

**JOÃO NILTON BARRETO ANDRADE**

**O SP1 (transcription factor Sp1) participa da regulação transcricional do *Slc2a4*  
mediada pelo receptor de estrógeno ER-alfa em adipócitos 3T3-L1**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do título de  
Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado

**SÃO PAULO  
2018**

**JOÃO NILTON BARRETO ANDRADE**

**O SP1 (transcription factor Sp1) participa da regulação transcricional do *Slc2a4*  
mediada pelo receptor de estrógeno ER-alfa em adipócitos 3T3-L1**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do título de  
Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado

**SÃO PAULO  
2018**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Andrade, João Nilton Barreto

O SP1 (transcription factor Sp1) participa da  
regulação transcricional do Slc2a4 mediada pelo  
receptor de estrógeno ER-alfa em adipócitos 3T3-L1 /  
João Nilton Barreto Andrade. -- São Paulo, 2018.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Ubiratan Fabres Machado.

Descritores: 1.Diabetes mellitus tipo 2  
2.Resistência à insulina 3.Transportador de glicose  
tipo 4 4.Estradiol 5.Receptores estrogênicos  
6.Fator de transcrição SP1

USP/FM/DBD-115/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

## Normalização adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (ABNT- Associação Brasileira de Normas técnicas).

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas da USP Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: parte I (ABNT) / Sistema Integrado de Bibliotecas da USP; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, coordenadora; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro [et al.]. 3.ed. rev. ampl. mod. São Paulo: SIBiUSP, 2016.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de biblioteca e Documentação; 2011.

## RESUMO

Andrade JNB. *O SP1 (transcription factor Sp1) participa da regulação transcricional do Slc2a4 mediada pelo receptor de estrógeno ER-alfa em adipócitos 3T3-L1* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

O diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) é caracterizado pela presença de resistência à insulina, a qual pode ser modulada pelo estrógeno, tanto em fêmeas como em machos. Nesse processo, o transportador de glicose GLUT4 (gene *Slc2a4*, solute carrier family 2 member 4) desempenha papel importante, pois aumento da expressão do GLUT4 melhora o controle glicêmico. Estradiol (E2) regula a expressão do *Slc2a4* por meio do balanço dos efeitos contrários de seus receptores (ERs): ER-alfa estimula e ER-beta inibe a expressão. Efeitos transcricionais dos ERs envolvem a participação de co-reguladores, destacadamente o SP1 (*transcription factor Sp1*), potente estimulador do *Slc2a4*. Entretanto, o papel do SP1 na regulação do *Slc2a4* mediada pelos ERs é desconhecido; e este foi o objetivo do presente estudo. Investigou-se adipócitos maduros 3T3-L1, tratados por 24 horas com E2, agonista de ER-alfa (PPT) ou agonista de ER-beta (DPN). Avaliou-se: a expressão gênica (RT-qPCR) de *Slc2a4* e *Sp1*; o conteúdo (Western blotting) total de GLUT4 e o nuclear de ER-alfa/beta e SP1; a atividade de ligação do SP1 no *Slc2a4* (ensaio de mobilidade eletroforética); e a formação de complexos SP1/ER-alfa (imunoprecipitação). Os resultados confirmaram que E2 aumenta a expressão de *Slc2a4*/GLUT4 pela ação preponderante do ER-alfa. O agonista PPT aumentou: o conteúdo nuclear de SP1, a interação SP1/ER-alfa e a atividade de ligação do SP1 no *Slc2a4*. O agonista DPN indicou que a ação repressora do ER-beta não envolve o SP1. Conclui-se que o efeito estimulador do ER-alfa na expressão do *Slc2a4* envolve mecanismo de transativação gênica via SP1. Essas observações colocam a cooperação ER-alfa/SP1 como um novo alvo para o desenvolvimento de medidas terapêuticas para resistência à insulina e diabetes *mellitus* tipo 2.

**Descritores:** diabetes *mellitus* tipo 2; resistência à insulina; transportador de glicose tipo 4; estradiol; receptores estrogênicos; fator de transcrição SP1.

