meio com alta glicose, insulina e inibidor de AKT (**AII**). Os valores de densidade óptica foram normalizados considerando-se o grupo **A** como 100. No topo, imagem representativa do resultado. Valores são média  $\pm$  EPM de 6 a 9 placas de cultivo celular. ANOVA de uma via, #  $P < 0,05$  e ##  $P < 0,01$  vs A.

- Avaliação do mRNA *Foxa2* e da atividade de ligação das proteínas nucleares ao sítio de ligação do fator transcricional FOXA2 na região promotora do gene *Slc2a2*.

A quantificação do mRNA do *Foxa2* é mostrada na **figura 27**, e da atividade de ligação das proteínas nucleares no sítio do FOXA2 na **figura 28**. Nenhuma alteração significativa foi observada.



**Figura 27.** Quantificação do mRNA do *Foxa2* de células IRPTC cultivadas em meio com: alta glicose (**A**), alta glicose com insulina (**AI**) e em meio com alta glicose, insulina e inibidor de AKT (**AII**). Os valores de densidade do mRNA foram normalizados considerando-se o grupo **A** como 100. Valores são média  $\pm$  EPM de 4 a 6 placas de cultivo celular.



**Figura 28.** Quantificação da atividade de ligação de proteínas nucleares (ao sítio de ligação do FOXA2 no promotor do *Slc2a2*) de células IRPTC cultivadas em meio com: alta glicose (**A**), alta glicose com insulina (**AI**) e em meio com alta glicose, insulina e inibidor de AKT (**AII**). Os valores de densidade óptica foram normalizados considerando-se o grupo **A** como 100. No topo, imagem representativa do resultado. Valores são média  $\pm$  EPM de 5 a 6 placas de cultivo celular.

## 6 DISCUSSÃO

Há anos a regulação dos transportadores de glicose em epitélio renal vem sendo estudada, em especial no diabetes *mellitus* (30,31). Mais recentemente, com o advento dos inibidores de SGLT2 como coadjuvantes na terapia do DM (74), a atenção à regulação dos transportadores no epitélio renal aumentou mais ainda. Adicionalmente, a concepção de que a tubulopatia, com aumento do fluxo transtubular de glicose, tenha importante papel no desenvolvimento da glomerulopatia (75) e também contribuiu para aumentar o interesse sobre a regulação da expressão de *Slc2a2/ GLUT2* e *Slc5a2/ SGLT2* no epitélio renal.

Quinze anos atrás já se sugeria que o aumento da expressão de *Slc5a2/ SGLT2* e *Slc2a2/ GLUT2* em rim de ratos diabéticos estivesse relacionado ao aumento da glicose (31). Estudos subsequentes revelaram que o tratamento de ratos diabéticos com insulina era capaz de reverter o aumento de expressão dos transportadores no túbulo proximal. Com o emprego da florizina, que reduz a glicemia semelhantemente à insulina, nosso grupo confirmou que, in vivo, o controle glicêmico era o principal regulador da expressão de *Slc2a2/ GLUT2* (27) e *Slc5a2/ SGLT2* (47) no DM. Entretanto, ainda não se sabia se realmente esta regulação era uma consequência direta da concentração de glicose na célula epitelial renal.

Também foi descrito que, em túbulo proximal de ratos diabéticos, a introdução do tratamento com insulina induz, per se e de forma transiente (24 horas), um aumento na expressão de *Slc2a2/ GLUT2* (27); o que também nunca foi evidenciado como um efeito direto na célula epitelial.

Assim, o presente estudo foi desenhado para demonstrar efetivamente o efeito da alta concentração de glicose, assim como da insulina nesta condição, sobre a expressão dos transportadores em célula epitelial em cultura. Adicionalmente buscou-se avaliar a participação de possíveis mecanismos transcricionais envolvidos.

Inicialmente, é preciso destacar que nenhuma alteração na expressão de *Slc5a2/ SGLT2* foi observada em quaisquer das condições estudadas, mesmo em reposta à alta concentração de glicose, condição que sabidamente estimula a expressão desse gene in vivo. Esse resultado foi, inicialmente, inesperado, entretanto a literatura é rica em demonstrações de que tanto a cultura primária de

células tubulares, como o desenvolvimento de linhagens imortalizadas, podem induzir modificações fenotípicas importantes, que incluem até bloqueio da expressão de *Slc5a2*/SGLT2 (76). Assim, é plausível imaginar que, ainda que expressando o gene *Slc5a2*, a regulação desse gene em linhagens imortalizadas seja comprometida. Semelhantemente ao observado, em células de túbulo proximal de rim humano já foi descrito que 24 horas de exposição a 22 ou 33 mM de glicose não alterou a expressão de SGLT2. Dessa maneira, parece evidente que as células IRPTC não representam um bom modelo experimental para investigação do gene *Slc5a2*; e, portanto, o presente estudo focou na regulação transcricional do gene *Slc2a2*.

