ALINE DAVID SILVA

O diabetes altera a expressão do RNAm do GLUT2 em fígado e rim: participação dos fatores transcricionais Hepatic Nuclear Factor- (HNF-) 1α, 3β e 4α.

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 Original

São Paulo
2011

RESUMO

David-Silva A. Regulação transcricional do GLUT2 em fígado e rim de animais diabéticos. [Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

A homeostasia glicêmica requer uma estreita regulação quantitativa e temporal do fluxo de glicose em diferentes órgãos. A glicose sanguínea é provida tanto pela absorção de glicose da dieta, como pela produção hepática e renal de glicose. A participação do fígado envolve o movimento da glicose para dentro (influxo, pós-prandial) ou para fora (efluxo, pós-absortivo) do hepatócito. A contínua reabsorção de glicose no túbulo proximal renal, e a gliconeogênese na célula tubular durante o jejum, também participam da manutenção da homeostase glicêmica. Todos esses fluxos de glicose dependem de transportador específico, que nestes territórios é a proteína GLUT2 (Glucose transporter 2), codificada pelo gene SLC2A2 (Solute Carrier 2A2). No rim já foi demonstrado que o diabetes aumenta o efluxo epitelial de glicose, o que envolve aumento na quantidade de RNAm e proteína GLUT2, participando da etiopatogenia da nefropatia diabética. No fígado, em quadros de esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), já foi descrito um aumento na expressão do GLUT2 hepático. Ainda, mutações no gene SLC2A2, que diminuem sua capacidade de transporte, são responsáveis pela síndrome de Fanconi-Bickel, uma rara condição caracterizada por hipertrofia hepática e renal causadas por acúmulo de glicogênio. Ainda, mutações gênicas em fatores transcricionais da família dos HNFs (Hepatocyte Nuclear Factors) já foram relacionadas com alterações de expressão do SLC2A2, destacando-os como reguladores deste gene. No presente estudo demonstramos que, em rim, o GLUT2 está aumentado no diabetes e que os fatores transcricionais HNF-1α, HNF-3β e HNF-4α são importantes reguladores do GLUT2, uma vez que apresentaram aumento de expressão e da atividade de ligação na região promotora do SLC2A2. Todos esses efeitos foram revertidos pelo tratamento com insulina durante 6 dias. No fígado, o diabetes mellitus também induziu aumento da expressão do GLUT2, HNF-1α, HNF-3β e HNF-4α, assim como aumento na atividade de ligação destes fatores transcricionais no promotor do SLC2A2. Estes resultados evidenciam os HNF- 1α, 3β e 4α como reguladores da expressão do GLUT2 também em fígado de animais diabéticos. Semelhantemente ao observado no rim, a insulina reverteu estas alterações aos 4 e 6 dias de tratamento.

Adicionalmente, os fatores transcricionais SREBP-1c (Sterol Regulatory Element-Binding Proteins) e C/EBP-â (CCAAT-enhancer-binding proteins**)**, também já relacionados ao controle transcricional do gene SLC2A2, não se mostraram alterados em fígado e rim de ratos diabéticos, tratados ou não com insulina. Tampouco alterou-se a ligação de proteínas nucleares aos domínios de ligação destes fatores na região promotora do SLC2A2, nas condições estudadas. Em resumo, os resultados indicam que em rim e fígado, o diabetes mellitus induz aumento na expressão gênica do GLUT2, o que envolve aumento da atividade transcricional dos HNF-1α, HNF-3β e HNF-4α. O tratamento com insulina reduz a atividade destes fatores transcricionais, tanto em fígado como em rim, fazendo com que a expressão do GLUT2 retorne a níveis de animais não diabéticos.

Palavras-chave: Diabetes mellitus. GLUT2. Rim. Fígado.

ABSTRACT

David-Silva A. Transcriptional regulation of GLUT2 in liver and kidney of diabetic animals. [Masters thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

The glucose homeostasis requires a close temporal and quantitative regulation of the flow of glucose into various organs. Blood glucose is provided both by the absorption of glucose from the diet, such as liver and kidney for the production of glucose. The involvement of the liver involves the movement of glucose into (influx, postprandial) or out (efflux, postabsorptive) hepatocyte. The continuous glucose reabsorption in the proximal renal tubule, and gluconeogenesis in tubular cell during fasting, also participate in the maintenance of glucose homeostasis. All these flows depend on glucose transporter specific to these territories is the protein GLUT2 (glucose transporter 2), encoded by the gene SLC2A2 (Solute carrier 2A2). In the kidney has been shown that diabetes increases the efflux of epithelial glucose, which involves increasing the amount of GLUT2 mRNA and protein, participating in the pathogenesis of diabetic nephropathy. In the liver, in frames of nonalcoholic steatohepatitis (NASH), has been described an increased expression of hepatic GLUT2. Still, mutations in the gene SLC2A2, which reduce its carrying capacity, are responsible for Fanconi-Bickel syndrome, a rare condition characterized by hepatic and renal hypertrophy caused by glycogen accumulation. Still, genetic mutations in transcription factors of family HNFs (Hepatocyte Nuclear Factors) have been linked with changes in expression of SLC2A2, highlighting them as regulators of this gene. In the present study demonstrated that in kidney, GLUT2 is increased in diabetes and that the transcriptional factors HNF-1α, HNF-3β and HNF-4α are important regulators of GLUT2, as exhibited increased expression and activity of link in the promoter region of SLC2A2. All these effects were reversed by insulin treatment for 6 days. In the liver, diabetes mellitus also induced an increased expression of GLUT2, HNF-1α, HNF-3β and HNF-4α as well as increased binding activity of these transcription factors in the promoter of SLC2A2. These results demonstrate the HNF-1α, 3β, and 4α as regulators of the expression of GLUT2 also in liver of diabetic animals. Similar to those observed in the kidney, insulin reversed these changes at 4 and 6 days of treatment. Additionally, the transcription factors SREBP-1c (Sterol Regulatory Element-Binding Proteins) and C / EBP-β (CCAAT-enhancer-binding

