

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

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⁺-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.

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 β 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 β , 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 β , 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 β 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 NH₂ (amina) e COOH (carboxila) terminais encontram-se no intracelular.

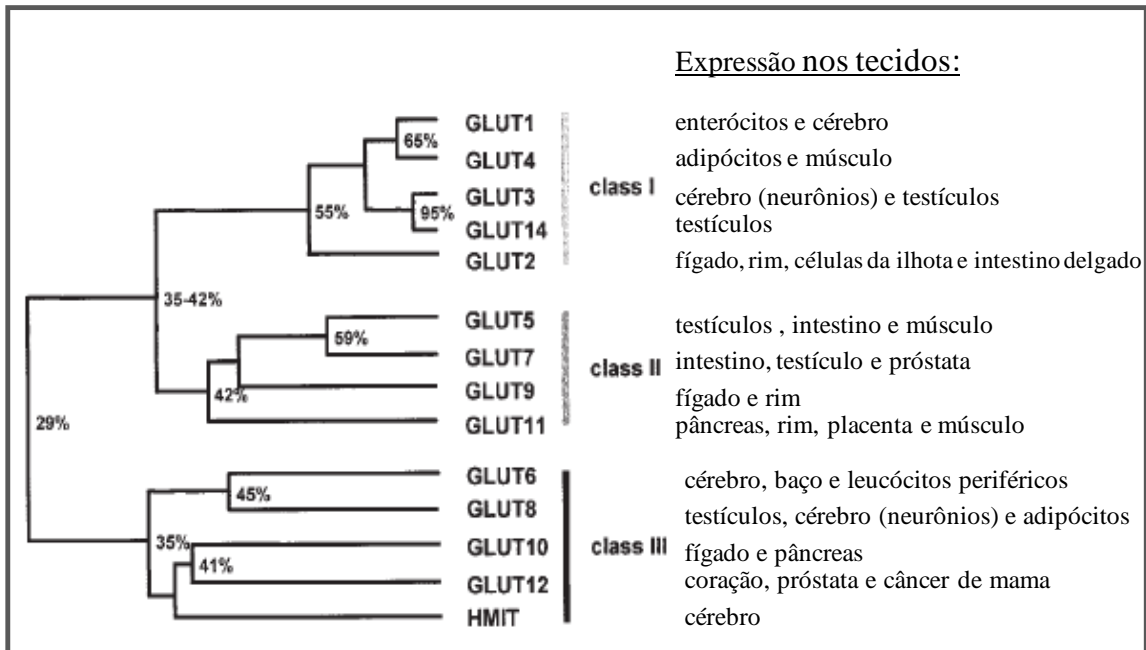


Figura 1: Dendrograma da família de transportadores de glicose em humanos (GLUTs). As porcentagens nos galhos da árvore indicam o grau de identidade entre as isoformas. Fonte: Adaptado de Andrea Scheepers (2004).

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 Na^+ -glicose, nos quais o sódio (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⁺, com alta capacidade de transporte e baixa afinidade. Transporta um íon Na⁺ 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⁺ 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.