A ativação de AKT (S473), induzida por alta concentração de glicose, já foi demonstrada, em células tubulares de ratos (77) e humanos (78) diabéticos. Semelhantemente, *in vitro*, após alguns dias de cultivo celular, foi mostrado que a alta concentração de glicose ativa a AKT (S473) em células beta (79), monócitos (80), células endoteliais de vasos retinianos (81) e células tubulares (77). Entretanto, também já foi descrito que a alta concentração de glicose reduz a ativação da AKT em cultura de célula muscular lisa de aorta (82), sugerindo que o efeito da alta concentração de glicose pode ser específico para cada tipo celular. No presente estudo, em linhagem IRTPC (célula de túbulo proximal de rato imortalizada), observamos um aumento de cerca de 3 vezes na fosforilação da AKT em resposta a alta concentração de glicose, efeito este completamente abolido pela adição de inibidor de AKT, na última hora do cultivo celular. Além disso, o uso do inibidor reduziu a p-AKT a níveis menores do que os observados na presença de baixa glicose (5 mM), indicando que nessa condição (5 mM) já há uma ativação basal da AKT.

O mRNA do *Slc2a2* aumentou na presença de 25 mM de glicose, efeito este que desapareceu quando foi adicionado o inibidor de AKT. Esse resultado revela a participação da AKT na expressão do gene *Slc2a2*, mas surpreende pela rápida resposta ao inibidor (apenas uma hora). Isto sugere: 1) que a taxa de transcrição seja muito alta, e, portanto, sua inibição repercute rapidamente; 2) que mecanismos pós-transcricionais, como tempo de meia-vida do mRNA também sejam afetados pelo bloqueio da AKT. Nesse sentido, por exemplo, já foi demonstrado *in vivo* e *in vitro* que a ativação da AKT estabiliza inúmeros mRNAs, em especial aqueles que contêm um elemento rico em AU (AU-richelement, ARE) na região 3'UTR (83).

Assim, é plausível propor-se que a inibição da AKT, diminuindo a estabilidade do mRNA do *Slc2a2*, possa reduzir seu conteúdo rapidamente.

A regulação da proteína GLUT2 foi semelhante à do mRNA; porém, em magnitude um pouco menor. Aqui, o efeito redutor da inibição da AKT em 1 hora também precisa levar em consideração a velocidade de degradação da proteína. Além disso, é importante destacar que a proteína foi medida em fração de membrana plasmática, e a inibição da AKT pode ter induzido defeito no tráfego intracelular da proteína GLUT2.

Em relação a potenciais fatores transcrpcionais já indicados, *in vivo*, como reguladores do gene *Slc2a2*, tanto em rim como em fígado (23, 25), o presente estudo revelou que a alta concentração de glicose aumentou a atividade de ligação de proteínas nucleares aos sítios de ligação do HNF4A e do FOXA2, comprovando a participação desses fatores na regulação observada. Este efeito foi completamente bloqueado pelo emprego de inibidor da AKT, o que indica que a ativação desses fatores de transcrição seja mediada pela AKT.

O HNF4A é conhecido como ativado pela proteína cinase A (PKA) (84), entretanto efeito direto da AKT ou via interação com PKA sobre a ativação do HNF4A não estão claramente demonstrados. Por outro lado, a ativação e translocação nuclear do FOXA2 já foram reportados em resposta à fosforilação da AKT (63,64).

Na segunda parte deste estudo, investigamos o efeito da presença de insulina, em altas concentrações de glicose, uma vez que a hiperglicemia é sabidamente condição importante de indução da nefropatia diabética.