## ABSTRACT

Andrade JNB. *SP1 (transcription factor Sp1) participates in the transcriptional regulation of Slc2a4 mediated by estrogen receptor ER-alpha in 3T3-L1 adipocytes* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is characterized by insulin resistance, which can be modulated by estrogen in both females and males. In this process, the glucose transporter GLUT4 (solute carrier family 2 member 4 gene – *Slc2a4*) plays an important role, since increasing GLUT4 expression improves glycemic control. Estradiol (E2) regulates the expression of *Slc2a4*, by a mechanism in which estrogen receptors (ERs) play opposite effects: ER-alpha stimulates, whereas ER-beta inhibits the expression. Transcriptional effects of ERs involve co-regulators, notably the transcription factor SP1, a powerful enhancer of *Slc2a4*. However, the role of SP1 in the ERs-mediated regulation of *Slc2a4* is unknown; and that was the aim of the present study. Differentiated adipocytes 3T3-L1 were treated (24 hours) with E2, ER-alpha agonist (PPT) or ER-beta agonist (DPN). It was analyzed: gene expression (RT-qPCR) of *Slc2a4* and *Sp1*; total content of GLUT4 and nuclear content of ER-alpha/beta and SP1 (Western blotting); binding activity of SP1 into *Slc2a4* promoter (electrophoretic mobility shift assay); and content of nuclear SP1/ER-alpha complexes (immunoprecipitation). Results confirmed that E2 increases the expression of *Slc2a4*/GLUT4, by the dominant effect of ER-alpha. The ER-alpha agonist PPT increased the nuclear content of SP1, the interaction of SP1/ER-alpha, and the binding activity of SP1 into the *Slc2a4*. The agonist DPN evinced that ER-beta activity does not involve the SP1. In conclusion, the enhancer effect of ER-alpha upon *Slc2a4* gene expression involves a transactivation mechanism via SP1. This observation points out the cooperation of ER-alpha/SP1 as a new target for the development of approaches to treat insulin resistance and T2DM.

**Descriptors:** diabetes mellitus, type 2; insulin resistance; glucose transporter type 4; estradiol; receptors, estrogen; transcription factor SP1.

## 1 INTRODUÇÃO

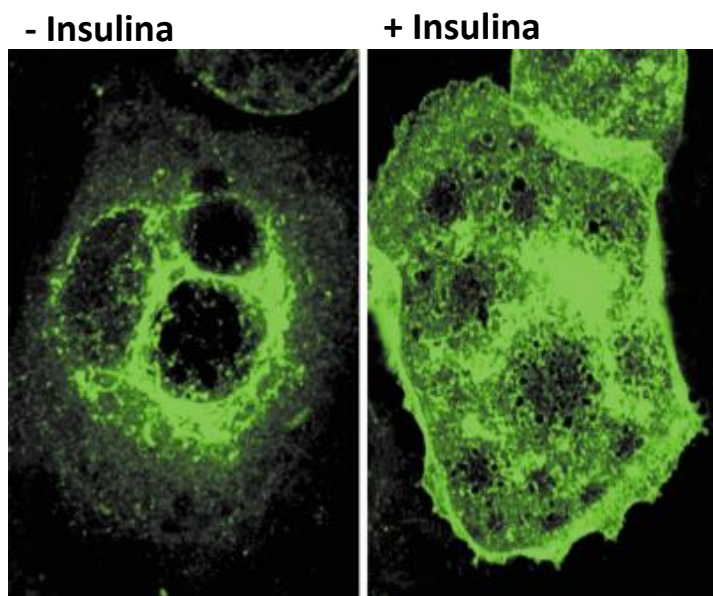
Há décadas, o diabetes *mellitus* (DM) tomou proporções epidêmicas (ZIMMET; ALBERTI; SHAW, 2001), em 1995 eram 135 milhões de pessoas acometidas (WHO, 2006), e esse número triplicou em 20 anos; segundo o “IDF Diabetes Atlas” da Federação Internacional de Diabetes (<http://www.diabetesatlas.org>), em 2015 eram 415 milhões de indivíduos com diabetes na terra. Além disso, O IDF Diabetes Atlas projeta para 2040 uma população de 642 milhões de indivíduos diabéticos na terra, estando 23 milhões no Brasil. Esses números mostram um aumento de 54% na população diabética, *versus* um aumento de 24,6% na população geral da terra, indicando que o caráter epidêmico do DM está longe de, pelo menos, estabilizar-se.