proteins), have also related to transcriptional control of gene SLC2A2, were not altered in liver and kidney diabetic rats, treated or not with insulin. Neither changed the binding of nuclear proteins to the binding domains of these factors in the promoter region of SLC2A2, the conditions studied. In summary, the results indicate that in kidney and liver, diabetes mellitus leads to increased gene expression of GLUT2, which involves increasing the transcriptional activity of HNF-1 α, HNF-3-β and HNF-4α. Insulin treatment reduces the activity of these transcription factors, both in liver as in kidney, causing the expression of GLUT2 levels return to non-diabetic animals.

Keywords: Diabetes mellitus. GLUT2. Kidney. Liver

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) consiste em um distúrbio metabólico decorrente da falta de insulina e/ou incapacidade desta de agir adequadamente, levando a uma hiperglicemia (1-2). O DM pode ser dividido em dois principais tipos: o tipo 1 (DM1) que decorre da destruição das células β pancreáticas produtoras de insulina e o tipo 2 (DM2) que decorre de uma resistência dos tecidos à insulina, podendo também estar associado à uma diminuição na produção de insulina (1, 3). Ambos os tipos podem resultar em complicações tardias como, nefropatia, retinopatia, neuropatia, entre outros (1).

A homeostasia glicêmica requer uma estreita regulação quantitativa e temporal do fluxo de glicose por diferentes órgãos. A glicose sanguínea é provida pela absorção da glicose da dieta e pela produção endógena do substrato por fígado e rim. No fígado, a glicose pode ser estocada como glicogênio ou produzida pela degradação do glicogênio (glicogenólise) ou pela síntetize via gliconeogênica. Assim, a participação do fígado no controle da glicemia envolve o fluxo da glicose para dentro (pós-prandial) ou para fora (pós-absortivo) do hepatócito. No rim, a glicose filtrada é continuamente reabsorvida no túbulo proximal, e ainda, no jejum, a célula tubular proximal realiza gliconeogênese liberando glicose; ambos mecanismos também participam da manutenção da homeostase glicêmica.

A homeostase glicêmica está diretamente relacionada ao balanço controlado do fluxo de glicose nos diferentes territórios do organismo, que envolvem além dos comentados acima, uma contínua captação de glicose por basicamente todos os tipos celulares. Os fluxos territoriais de glicose dependem da expressão de genes da super-família SLC (solute carrier) que codificam as diferentes isoformas de proteínas transportadoras de glicose, as quais se expressam de maneira tecido-específica, de acordo com o padrão de ativação de fatores transcricionais que regulam esses genes em cada tipo celular (4).

A membrana plasmática é impermeável à glicose e, há décadas, estudos de transporte indicavam que a glicose penetra na maioria das células por difusão facilitada, o que implica na existência de uma proteína transportadora com determinada afinidade pelo substrato, cujo transporte é saturável. Desde a

caracterização molecular do primeiro transportador de glicose em humanos, denominado GLUT1 (1), vários outras isoformas de transportadores de hexoses por difusão facilitada foram identificadas e caracterizadas no começo dos anos 90. Essas proteínas foram designadas como GLUT e numeradas de acordo com a ordem cronológica de clonagem (2-3). Mais recentemente, o comitê organizador da nômina genômica (*Human Genome Organization Gene Nomenclature Committee*) rearranjou os genes que codificam os transportadores de glicose e polióis por difusão facilitada, designando-os como pertencentes à família SLC2A (Solute Carrier 2A), e determinando que o símbolo do gene é SLC2A e o símbolo da proteína é GLUT, ambos seguidos do número que define a isoforma (5). Estes transportadores diferem em suas propriedades cinéticas, afinidade pelos diferentes açúcares, localização tecidual e celular, entre outros fatores.

1.1 SLC2A2/GLUT2 e fígado

O SLC2A2, identificado e clonado por rastreamento de biblioteca de cDNA (DNA complementar) de fígado de rato (6), é expresso em tecidos com alto fluxo de glicose, como intestino, fígado e túbulo proximal do néfron. É também expresso nas células β pancreáticas, onde permite a rápida entrada da glicose dentro das células, um pré-requisito para que a elevação da concentração extracelular de glicose induza imediata secreção de insulina. O GLUT2 é um transportador de alta capacidade e baixa afinidade, sendo o membro da família de GLUTs que apresenta o maior K_m para a glicose (~40 mmol/L).

Para manter normal o nível de glicose circulante, o fígado realiza tanto influxo como efluxo de glicose através do GLUT2. Quando o nível de glicose sanguínea/extracelular tende a se elevar, como no período pós-prandial, a produção hepática de glicose reduz, e a síntese de glicogênio aumenta em resposta à insulina, gerando gradiente de concentração a favor do influxo de glicose (7). No período pós-absortivo/jejum, a glicose plasmática/extracelular tende a baixar, e o hepatócito passa a produzir glicose (glicogenólise e gliconeogênese), gerando gradiente de concentração a favor do efluxo de glicose. Assim, o transportador de glicose GLUT2 exerce fundamental papel, permitindo o influxo da glicose no período pós-prandial e o efluxo deste substrato no período pós-absortivo e no jejum (8).