É bem conhecido que, em condições fisiológicas, o aumento da concentração de insulina induz a ativação da AKT (85). Por outro lado, em células epiteliais de retina, já foi mostrado que a capacidade da insulina ativar a AKT está comprometida, de maneira independente pela alta concentração de glicose e insulina (85). A capacidade da alta concentração de glicose inibir a ativação da AKT induzida pela insulina foi observado em outros tipos celulares em cultura como fibroblasto (86), células de hepatoma humano hepG2 (87,88) e adipócitos (88). Entretanto, o efeito da glicotoxicidade nestes estudos tem sido descrito como: 1) uma perda (ou uma redução) da capacidade da insulina aumentar a ativação da AKT; e 2) uma resposta reduzida a estímulo agudo com insulina (minutos). No presente estudo, surpreendentemente, o efeito da insulina (em concentração alta de glicose) foi o de

reduzir de maneira significativa (~30%) a p-AKT, de tal forma que a adição do inibidor da AKT não reduziu, adicionalmente, a p-AKT. Entretanto, é fundamental que se destaque, levando em consideração o discutido anteriormente, que essa resposta da insulina corresponde ao efeito de 24 horas de exposição contínua ao hormônio, e não à ativação rápida (minutos) normalmente avaliada.

Adicionalmente, a concentração de insulina utilizada (0,10  $\mu\text{M}$ ) também merece ser considerada. Essa concentração, frequentemente utilizada em cultura, é extremamente elevada, embora ela possa decair um pouco com o passar dos dias de cultura. Recentemente, em cultura de células tronco neurais humanas na presença contínua de altas concentrações de insulina, verificou-se um efeito de redução na p-AKT, o qual é tempo e concentração dependente (89). Este efeito foi classificado como efeito tóxico da insulina, e o resultado de nosso estudo pode representar um efeito semelhante. Ressalte-se que no estudo de Rhee e colaboradores (89), a menor concentração de insulina utilizada foi 0,22  $\mu\text{M}$  (maior que a nossa concentração – 0,10  $\mu\text{M}$ ), e os autores avaliaram até 4,3  $\mu\text{M}$  de insulina. É importante lembrar que a hiperinsulinemia pode ser característica tanto de portadores de resistência insulínica, como de portadores de DM em insulino-terapia.

Assim, em nosso desenho experimental, dois mecanismos indutores da resistência à insulina foram adicionados: a glicotoxicidade e a alta concentração de insulina por longo tempo, o que pode explicar a importante inibição da fosforilação da AKT.

Em relação à expressão do transportador de glicose, observou-se que a insulina induziu pequena, mas significativa, redução no mRNA do *Slc2a2*, o que se exacerbou quando a AKT foi inibida. A atividade de ligação do HNF4A no promotor do *Slc2a2* também diminuiu na presença de insulina, o que pode explicar o efeito observado, o qual deve ser mediado pela AKT. Ainda, observou-se que a adição de inibidor de AKT à insulina induziu uma redução na atividade de ligação do HNF4A, que não foi observado com a insulina isolada, mas que pode explicar a redução adicional na expressão do mRNA do *Slc2a2* observada quando a AKT foi inibida. Estes resultados indicam que, em alta concentração de glicose, a insulina é capaz de reprimir a expressão do mRNA, efeito que envolve redução da atividade do HNF4A mediada por AKT.



Por outro lado, o efeito inibitório da insulina (durante 24 horas) sobre a expressão do mRNA do *Slc2a2* não se acompanhou de alteração na proteína GLUT2, ressaltando o quanto regulações pós-transcricionais podem repercutir de maneira importante na expressão da proteína. Todavia, é possível que cronicamente a regulação da proteína passe a acompanhar a regulação do mRNA.

É interessante comentar que, em rim de ratos diabéticos, a insulinização foi descrita como capaz de induzir um aumento da expressão do *Slc2a2*/GLUT2 em 24 horas, o qual reverte completamente em 48 horas. Nesse estudo, o efeito de aumento de *Slc2a2*/GLUT2 foi particularmente atribuído à insulina, uma vez que essa resposta não foi observada quando a glicemia foi similarmente reduzida por tratamento com florizina (27).

Enfim, os efeitos da insulina sobre a expressão de *Slc2a2*/GLUT2 e da alta concentração de glicose sobre a expressão de *Slc5a2*/SGLT2 aqui descritos, in vitro, na linhagem IRPTC são distintos dos efeitos descritos, in vivo, em córtex de rato diabético, evidenciando a importância de ter-se cautela na análise de resultados obtidos em diferentes condições experimentais.