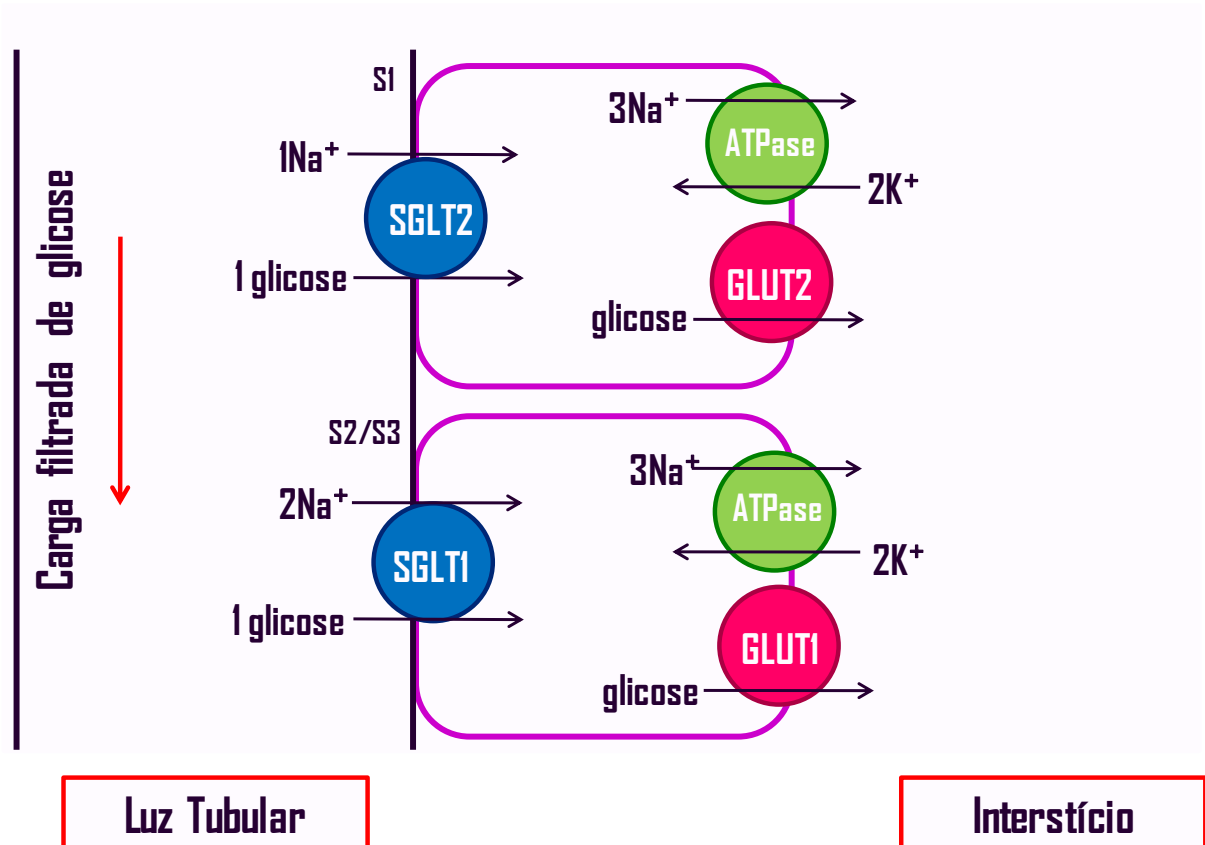


Figura 2. Reabsorção de glicose no túbulo proximal. A figura representa duas células do túbulo proximal, a primeira do segmento S1 e a segunda do segmento S2/S3. Nelas são demonstrados os transportadores de glicose: SGLT1 e SGLT2 na membrana apical e GLUT1 e GLUT2 na membrana basolateral.

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 Na^+ . No túbulo proximal, a reabsorção de 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 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 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 Na^+ é derivada da Na^+/K^+ ATPase, também conhecida como bomba Na^+/K^+ , localizada na membrana basolateral das células epiteliais. A Na^+/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 Na^+/K^+ ATPase é a responsável pela extrusão de Na^+ em todos os segmentos do néfron que o absorvem, apesar de terem diferentes níveis de atividade.

O transporte de 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 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 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 Na^+/K^+ ATPase é também um alvo da insulina, contribuindo para o aumento da reabsorção de Na^+ (38,39), a qual estimula a atividade desta bomba (40).

Portanto, a insulina parece estimular todos os transportadores envolvidos na reabsorção de 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 α), 2) forkhead box A2 – FOXA2 (antigamente conhecido como HNF-3 β), e 3) hepatocyte nuclear fator 4A – HNF4A (antigamente conhecido como HNF-4 α). 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 β 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 α , 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 α), FOXA2 (HNF-3 β) e FOXA3 (HNF-3 γ) 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 α : 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 β : é encontrada, predominantemente, em células adiposas e musculares e é importante para via de sinalização da insulina e transporte de glicose.
- AKT3/PKB γ : 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 β 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.

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⁺/glucose and E. coli Na⁺/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⁺ 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-HCO₃ 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 α and HNF-3 β . **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 α /4 α 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 β 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 β -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 α 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.