Estudos com ratos sugerem que a expressão do GLUT2 no fígado é aumentada em resposta à hiperglicemia (9-10), e diminuída pela hiperinsulinemia (9). Já foi relatado em ratos Wistar com diabetes aumento do RNAm (RNA mensageiro) do GLUT2 hepático, e esta alteração é restaurada pela correção da glicemia por florizina (11), vanádio (12) ou insulina (13). Outros estudos realizados em fígado de ratos, mostraram que a proteína e o RNAm do GLUT2 aumentaram 1,6 e 2 vezes, respectivamente, após 3 semanas de diabetes (14-15), e o tratamento com insulina por 5 dias restaurou os conteúdos de proteína e RNAm a níveis de animais não diabéticos (14).

Na maioria das pessoas com intolerância a glicose ou diabetes tipo 2, há uma série de fatores de risco que comumente aparecem juntos, formando o que é conhecido como Síndrome Metabólica (SM) (16), e que inclui a EHNA (esteato-hepatite não-alcoólica). A SM tem sido proposta como um predisponente da EHNA (16-17), especialmente quando a resistência insulínica estiver presente (17). A DHGNA (Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica) inclui um espectro maior de patologias hepáticas que envolvem desde uma simples esteatose até a cirrose e o carcinoma hepatocelular (18-19).

Aproximadamente 20 a 75% dos pacientes com EHNA apresentam diabetes mellitus tipo 2, hiperglicemia e intolerância a glicose, sendo que este quadro tem sido associado com obesidade, diabetes mellitus tipo 2 e intolerância a glicose (14). Na EHNA, espera-se que ocorra um aumento na expressão do GLUT2 hepático, conforme já foi demonstrado em células humanas HepG2 com acúmulo de triglicerídeos após cultura em alta concentração de ácido oléico (20).

Adicionalmente, mutações no gene SLC2A2, comprometendo sua capacidade de transporte, são responsáveis pela síndrome de Fanconi-Bickel, uma rara condição autossômica recessiva que determina hipertrofia hepática e renal associada a acúmulo de glicogênio. O paciente apresenta glicosúria, acidose renal, hiperfosfatúria, raquitismo, hiperglicemia pós-prandial e hipoglicemia de jejum. A hiperglicemia pós-prandial decorre da diminuição da captação de glicose pelo fígado e a hipoglicemia de jejum pode ser explicada pelo deficiente efluxo de glicose tanto do hepatócito como da célula tubular renal, resultando em aumento intracelular de glicose, que inibe a degradação do glicogênio e favorece o seu acúmulo (21).

Já observamos em ratos diabéticos que o controle glicêmico, estabelecido pelo tratamento crônico com insulina ou florizina, diminui a expressão do GLUT2 de

fígado [dados do projeto de iniciação científica, ainda não publicados], fazendo com que retorne ao padrão de rato não diabético. Assim, considerando que o GLUT2 direta ou indiretamente relaciona-se com alterações hepáticas vinculadas a flutuações inapropriadas da concentração de glicose, consideramos extremamente importante investigar os mecanismos envolvidos nesta regulação. No presente estudo investigou-se a expressão do SLC2A2/GLUT2 no fígado de ratos diabéticos, focalizando em sua regulação transcricional.

1.2 SLC2A2/GLUT2 e rim

No rim, a maior parte da carga filtrada de glicose é rapidamente reabsorvida na porção inicial do túbulo proximal - segmento S1 (aproximadamente 90%). Na célula epitelial do segmento S1, dois tipos de transportadores são co-expressos: SGLT2 (cotransportador sódio/glicose), na membrana apical; e GLUT2, na membrana basolateral. Entretanto, já foi relatada a presença do GLUT2 também na membrana apical das células tubulares, em rim de ratos diabéticos (14).

No diabetes, a hiperglicemia resulta em aumento da carga filtrada de glicose que induz uma resposta adaptativa, na qual ocorre aumento da reabsorção de glicose tentando evitar a perda deste importante substrato energético (16, 22-23). Esse aumento de reabsorção de glicose envolve aumento no fluxo trans-epitelial de glicose, determinando concentração intersticial de glicose muito elevada, o que participa da etiopatogenia da nefropatia diabética. A produção aumentada de proteínas MEC (matriz extracelular) por células mesangiais peri-glomerulares é um mecanismo chave na gênese da glomérulo-esclerose que caracteriza a nefropatia diabética (24). Já foi demonstrado que o aumento da concentração intracelular de glicose nas células mesangiais atua como sinalizador para elevar a produção de proteínas MEC (25), mecanismo que decorre do aumento da concentração extracelular do substrato, como acontece no diabetes mellitus (26). Além disso, o estado diabético induz importante aumento na gliconeogênese renal (27), devido à ineficiente inibição dessa via pela insulina (seja por falta do hormônio, seja por resistência), o que implica em adicional efluxo de glicose da célula tubular.

Para garantir o elevado efluxo epitelial de glicose é fundamental que ocorra aumento na expressão do transportador GLUT2. De fato, está bem evidente que no

diabetes ocorre aumento na quantidade do RNAm e da proteína GLUT2 (22-23, 28-29). Nosso grupo já demonstrou aumento no conteúdo da proteína e RNAm do GLUT2 em córtex renal após 10 e 20 dias da indução do diabetes por aloxana. O tratamento com insulina por 6 dias reduziu o conteúdo de RNAm e proteína GLUT2 para níveis de animais não diabéticos (22). Outros estudos confirmaram o aumento de proteína e RNAm do GLUT2 em túbulo proximal renal de ratos diabéticos (23, 28). O efeito restaurador da insulina sobre a expressão do GLUT2 também foi observado em tratamento com florizina (30), indicando que o fator regulador é a queda da glicemia e não a elevação da insulinemia. Entretanto, os mecanismos transcricionais envolvidos nesta modulação ainda não foram devidamente investigados.