## 7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos em células IRPTC conclui-se que:

- 1) Alta concentração de glicose induz aumento na expressão do mRNA *Slc2a2* e da proteína GLUT2, efeito este que envolve aumento da atividade de ligação de HNF4A e FOXA2 no promotor do gene *Slc2a2*, por mecanismo mediado pela AKT.
- 2) A insulina na presença de alta concentração de glicose induz redução na expressão do mRNA do *Slc2a2*, efeito este que envolve redução da atividade de ligação do HNF4A no promotor do gene *Slc2a2*, por mecanismo mediado pela AKT.
- 3) O aumento e diminuição da atividade transcricional observados dependem de aumento e diminuição da ativação da AKT, respectivamente.

Em síntese, o presente estudo demonstrou em célula de túbulo proximal renal de rato que a alta concentração de glicose aumenta e a insulina diminui a expressão de *Slc2a2*/GLUT2 por mecanismo mediado pelas vias AKT/HNF4A e AKT/FOXA2.

## REFERÊNCIAS\*

- 1 – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Technical report: Definition and diagnosis of diabetes mellitus and impaired glycaemic regulation**. Genebra, 2006.
- 2 – BRASIL. Ministério da Saúde. **Saúde Brasil 2009: uma análise da situação de saúde e da agenda nacional e internacional de prioridades em saúde**. Brasília/ DF, 2010.
- 3 – LOJUDICE, F. H. et al. Stem cells in the treatment and cure of diabetes mellitus. **Ciência Saúde Coletiva**, v. 13, p. 19-21, 2008.
- 4 – BERNE E LEVY. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
- 5 – AIRES, M de M.; **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- 6 – GANONG, W. F. **Fisiologia Médica**. 22. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006.
- 7 – MUECKLER, M. Facilitative glucose transporters. **Eur. J. Biochem.**, v. 219, p. 713-725, 1994.
- 8 – CARVALHEIRA, J. B. C. et al. Via de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419-423, 2002.
- 9 – HABER, E. P. et al. Secreção da insulina: Efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 45, n. 3, p. 219-226, 2001.
- 10 – DCCT (The Diabetes Control and Complications Trial).; The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. **The New England Journal of Medicine**, p. 977–986, 1993.
- 11 – BONVENTRE, J. V. Can We Target Tubular Damage to Prevent Renal Function Decline in Diabetes? **Seminars Nephrology**, p. 452–462, 2012.
- 12 – LAGRANHA, C. J. et al. Molecular bases of diabetic nephropathy. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 51, p. 901-912, 2007.
- 13 – VIANA, M. R. et al. Cardiovascular and renal complications in diabetes mellitus. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 10, n. 3, p. 290-296, 2011.

\* De acordo com:

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

14 – VALLON, V. et al. Renal function in diabetic disease models: the tubular system in the pathophysiology of the diabetic kidney. **Annual Review of Physiology**, v. 74, p. 351–375, 2012.

15 – WOLF, G. et al. Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. **Kidney International**, v. 56, p. 393–405, 1999.

16 – ZIYADEH, F. N. et al. The renal tubulointerstitium in diabetes mellitus. **Kidney International**, v. 39, p. 464–475, 1991.

17 – GILBERT, R. E. et al. The tubulointerstitium in progressive diabetic kidney disease: more than an aftermath of glomerular injury. **Kidney International**, v. 56, p. 1627–1637, 1999.

18 – DEFRONZO, R. A. et al. The role of the kidneys in glucose homeostasis: a new path towards normalizing glycaemia. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, v. 1, p. 5-14, 2012.

19 – MUECKLER, M. et al. Sequence and structure of a human glucose transporter. **Science**, v. 229, p. 941-945, 1985.

20 – WU, X. et al. GLUT14, a duplicon of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms. **Genomics**, v. 80, p. 553-557, 2002.

21 – SCHEEPERS, A. et al. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. **JPEN Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 28, p. 364-371, 2004.

22 – THORENS, B. Facilitated glucose transporters in epithelial cells. **Annual Review of Physiology**, v. 55, p. 591-608, 1993.

23 – BROWN, G. K. Glucose transporters: structure, function and consequences of deficiency. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 23, p. 237-246, 2000.

24 – WELLS, R. G. et al. The cloning of a human kidney cDNA with similarity to the sodium/glucose cotransporter. **The American Journal of Physiology**, v. 263, p.459-465, 1992.