O aumento da incidência do DM, principalmente do diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) que acomete cerca de 90% a 95% da população diabética (ADA, 2010), está relacionado a fatores como aumento da longevidade e mudança em hábitos alimentares e estilos de vida (WILD et al., 2004). Por isso, pesquisas estão sendo conduzidas há muito tempo em busca de abordagens preventivas e/ou terapêuticas, especialmente para o DM2. Para tal, aprofundar o conhecimento das bases etiopatogênicas e fisiopatológicas é fundamental, o que no DM2 agrega dois fatores: a resistência periférica à ação da insulina e a disfunção das células betas pancreáticas (DeFRONZO, 2004).

A resistência à insulina (RI) caracteriza-se, entre outros mecanismos, por uma redução da capacidade de captação de glicose nos tecidos em que esta ação é regulada pelo hormônio (SAVANGE; PETERSEN; SHULMAN, 2007). Na RI há um prejuízo no desencadeamento de sinais intracelulares, iniciando-se pela fosforilação dos substratos do receptor de insulina (IRS-1/2), os quais são responsáveis pela ativação de várias outras proteínas relacionadas aos efeitos biológicos da insulina. Nos tecidos em que a captação de glicose é sensível à insulina, o hormônio acaba induzindo a translocação de vesículas contendo os transportadores de glicose GLUT4 (solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4) em suas membranas, as quais vão se inserir na membrana celular. Isso aumenta a densidade de transportadores na membrana celular, e, conseqüentemente, a captação do substrato, reduzindo a concentração plasmática do substrato. Na RI e no DM2, a translocação de GLUT4 fica comprometida, tanto por diminuição na mobilização das vesículas que contêm GLUT4 (CIARALDI; HENRY, 1997; BERGER et al., 1989), como, principalmente, por redução na expressão do

GLUT4, reduzindo a densidade do transportador na membrana vesicular (CORRÊA-GIANNELLA; MACHADO, 2013). Essas alterações contribuem para um menor clareamento da glicose sanguínea, e, conseqüentemente, para a hiperglicemia.

O GLUT4, codificado pelo gene *Slc2a4* (solute carrier family 2 member 4), é expresso principalmente nos tecidos adiposos (branco e marrom) e musculares (esquelético e cardíaco). Este transportador desempenha papel importante no transporte de glicose estimulado por insulina nestes tecidos. Como já foi dito, o estímulo insulínico aumenta a translocação das vesículas de GLUT4 para a superfície da célula (Figura 1), e conseqüentemente a captação de glicose (FURTADO et al., 2002). Entretanto, esse processo de tráfego vesicular somente alcançará os efeitos biológicos esperados se a expressão do GLUT4 estiver preservada, proporcionando um adequado aumento na densidade do transportador. De fato, sabe-se que a redução na expressão de GLUT4 reduz a captação de glicose, o que se associa com a RI (STENBIT et al., 1997; CORRÊA-GIANNELLA; MACHADO, 2013), e que o aumento na expressão do GLUT4 melhora o controle glicêmico (BROZINICK et al., 2001; CORRÊA-GIANNELLA; MACHADO, 2013).



**Figura 1-** Imagem confocal de células 3T3-L1 incubadas (ou não) com insulina. A localização de GLUT4 é mostrada usando anticorpo específico e um anticorpo secundário conjugado com Alexa-488 (mostrado em verde). Fonte: Bryant e colaboradores (2002).