1.3 Fatores transcricionais e o gene SLC2A2

Na célula β pancreática e no fígado já foi visto que a regulação transcricional do SLC2A2 requer fatores específicos, como os HNFs (Hepatocyte Nuclear Factors). HNF-1α e HNF-1β, membros da subfamília HNF-1(31), têm um papel chave na expressão de muitos genes específicos do fígado durante a diferenciação e o desenvolvimento (32).

O HNF1-α foi inicialmente conhecido como um regulador transcricional específico do fígado (motivo de seu nome), mas depois foi encontrado em outros tecidos como rim, intestino e pâncreas (31). O HNF-1α pode se homodimerizar ou formar heterodímero com o HNF-1β (33-34), e há evidências de que o HNF-1 seja regulado por PKA (Proteína quinase A) (35).

O HNF-1α é necessário para a expressão do GLUT2 e de outros genes no fígado como os da albumina, da α1-antitripsina e do fibrinogênio (36-38). Mais recentemente, mutações heterozigóticas no gene codificador do HNF-1α foram identificadas como a causa mais comum do diabetes mellitus monogênico chamado MODY 3 (Maturity-onset Diabetes Mellitus of the Young Type 3) (39-41). Os pacientes afetados têm comprometimento da secreção de insulina estimulada por glicose, que se torna aparente antes dos 25 anos de idade (40-41). Isto evidencia a participação do HNF-1α na homeostase glicêmica, e reforça a importância do HNF-1α na secreção de insulina, processo diretamente relacionado ao GLUT2 (27, 40).

Ainda, os pacientes com MODY3 apresentam deficiência na reabsorção renal de glicose devido redução na expressão do GLUT2 e SGLT2 causada por deficiência de HNF1-α (42). Defeitos renais e nefropatia diabética ocorrem em pacientes com MODY 3 devido complicações microvasculares no rim que leva a progressiva microalbuminúria e falha renal estritamente relacionada com pobre controle glicêmico (42). Camundongos com deficiência de HNF1-α mostram drástica redução na reabsorção proximal da glicose filtrada, assim como fosfato e aminoácidos são abundantemente perdidos na urina (43), indicando a importância do HNF-1α não apenas para a reabsorção de glicose. Assim, podemos observar a participação do HNF-1α na homeostase glicêmica, envolvendo a regulação da expressão do GLUT2, destacando que já foi mostrada a interação direta deste fator transcricional na região promotora do SLC2A2 (44).

HNF-3α, HNF-3β e HNF-3γ são codificados respectivamente pelos genes Foxa (Forkhead box A) 1, 2 e 3, (45-46), e se ligam como monômeros na mesma sequência de DNA, mas com afinidade diferente (47-48). Já foi evidenciado que o HNF-3β ativa a transcrição do gene do SLC2A2 em fígado de ratos (44), e o local de ligação do HNF-3β no promotor do SLC2A2 já foi demonstrado (48-49). A super-expressão do gene do GLUT2 que ocorre no diabetes parece ser regulada pelo HNF-3β (50), que segundo Wolfrum et al. (2004), é inibido por insulina através da via de sinalização PI3K-Akt; o HNF-3β uma vez fosforilado pela Akt, permanece inativado no citoplasma de hepatócitos (51).

O fator transcricional HNF-4α, juntamente com o HNF-4β e HNF-4γ, são membros da superfamília do receptor de hormônio esteróide (52). Este fator transcricional se liga ao DNA como homodímero e está localizado em fígado, intestino, rim e ilhota pancreática (52-53). Em cultura primária de hepatócitos, a ativação da AMPK (Proteína quinase ativada por AMP) causa uma drástica redução da fosforilação da proteína HNF-4α, diminuindo a transcrição de genes alvos do HNF-4α, como o SLC2A2 (54).

Segundo Stoffel (1997), o HNF-4α é essencial para a regulação do GLUT2 em fígado, e estudo com células pancreáticas INS-1 revelou que a ausência de HNF-4α afeta a expressão do gene do GLUT2 também em célula beta (55). O HNF-4α é conhecido por ser um receptor órfão, mas apresenta papel importante na regulação

de vários genes no fígado, e mutação no gene do HNF-4α causa o diabetes monogênico MODY 1 (56-58).

Por outro lado, existe a possibilidade de que a insulina esteja regulando a expressão do gene do GLUT2, ativando fatores transcricionais a partir da sua cascata de sinalização intracelular. De fato, a Akt ativa o SREBP, e o acúmulo de Akt em hepatócitos isolados é suficiente para causar aumento do RNAm de SREBP-1c (59), fator já caracterizado como estimulador da transcrição do gene SLC2A2. Três isoformas de SREBP foram identificadas e caracterizadas; SREBP-1a, - 1c e SREBP-2 (59). O SREBP-1c se liga ao DNA como um homodímero, induz acúmulo de lipídios em rim de rato diabético (60-61), e está associado com deposição de matriz extracelular, proteinuria e glomeruloesclerose no diabetes (61-62).

Já foi demonstrado que a glicose induz a expressão do SREBP-1c e GLUT2 em hepatócitos, e que a expressão do gene do GLUT2 é reduzida pela indução da transcrição adenoviral de SREBP-1c DN em camundongos (forma dominante negativa do SREBP-1c), reforçando a idéia de que o gene SLC2A2 possa ser regulado por este fator transcricional (29). De fato, já foi descrito um elemento responsivo ao SREBP-1c (SER) no promotor do SLC2A2 (29).