25 – HEDIGER, M. A. et al. Homology of the human intestinal Na<sup>+</sup>/glucose and E. coli Na<sup>+</sup>/proline cotransporters. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 86, p. 5748-5752, 1989.

26 – FREITAS, H. S. et al. Acute and short-term insulin-induced molecular adaptations of GLUT2 gene expression in the renal cortex of diabetic rats. **Molecular and cellular Endocrinology**, v. 237, p. 49-57, 2005.

- 27 – FREITAS, H. S. et al. Insulin but not phlorizin treatment induces a transient increase in GLUT2 gene expression in the kidney of diabetic rats. **Nephron Physiology**, v. 105, p. 42-51, 2007.
- 28 – THORENS, B.; Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes. **The American Journal of Physiology**, v. 270, p. 541-553, 1996.
- 29 – WRIGHT, E. M.; Renal Na( )-glucose cotransporters. **The American Journal of Physiology**, v. 280, p. 10-18, 2001.
- 30 – DOMINGUEZ, J. H. et al. Molecular adaptations of GLUT1 and GLUT2 in renal proximal tubules of diabetic rats. **The American Journal of Physiology**, v. 266, p. 283-290, 1994.
- 31 – VESTRI, S. et al. Changes in sodium or glucose filtration rate modulate expression of glucose transporters in renal proximal tubular cells of rat. **The Journal of Membrane Biology**, v. 182, p. 105-112, 2001.
- 32 – RAHMOUNE, H. et al. Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes. **Diabetes**, v. 54, p. 3427-3434, 2005.
- 33 – GLEADHILL, A. et al. Use of a three-blood-sample plasma clearance technique to measure GFR in horses. **Veterinary Journal**, v. 158, p. 204-209, 1999.
- 34 – HORITA, S. et al. Insulin resistance, obesity, hypertension, and renal sodium transport. **International Journal of Hypertension**, v. 10, 2011.
- 35 – GESEK, F. A. Insulin increases Na(+)-H<sup>+</sup> exchange activity in proximal tubules from normotensive and hypertensive rats. **The American Journal of Physiology**, v. 260, p. 695-709, 1991.
- 36 – DEFRONZO, R. A. et al. The effect of insulin on renal handling of sodium, potassium, calcium, and phosphate in man. **Journal of Clinical Investigation**, v. 55, p. 845-855, 1975.
- 37 – RUIZ, O. S. et al. Regulation of the renal Na-HCO<sub>3</sub> cotransporter: IX. Modulation by insulin, epidermal growth factor and carbachol. **Regulatory Peptides**, v. 77, p. 155-161, 1998.
- 38 – TALOR, Z. et al. Insulin (INS) stimulates Na-K-ATPase activity of basolateral (BL) renal tubular membranes. **Kidney International**, v. 21, p. 266, 1982.
- 39 – RIVERA, C. et al. Response of dog renal Na-K-ATPase to insulin in vitro. **Renal Physiology**, v. 1, p. 74-83, 1978.

- 40 – FERAILE, E. et al. Insulin enhances sodium sensitivity of Na-K-ATPase in isolated rat proximal convoluted tubule. **The American Journal of Physiology**, v. 267, p. 55-62, 1994.
- 41 – RYFFEL, G. U. Mutations in the human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF)1 and HNF4 families: functional and pathological consequences. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 27, p. 11-29, 2001.
- 42 – DUNCAN, S. A. et al. Murine gastrulation requires HNF-4 regulated gene expression in the visceral endoderm: tetraploid rescue of Hnf-4(-/-) embryos. **Development**, v. 124, n. 2, p. 279-287, 1997.
- 43 – TIAN, J. M. et al. Tissue-specific expression of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 1 may involve hepatocyte nuclear factor 4. **Genes Dev.**, v. 5, p. 2225-2234, 1991.
- 44 – XANTHOPOULOS, K. G. et al. The different tissue transcription patterns of genes for HNF-1, C/EBP, HNF-3, and HNF-4, protein factors that govern liver-specific transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 88, n. 9, p. 3807-3811, 1991.
- 45 – BEN-SHUSHAN, E. et al. A pancreatic beta -cell-specific enhancer in the human PDX-1 gene is regulated by hepatocyte nuclear factor 3beta (HNF-3beta), HNF-1alpha, and SPs transcription factors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 20, p. 17533-17540, 2001.
- 46 – DUNCAN, S. A. et al. Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism. **Science**, v. 281, n. 5377, p. 692-695, 1998.
- 47 – FREITAS, H. S. et al. Na(+)-glucose transporter-2 messenger ribonucleic acid expression in kidney of diabetic rats correlates with glycemic levels: involvement of hepatocyte nuclear factor-1alpha expression and activity. **Endocrinology**, v. 149, n. 2, p. 717-724, 2008.
- 48 – FREITAS, H. S. et al. SLC2A2 gene expression in kidney of diabetic rats is regulated by HNF-1 $\alpha$  and HNF-3 $\beta$ . **Molecular and cellular Endocrinology**, v. 305, p. 63-70, 2009.
- 49 – WANG, H. et al. Dominant-negative suppression of HNF-1alpha function results in defective insulin gene transcription and impaired metabolism-secretion coupling in a pancreatic beta-cell line. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 22, p. 6701-6713, 1998.
- 50 – DAVID-SILVA, A. et al. Hepatocyte nuclear factors 1 $\alpha$ /4 $\alpha$  and forkhead box A2 regulate the solute carrier 2A2 (Slc2a2) gene expression in the liver and kidney of diabetic rats. **Life Sciences**, v. 93, n. 22, p. 805-813, 2013.