É importante ressaltar que a notória translocação de GLUT4 demonstrada em adipócitos *in vitro*, como mostrado na Figura 1, compara sempre o estímulo insulínico



com uma condição basal na qual a insulina está total e cronicamente ausente. É claro que aumento na concentração de insulina, sobre valores insulinêmicos basais observados *in vivo* (como no jejum), também induzem translocação de GLUT4, porém a magnitude do evento é muito menor (MACHADO et al., 1993). Além disso, no músculo esquelético *in vivo*, o próprio tônus contrátil induz importante translocação de GLUT4, a qual se soma àquela induzida pela insulinemia basal. É dentro desse contexto que a expressão do GLUT4, regulando a densidade de transportador inserido na membrana das vesículas, assume grande relevância na capacidade de músculo e tecido adiposo captarem glicose sob estímulo com insulina (CORRÊA-GIANNELLA; MACHADO, 2013).

Diversos fatores podem levar ao desencadeamento da RI; entre os mais inusitados tem se destacado, o hormônio estradiol (E2). Nos seres humanos, o E2 é o principal estrógeno endógeno, que além de estar envolvido no desenvolvimento e fisiologia da reprodução feminina, também tem ação sobre a regulação de inúmeros genes relacionados a outros fenômenos biológicos, inclusive em machos (NILSSON et al., 2001), incluindo a regulação do controle glicêmico e a sensibilidade à insulina.

O E2 é derivado do colesterol e formado, principalmente, pela ação da enzima aromatase sobre a testosterona, podendo ainda ser gerado pela ação da 17 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase (17 $\beta$ -HSD) sobre a estrona (Figura 2a). Em resumo, o colesterol é convertido em pregnenolona, que pode ser utilizada por duas vias distintas: 1) metabolizada através de 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona em desidroepiandrosterona (DHEA) e depois androstenediona, que por ação da enzima aromatase é convertida em estrona, e através da enzima 17 $\beta$ -HSD, em estradiol; 2) também pode ser metabolizada para progesterona, 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona e androstenediona, que por sua vez será convertida em testosterona e, através da enzima aromatase, ao estradiol (Figura 2a), (PAYNE; HALES, 2004). Nas mulheres pré-menopausadas, o E2 é produzido principalmente nos ovários, e após a menopausa e nos homens, a síntese do E2 ocorre principalmente em tecido adiposo, endotélio vascular, osso e cérebro (SIMPSON, 2003).

Em humanos, há muitos estudos demonstrando o envolvimento do E2 na sensibilidade insulínica em estados fisiológicos como gestação, fase do ciclo menstrual e menopausa (BUCHANAN et al., 1990; CASE; REID, 2001; SOLOMON et al, 2001; SAUCEDO et al., 2007; GODSLAND, 2005); e também em estados patológicos, como diabetes *mellitus* gestacional, síndrome dos ovários policísticos e síndrome de Turner