Na família C/EBP (CCAAT-enhancer-binding proteins), os subtipos C/EBPα, C/EBPβ e C/EBPδ formam homo ou heterodímeros para se ligarem ao DNA (63), e a expressão do C/EBPβ é estimulada por PKA (64-65) e PKC (Proteína quinase C) (65). Camundongo *knockout* para C/EBPβ apresenta redução na deposição de gordura corporal, falha na expressão da PEPCK (Fosfoenolpiruvato carboxiquinase), e consequentemente na gliconeogênese durante o jejum, resultando em hipoglicemia (66-68). Também já foi mostrado que camundongo *knockout* para C/EBPβ morre de profunda hipoglicemia, e é incapaz de induzir a transcrição inicial do gene da PEPCK no fígado logo após o nascimento (69). Em célula β pancreática (HIT-T15 e INS-1), alta concentração de glicose aumenta a expressão do C/EBPβ (70), e em diabetes induzido por estreptozotocina o C/EBPβ aumenta três vezes em fígado (71). Finalmente, estudo realizado em hepatócitos mostrou que a super-expressão de C/EBPα e C/EBPβ aumenta a sua ligação ao promotor do SLC2A2, aumentando a expressão do GLUT2 (72).

Em conjunto, os fatores transcricionais HNF-1α, HNF-3β, HNF-4α, SREBP-1c e C/EBPβ são expressos em fígado e rim, onde regulam, entre outros genes importantes para o metabolismo da glicose, o gene que codifica o transportador de

glicose GLUT2. Esta proteína é fundamental para influxo/efluxo de glicose no hepatócio, assim como para o efluxo de glicose na célula epitelial do túbulo proximal renal. No diabetes, seja pela falta de insulina seja pela resistência ao hormônio, a produção de glicose nestes tecidos torna-se aumentada, o que contribuiu para a hiperglicemia. Neste processo, conhecido aumento de proteína GLUT2 parece ser fundamental para garantir o efluxo da glicose, reduzindo o acúmulo intracelular na forma de glicogênio. Entretanto, pouco se conhece sobre o papel desses fatores transcricionais na regulação da expressão do gene SLC2A2 em fígado e rim de diabéticos.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos em fígado e rim de ratos podemos concluir que:

- O diabetes mellitus induz aumento na expressão dos RNAms do GLUT2, HNF-1α, HNF-3β e HNF-4α; e aumento na atividade de ligação do HNF-1α, HNF-3β e HNF-4α ao promotor do SLC2A2, o que coloca esses fatores transcricionais como reguladores da expressão do GLUT2 no estado diabético.

- O tratamento com insulina reprime a expressão do SLC2A2, o que se acompanha de paralela regulação na expressão e atividade de ligação dos fatores HNF-1á, HNF-3â e HNF-4á, reforçando o papel desses fatores transcricionais na expressão do GLUT2.

- Os fatores transcricionais SREBP-1c e C/EBPβ não se alteram no diabetes, tratado ou não com insulina, e, portanto, não devem participar da regulação do SLC2A2 nestas condições.

Em resumo, os resultados indicam que em rim e fígado o diabetes mellitus induz aumento na expressão gênica do SLC2A2 pelo aumento da expressão e da atividade dos fatores transcricionais HNF-1, HNF-3β e HNF-4α. O tratamento com insulina é capaz de reverter esses efeitos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, et al. Sequence and structure of a human glucose transporter. Science. 1985 Sep 6;229(4717):941-5.

2. Wu X, Freeze HH. GLUT14, a duplicon of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms. Genomics. 2002 Dec;80(6):553-7.

3. Scheepers A, Joost HG, Schurmann A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2004 Sep-Oct;28(5):364-71.

4. Thorens B, Mueckler M. Glucose transporters in the 21st Century. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009 Feb;298(2):E141-5.

5. Joost HG, Bell GI, Best JD, Birnbaum MJ, Charron MJ, Chen YT, et al. Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2002 Apr;282(4):E974-6.

6. Thorens B, Sarkar HK, Kaback HR, Lodish HF. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. Cell. 1988 Oct 21;55(2):281-90.

7. Sher T, Yi HF, McBride OW, Gonzalez FJ. cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. Biochemistry. 1993 Jun 1;32(21):5598-604.

8. Guillemain G, Loizeau M, Pincon-Raymond M, Girard J, Leturque A. The large intracytoplasmic loop of the glucose transporter GLUT2 is involved in glucose signaling in hepatic cells. J Cell Sci. 2000 Mar;113 (Pt 5):841-7.

9. Postic C, Burcelin R, Rencurel F, Pegorier JP, Loizeau M, Girard J, et al. Evidence for a transient inhibitory effect of insulin on GLUT2 expression in the liver: studies in vivo and in vitro. Biochem J. 1993 Jul 1;293 (Pt 1):119-24.

10. Kim JW, Kim YK, Ahn YH. A mechanism of differential expression of GLUT2 in hepatocyte and pancreatic beta-cell line. Exp Mol Med. 1998 Mar 31;30(1):15-20.

11. Brichard SM, Ongemba LN, Henquin JC. Oral vanadate decreases muscle insulin resistance in obese fa/fa rats. Diabetologia. 1992 Jun;35(6):522-7.

12. Brichard SM, Assimacopoulos-Jeannet F, Jeanrenaud B. Vanadate treatment markedly increases glucose utilization in muscle of insulin-resistant fa/fa rats without modifying glucose transporter expression. Endocrinology. 1992 Jul;131(1):311-7.

13. Burcelin R, Eddouks M, Kande J, Assan R, Girard J. Evidence that GLUT-2 mRNA and protein concentrations are decreased by hyperinsulinaemia and

* De acordo com: international Committee of Medical Journal Editors: Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: http://www.icmje.org [2007 May 22].

increased by hyperglycaemia in liver of diabetic rats. Biochem J. 1992 Dec 1;288 (Pt 2):675-9.

14. Oka Y, Asano T, Shibasaki Y, Lin JL, Tsukuda K, Akanuma Y, et al. Increased liver glucose-transporter protein and mRNA in streptozocin-induced diabetic rats. Diabetes. 1990 Apr;39(4):441-6.