- 51 – DEAN, L. et al. **The genetic landscape of diabetes**. 2004.
- 52 – BYRNE, M. M. et al. Altered insulin secretory responses to glucose in diabetic and nondiabetic subjects with mutations in the diabetes susceptibility gene MODY3 on chromosome 12. **Diabetes**, v. 45, n. 11, p. 1503-1510, 1996.
- 53 – LAZZARO, D. et al. LFB1 and LFB3 homeoproteins are sequentially expressed during kidney development. **Development**, v. 114, n. 2, p. 469-479, 1992.
- 54 – VAXILLAIRE, M. et al. A gene for maturity onset diabetes of the young (MODY) maps to chromosome 12q. **Nature Genetics**, v. 4, p. 418-423, 1995.
- 55 – GERICH, J. E. Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications. **Diabetic Medicine**, v. 2, p. 136-142, 2010.
- 56 – ISOMAA, B. et al. Chronic diabetic complications in patients with MODY3 diabetes. **Diabetologia**, v. 4, p. 467-473, 1998.
- 57 – OWEN, K. et al. Maturity-Onset Diabetes of the Young: from Clinical Description to Molecular Genetic Characterization. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 15, n. 3, 2001.
- 58 – PONTOGLIO, M. et al. Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. **Cell**, v. 84, p. 575-585, 1996.
- 59 – NAGAKI, M. et al. Transcription factor HNF and hepatocyte differentiation. **Hepatology Research**, v. 38, p. 961-969, 2008.
- 60 - HATZIS, P. et al. Regulatory mechanisms controlling human hepatocyte nuclear factor 4alpha gene expression. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, p. 7320-7330, 2001.
- 61 – MCPHERSON, C. E. et al. An active tissue-specific enhancer and bound transcription factors existing in a precisely positioned nucleosomal array. **Cell**, v. 2, p. 387-398, 1993.
- 62 – RAUSA, F. M. et al. Elevated levels of hepatocyte nuclear factor 3beta in mouse hepatocytes influence expression of genes involved in bile acid and glucose homeostasis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, p. 8264-8282, 2000.
- 63 – HUGHES, D. E; et al. Elevated hepatocyte levels of the Forkhead box A2 (HNF-3beta) transcription factor cause postnatal steatosis and mitochondrial damage. **Hepatology**, v. 37, n. 6, p. 1414-1424, 2003.
- 64 – WOLFRUM, C. et al. Insulin regulates the activity of forkhead transcription factor Hnf-3beta/Foxa-2 by Akt-mediated phosphorylation and nuclear/cytosolic localization.

**Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 100, n. 20, p. 11624-11629, 2003.

65 – CHA, J. Y. et al. Identification of transacting factors responsible for the tissue-specific expression of human glucose transporter type 2 isoform gene. Cooperative role of hepatocyte nuclear factors 1alpha and 3beta. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 18358-18365, 2000.

66 – STAAL, S. P. Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 74, p. 3065-3067, 1977.

67 – COFFER, P. J. et al. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. **The Biochemical Journal**, v. 335, p. 1-13, 1998.