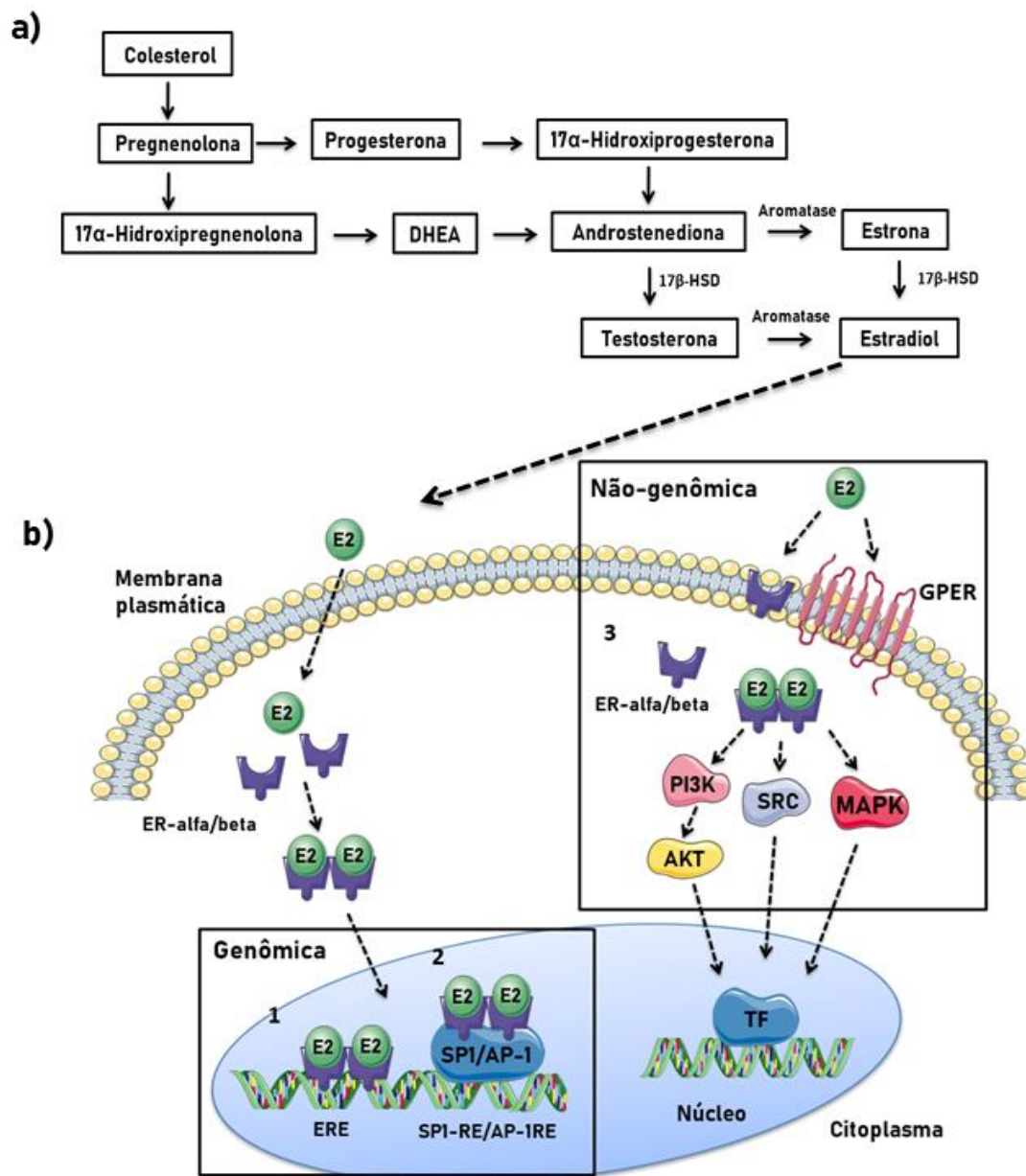
(KAAJA; GEER, 2005; DUNAIF et al., 1989; GRAVHOLT et al., 2001; 2000). Todas essas condições são caracterizadas por alterações significativas nos níveis de E2, sugerindo um papel importante do desequilíbrio hormonal (tanto em condições de hiperestrogenismo ou ausência de estrógeno) na RI, e conseqüentemente no desenvolvimento DM2.

Pesquisas utilizando modelos experimentais de camundongos *knockouts* para a enzima aromatase (ArKO), imprescindível para formação do E2, confirmaram a relação do E2 com a homeostasia glicêmica (FISHER et al., 1998). Os camundongos ArKO machos e fêmeas apresentam aumento dos níveis de insulina e adiposidade (JONES et al., 2000; 2001); além disso, os machos desenvolvem intolerância à glicose e resistência insulínica, e o tratamento desses animais com E2 é capaz de melhorar (SINDEREN et al., 2017) ou até mesmo reverter (TAKEDA et al., 2003) esses fenótipos metabólicos.

Evidências crescentes demonstram que, em mulheres pós-menopausadas (MARGOLIS et al., 2004; SALPETER et al., 2005; BONDS et al., 2006) e em homens com deficiência genética da enzima aromatase (ROCHIRA et al., 2007), a terapia de reposição do E2 melhora a sensibilidade à insulina e o controle glicêmico, reduzindo a incidência de DM2. De fato, é evidente clínica e experimentalmente a relação entre E2 e RI em machos e fêmeas; no entanto, para que possamos entender o papel do E2 na regulação da homeostasia glicêmica, é importante compreender os mecanismos pelos quais o E2 modula seus efeitos fisiológicos.