15. Yamamoto T, Fukumoto H, Koh G, Yano H, Yasuda K, Masuda K, et al. Liver and muscle-fat type glucose transporter gene expression in obese and diabetic rats. Biochem Biophys Res Commun. 1991 Mar 29;175(3):995-1002.

16. Powell EE, Jonsson JR, Clouston AD. Dangerous liaisons: the metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease. Ann Intern Med. 2005 Nov 15;143(10):753-4.

17. Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nakagawa T, Taniguchi H, Fujii K, et al. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. Ann Intern Med. 2005 Nov 15;143(10):722-8.

18. Wang JT, Liu YL. Non-alcoholic fatty liver disease: the problems we are facing. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2003 Aug;2(3):334-7.

19. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. Hepatology. 2003 May;37(5):1202-19.

20. Okamoto Y, Tanaka S, Haga Y. Enhanced GLUT2 gene expression in an oleic acid-induced in vitro fatty liver model. Hepatol Res. 2002 Jun;23(2):138-44.

21. Santer R, Schneppenheim R, Suter D, Schaub J, Steinmann B. Fanconi-Bickel syndrome--the original patient and his natural history, historical steps leading to the primary defect, and a review of the literature. Eur J Pediatr. 1998 Oct;157(10):783-97.

22. Freitas HS, Schaan BD, Seraphim PM, Nunes MT, Machado UF. Acute and short-term insulin-induced molecular adaptations of GLUT2 gene expression in the renal cortex of diabetic rats. Mol Cell Endocrinol. 2005 Jun 15;237(1-2):49-57.

23. Vestri S, Okamoto MM, de Freitas HS, Aparecida Dos Santos R, Nunes MT, Morimatsu M, et al. Changes in sodium or glucose filtration rate modulate expression of glucose transporters in renal proximal tubular cells of rat. J Membr Biol. 2001 Jul 15;182(2):105-12.

24. Nath KA. Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. Am J Kidney Dis. 1992 Jul;20(1):1-17.

25. Heilig CW, Brosius FC, 3rd, Henry DN. Glucose transporters of the glomerulus and the implications for diabetic nephropathy. Kidney Int Suppl. 1997 Sep;60:S91-9.

26. Adler S. Structure-function relationships in diabetic nephropathy: lessons and limitations. Kidney Int Suppl. 1997 Sep;60:S42-5.

27. Gerich JE. Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications. Diabet Med. Feb;27(2):136-42.

28. Dominguez JH, Camp K, Maianu L, Feister H, Garvey WT. Molecular adaptations of GLUT1 and GLUT2 in renal proximal tubules of diabetic rats. Am J Physiol. 1994 Feb;266(2 Pt 2):F283-90.

29. Im SS, Kang SY, Kim SY, Kim HI, Kim JW, Kim KS, et al. Glucose-stimulated upregulation of GLUT2 gene is mediated by sterol response element-binding protein-1c in the hepatocytes. Diabetes. 2005 Jun;54(6):1684-91.

30. Freitas HS, D'Agord Schaan B, da Silva RS, Okamoto MM, Oliveira-Souza M, Machado UF. Insulin but not phlorizin treatment induces a transient increase in GLUT2 gene expression in the kidney of diabetic rats. Nephron Physiol. 2007;105(3):p42-51.

31. Blumenfeld M, Maury M, Chouard T, Yaniv M, Condamine H. Hepatic nuclear factor 1 (HNF1) shows a wider distribution than products of its known target genes in developing mouse. Development. 1991 Oct;113(2):589-99.

32. Miura N, Tanaka K. Analysis of the rat hepatocyte nuclear factor (HNF) 1 gene promoter: synergistic activation by HNF4 and HNF1 proteins. Nucleic Acids Res. 1993 Aug 11;21(16):3731-6.

33. Frain M, Swart G, Monaci P, Nicosia A, Stampfli S, Frank R, et al. The liver-specific transcription factor LF-B1 contains a highly diverged homeobox DNA binding domain. Cell. 1989 Oct 6;59(1):145-57.

34. De Simone V, Cortese R. Transcriptional regulation of liver-specific gene expression. Curr Opin Cell Biol. 1991 Dec;3(6):960-5.

35. Gautier-Stein A, Zitoun C, Lalli E, Mithieux G, Rajas F. Transcriptional regulation of the glucose-6-phosphatase gene by cAMP/vasoactive intestinal peptide in the intestine. Role of HNF4alpha, CREM, HNF1alpha, and C/EBPalpha. J Biol Chem. 2006 Oct 20;281(42):31268-78.

36. Wang H, Antinozzi PA, Hagenfeldt KA, Maechler P, Wollheim CB. Molecular targets of a human HNF1 alpha mutation responsible for pancreatic beta-cell dysfunction. EMBO J. 2000 Aug 15;19(16):4257-64.

37. Ott MO, Rey-Campos J, Cereghini S, Yaniv M. vHNF1 is expressed in epithelial cells of distinct embryonic origin during development and precedes HNF1 expression. Mech Dev. 1991 Dec;36(1-2):47-58.

38. Wang H, Maechler P, Hagenfeldt KA, Wollheim CB. Dominant-negative suppression of HNF-1alpha function results in defective insulin gene transcription and impaired metabolism-secretion coupling in a pancreatic beta-cell line. EMBO J. 1998 Nov 16;17(22):6701-13.

39. Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M, et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). Nature. 1996 Dec 5;384(6608):455-8.

40. Vaxillaire M, Boccio V, Philippi A, Vigouroux C, Terwilliger J, Passa P, et al. A gene for maturity onset diabetes of the young (MODY) maps to chromosome 12q. Nat Genet. 1995 Apr;9(4):418-23.

41. Lazzaro D, De Simone V, De Magistris L, Lehtonen E, Cortese R. LFB1 and LFB3 homeoproteins are sequentially expressed during kidney development. Development. 1992 Feb;114(2):469-79.