68 – ORCY, R. B. et al. Signalization of Akt/PKB in the placenta, skeletal muscle and adipose tissue of preeclampsia patients. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 66, p. 231-236, 2008.

69 – BARNETT, S. F. et al. Identification and characterization of pleckstrin-homology-domain-independent and isoenzyme-specific Akt inhibitors. **The Biochemical Journal**, v. 385, p. 399-408, 2005.

70 – FAIVRE, S. et al. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 5, n. 8, p. 671-688, 2006.

71 – ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2010.

72 – TANG, S. S. et al. Temperature-sensitive SV40 immortalized rat proximal tubule cell line has functional renin-angiotensin system. **The American Journal of Physiology**, v. 268, n. 3, p. 435-446, 1995.

73 – TANG, S. S. et al. Immortalized rat proximal tubule cell lines expressing components of the renin-angiotensin system. **Experimental Nephrology**, v. 2, p. 127, 1994.

74 – MACHADO, U. F. et al. Sodium-glucose transporter 2 inhibitors in type 2 diabetes mellitus: navigating between Scylla and Charybdis. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 19, n. 1, p. 5-9, 2014.

75 – NATH, K. A. Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 20, p. 1-17, 1992.

76 – LEE, Y. J. et al. Regulatory mechanisms of Na(+)/glucose cotransporters in renal proximal tubule cells. **Kidney International**, v. 72, p. 27-35, 2007.



- 77 – LIU, W. et al. Phospho-GSK3 $\beta$  is involved in the high-glucose-mediated lipid deposition in renal tubular cells in diabetes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 45, n. 9, p. 2066-2075, 2013.
- 78 – HABIB, S. L. et al. **Hyperactivation** of Akt/mTOR and deficiency in tuberin increased the oxidative DNA damage in kidney cancer patients with diabetes. *Oncotarget*, v. 5, n. 9, p. 2542-2550, 2014.
- 79 – SRINIVASAN, S. et al. Glucose promotes pancreatic islet  $\beta$ -cell survival through a PI 3-kinase/Akt-signaling pathway. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, v. 283, p. 784-793, 2002.
- 80 – NANDY, D. et al. Effect of hyperglycemia on human monocyte activation. ***Journal of Investigative Medicine***, v. 59, n. 4, p. 661-667, 2011.
- 81 – YUAN, L. et al. Upregulation of heparanase in high-glucose-treated endothelial cells promotes endothelial cell migration and proliferation and correlates with Akt and extracellular-signal-regulated kinase phosphorylation. ***Molecular Vision***, v. 18, p. 1684-1695, 2012.
- 82 – POPOV, D. et al. Long term high glucose concentration influences Akt, ERK1/2, and PTP1B protein expression in human aortic smooth muscle cells. ***Biochem. Biophys. Res. Commun.***, v. 388, n. 1, p. 51-55. 2009.
- 83 – SCHMIDLIN, M. et al. The ARE-dependent mRNA-destabilizing activity of BRF1 is regulated by protein kinase B. ***The EMBO Journal***, v. 23, n. 24, p. 4760-4769, 2004.
- 84 – OXOMBRE, B. et al. The G115S mutation associated with maturity-onset diabetes of the young impairs hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  activities and introduces a PKA phosphorylation site in its DNA-binding domain. ***The Biochemical Journal***, v. 383, p. 573-580, 2004.
- 85 – LEONTIEVA, O. V. et al. Rapamycin reverses insulin resistance (IR) in high-glucose medium without causing IR in normoglycemic medium. *Cell Death & Disease*, v. 5, 2014.
- 86 – SINGH, L. P. et al. Glucose-induced insulin resistance of phosphatidylinositol 3'-OH kinase and AKT/PKB is mediated by the hexosamine biosynthesis pathway. ***Journal of Diabetes and its Complications***, v. 15, n. 2, p. 88-96, 2001.
- 87 – LIN, C. L. et al. Epigallocatechin gallate (EGCG) attenuates high glucose induced insulin signaling blockade in human hepG2 hepatoma cells. ***Molecular Nutrition & Food Research***, v. 52, p. 930-939, 2008.

88 – ZHANG, W. Y. et al. 7-O-methylaromadendrin stimulates glucose uptake and improves insulin resistance in vitro. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 9, p. 1494-1499, 2010.

89 – RHEE, Y. H. et al. Insulin concentration is critical in culturing human neural stem cells and neurons. **Cell Death & Disease**, v. 4, p. 766, 2013.