42. Isomaa B, Henricsson M, Lehto M, Forsblom C, Karanko S, Sarelin L, et al. Chronic diabetic complications in patients with MODY3 diabetes. Diabetologia. 1998 Apr;41(4):467-73.

43. Pontoglio M, Barra J, Hadchouel M, Doyen A, Kress C, Bach JP, et al. Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. Cell. 1996 Feb 23;84(4):575-85.

44. Cha JY, Kim H, Kim KS, Hur MW, Ahn Y. 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. J Biol Chem. 2000 Jun 16;275(24):18358-65.

45. Lai E, Prezioso VR, Tao WF, Chen WS, Darnell JE, Jr. Hepatocyte nuclear factor 3 alpha belongs to a gene family in mammals that is homologous to the Drosophila homeotic gene fork head. Genes Dev. 1991 Mar;5(3):416-27.

46. Shen W, Scearce LM, Brestelli JE, Sund NJ, Kaestner KH. Foxa3 (hepatocyte nuclear factor 3gamma) is required for the regulation of hepatic GLUT2 expression and the maintenance of glucose homeostasis during a prolonged fast. J Biol Chem. 2001 Nov 16;276(46):42812-7.

47. McPherson CE, Shim EY, Friedman DS, Zaret KS. An active tissue-specific enhancer and bound transcription factors existing in a precisely positioned nucleosomal array. Cell. 1993 Oct 22;75(2):387-98.

48. Shim EY, Woodcock C, Zaret KS. Nucleosome positioning by the winged helix transcription factor HNF3. Genes Dev. 1998 Jan 1;12(1):5-10.

49. Tomura H, Nishigori H, Sho K, Yamagata K, Inoue I, Takeda J. Loss-of-function and dominant-negative mechanisms associated with hepatocyte nuclear factor-1beta mutations in familial type 2 diabetes mellitus. J Biol Chem. 1999 May 7;274(19):12975-8.

50. Freitas HS, Schaan BD, David-Silva A, Sabino-Silva R, Okamoto MM, Alves-Wagner AB, et al. SLC2A2 gene expression in kidney of diabetic rats is regulated by HNF-1alpha and HNF-3beta. Mol Cell Endocrinol. 2009 Jun 16;305(1-2):63-70.

51. Wolfrum C, Asilmaz E, Luca E, Friedman JM, Stoffel M. Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. Nature. 2004 Dec 23;432(7020):1027-32.

52. Sladek FM, Zhong WM, Lai E, Darnell JE, Jr. Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. Genes Dev. 1990 Dec;4(12B):2353-65.

53. Miquerol L, Lopez S, Cartier N, Tulliez M, Raymondjean M, Kahn A. Expression of the L-type pyruvate kinase gene and the hepatocyte nuclear factor 4 transcription factor in exocrine and endocrine pancreas. J Biol Chem. 1994 Mar 25;269(12):8944-51.

54. Leclerc I, Lenzner C, Gourdon L, Vaulont S, Kahn A, Viollet B. Hepatocyte nuclear factor-4alpha involved in type 1 maturity-onset diabetes of the young is a novel target of AMP-activated protein kinase. Diabetes. 2001 Jul;50(7):1515-21.

55. Wang H, Maechler P, Antinozzi PA, Hagenfeldt KA, Wollheim CB. Hepatocyte nuclear factor 4alpha regulates the expression of pancreatic beta -cell genes implicated in glucose metabolism and nutrient-induced insulin secretion. J Biol Chem. 2000 Nov 17;275(46):35953-9.

56. Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ, et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). Nature. 1996 Dec 5;384(6608):458-60.

57. Hattersley AT. Maturity-onset diabetes of the young: clinical heterogeneity explained by genetic heterogeneity. Diabet Med. 1998 Jan;15(1):15-24.

58. Lindner T, Gragnoli C, Furuta H, Cockburn BN, Petzold C, Rietzsch H, et al. Hepatic function in a family with a nonsense mutation (R154X) in the hepatocyte nuclear factor-4alpha/MODY1 gene. J Clin Invest. 1997 Sep 15;100(6):1400-5.

59. Fleischmann M, Iynedjian PB. Regulation of sterol regulatory-element binding protein 1 gene expression in liver: role of insulin and protein kinase B/cAkt. Biochem J. 2000 Jul 1;349(Pt 1):13-7.

60. Im SS, Kim JW, Kim TH, Song XL, Kim SY, Kim HI, et al. Identification and characterization of peroxisome proliferator response element in the mouse GLUT2 promoter. Exp Mol Med. 2005 Apr 30;37(2):101-10.

61. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. Cell. 1997 May 2;89(3):331-40.

62. Sun L, Halaihel N, Zhang W, Rogers T, Levi M. Role of sterol regulatory element-binding protein 1 in regulation of renal lipid metabolism and glomerulosclerosis in diabetes mellitus. J Biol Chem. 2002 May 24;277(21):18919-27.

63. Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL. The DNA binding domain of the rat liver nuclear protein C/EBP is bipartite. Science. 1989 Mar 31;243(4899):1681-8.

64. Trautwein C, Caelles C, van der Geer P, Hunter T, Karin M, Chojkier M. Transactivation by NF-IL6/LAP is enhanced by phosphorylation of its activation domain. Nature. 1993 Aug 5;364(6437):544-7.

65. Trautwein C, van der Geer P, Karin M, Hunter T, Chojkier M. Protein kinase A and C site-specific phosphorylations of LAP (NF-IL6) modulate its binding affinity to DNA recognition elements. J Clin Invest. 1994 Jun;93(6):2554-61.

66. Liu S, Croniger C, Arizmendi C, Harada-Shiba M, Ren J, Poli V, et al. Hypoglycemia and impaired hepatic glucose production in mice with a deletion of the C/EBPbeta gene. J Clin Invest. 1999 Jan;103(2):207-13.

67. Wang L, Shao J, Muhlenkamp P, Liu S, Klepcyk P, Ren J, et al. Increased insulin receptor substrate-1 and enhanced skeletal muscle insulin sensitivity in mice lacking CCAAT/enhancer-binding protein beta. J Biol Chem. 2000 May 12;275(19):14173-81.

68. Arizmendi C, Liu S, Croniger C, Poli V, Friedman JE. The transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein beta regulates gluconeogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription during diabetes. J Biol Chem. 1999 May 7;274(19):13033-40.

69. Croniger C, Trus M, Lysek-Stupp K, Cohen H, Liu Y, Darlington GJ, et al. Role of the isoforms of CCAAT/enhancer-binding protein in the initiation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription at birth. J Biol Chem. 1997 Oct 17;272(42):26306-12.

70. Lu M, Seufert J, Habener JF. Pancreatic beta-cell-specific repression of insulin gene transcription by CCAAT/enhancer-binding protein beta. Inhibitory interactions with basic helix-loop-helix transcription factor E47. J Biol Chem. 1997 Nov 7;272(45):28349-59.

71. Bosch F, Sabater J, Valera A. Insulin inhibits liver expression of the CCAAT/enhancer-binding protein beta. Diabetes. 1995 Mar;44(3):267-71.

72. Kim JW, Ahn YH. CCAAT/enhancer binding protein regulates the promoter activity of the rat GLUT2 glucose transporter gene in liver cells. Biochem J. 1998 Nov 15;336 (Pt 1):83-90.

73. Bartoov-Shifman R, Hertz R, Wang H, Wollheim CB, Bar-Tana J, Walker MD. Activation of the insulin gene promoter through a direct effect of hepatocyte nuclear factor 4 alpha. J Biol Chem. 2002 Jul 19;277(29):25914-9.

74. Cheng PY, Wang M, Morgan ET. Rapid transcriptional suppression of rat cytochrome P450 genes by endotoxin treatment and its inhibition by curcumin. J Pharmacol Exp Ther. 2003 Dec;307(3):1205-12.

75. Ahn YH, Kim JW, Han GS, Lee BG, Kim YS. Cloning and characterization of rat pancreatic beta-cell/liver type glucose transporter gene: a unique exon/intron organization. Arch Biochem Biophys. 1995 Nov 10;323(2):387-96.

76. Asano T, Katagiri H, Tsukuda K, Lin JL, Ishihara H, Yazaki Y, et al. Upregulation of GLUT2 mRNA by glucose, mannose, and fructose in isolated rat hepatocytes. Diabetes. 1992 Jan;41(1):22-5.

77. Manz F, Bickel H, Brodehl J, Feist D, Gellissen K, Gescholl-Bauer B, et al. Fanconi-Bickel syndrome. Pediatr Nephrol. 1987 Jul;1(3):509-18.

78. Tomihira M, Kawasaki E, Nakajima H, Imamura Y, Sato Y, Sata M, et al. Intermittent and recurrent hepatomegaly due to glycogen storage in a patient with type 1 diabetes: genetic analysis of the liver glycogen phosphorylase gene (PYGL). Diabetes Res Clin Pract. 2004 Aug;65(2):175-82.

79. Munns CF, McCrossin RB, Thomsett MJ, Batch J. Hepatic glycogenosis: reversible hepatomegaly in type 1 diabetes. J Paediatr Child Health. 2000 Oct;36(5):449-52.

80. Gerich JE. Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications. Diabet Med. 2010 Feb;27(2):136-42.

81. Bowden DW, Sale M, Howard TD, Qadri A, Spray BJ, Rothschild CB, et al. Linkage of genetic markers on human chromosomes 20 and 12 to NIDDM in Caucasian sib pairs with a history of diabetic nephropathy. Diabetes. 1997 May;46(5):882-6.

82. Iwasaki N, Ogata M, Tomonaga O, Kuroki H, Kasahara T, Yano N, et al. Liver and kidney function in Japanese patients with maturity-onset diabetes of the young. Diabetes Care. 1998 Dec;21(12):2144-8.

83. Struhl K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. Genes Dev. 1998 Mar 1;12(5):599-606.

84. Hiraiwa H, Pan CJ, Lin B, Akiyama TE, Gonzalez FJ, Chou JY. A molecular link between the common phenotypes of type 1 glycogen storage disease and HNF1alpha-null mice. J Biol Chem. 2001 Mar 16;276(11):7963-7.

85. Wolfrum C, Besser D, Luca E, Stoffel M. Insulin regulates the activity of forkhead transcription factor Hnf-3beta/Foxa-2 by Akt-mediated phosphorylation and nuclear/cytosolic localization. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Sep 30;100(20):11624-9.

86. Rhee J, Inoue Y, Yoon JC, Puigserver P, Fan M, Gonzalez FJ, et al. Regulation of hepatic fasting response by PPARgamma coactivator-1alpha (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4alpha in gluconeogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Apr 1;100(7):4012-7.

87. Leclerc I, Kahn A, Doiron B. The 5'-AMP-activated protein kinase inhibits the transcriptional stimulation by glucose in liver cells, acting through the glucose response complex. FEBS Lett. 1998 Jul 17;431(2):180-4.

88. Shimano H. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. Prog Lipid Res. 2001 Nov;40(6):439-52.

89. Wu C, Okar DA, Stoeckman AK, Peng LJ, Herrera AH, Herrera JE, et al. A potential role for fructose-2,6-bisphosphate in the stimulation of hepatic glucokinase gene expression. Endocrinology. 2004 Feb;145(2):650-8.