O E2 exerce a maioria das suas funções biológicas ligando-se aos receptores de estrógenos (ER – Estrogen Receptor), ER-alfa e ER-beta, também chamados de ESR1 e ESR2, respectivamente, conforme a designação dos genes que os codificam. Esses receptores podem atuar como fatores de transcrição e são responsáveis pelas ações genômicas clássicas dos estrógenos, que normalmente ocorre em horas. Nesta via de sinalização, os ERs regulam a expressão de genes por meio de dois mecanismos: diretamente por ligação ao DNA do gene alvo, ou indiretamente por interações com outros fatores de transcrição, os quais se ligam ao DNA do gene alvo (PAECH et al., 1997; SAVILLE et al., 2000; NILSSON et al., 2001). Por meio desses mecanismos os ERs levam à ativação ou à repressão de genes alvos. Isso torna o mecanismo de ação genômica do E2 complexo e ainda pouco compreendido em genes alvos não clássicos. Além dos ERs, também já está bem descrito um receptor para estrógeno acoplado à proteína G de membrana, o GPER1 (G-Protein Estrogen Receptor 1). O GPER1, mais os ER-alfa/beta em localização extranuclear, têm sido relacionados a ações rápidas

(geralmente segundos ou minutos) e não-genômicas dos estrógenos, que começaram a ser descritas recentemente (VRTACNIK et al., 2014; LEVIN; HAMMES, 2016), (Figura 2b).



**Figura 2-** a) Biossíntese do hormônio estradiol. b) Mecanismos de ação genômica e não genômica do E2. 1) E2 ativa ER-alfa/beta, formando um homodímero, que se liga a um ERE no promotor do gene alvo; ou 2) associa-se com outros fatores de transcrição (TF), como Fos/Jun, que ligam o ER ativado indiretamente a um AP-1RE ou SP1-RE; 3) E2 pode ativar sinais rápidos, através de formas extranucleares e associadas à membrana de ER e GPER. Este efeito leva a ativação os canais iônicos e das proteínas quinases. Abreviaturas: AP-1, proteína ativadora 1; AP-1RE, elemento responsivo ao AP-1; ERE, elemento responsivo ao ER; SP1, fator de transcrição SP1; SP1RE, elemento responsivo ao Sp1. As abreviaturas das proteínas de sinalização das ações extranucleares estão apresentadas na lista de abreviaturas.

Conforme descrito acima, a ação dos ERs, em geral, é ativada pelo ligante; no entanto, os ERs podem atuar independentemente do ligante, um mecanismo alternativo, onde os ERs clássicos são fosforilados através da ativação de proteínas quinases MAPK/ERK e PI3K/AKT (BUNONE et al., 1996; KATO et al., 1995; SIMONCINI et al., 2000; CAMPBELL et al., 2001).

Pelo acima descrito, fica evidente que os mecanismos de ação do E2 na regulação da expressão de genes são complexos, podendo atuar em conjunto; desta forma, a inibição de um mecanismo de sinalização do E2, pode não abolir completamente as ações regulatórias do E2 ou dos ERs em uma determinada célula ou tecido. A regulação do gene alvo mediada pelo E2, portanto, depende de muitas variáveis, que incluem a associação com fatores de transcrição presentes no promotor do gene, do recrutamento de cofatores transcripcionais (coativadores e coreguladores), das vias de sinalização e dos níveis relativos de expressão dos ERs no tecido.

A distribuição subcelular e o nível relativo de expressão dos receptores de estrógeno variam de acordo com o tecido/tipo de célula. O ER-alfa é o receptor expresso principalmente em útero, hipófise, fígado, coração, rim, tecido esquelético, hipotálamo e cérebro, enquanto que o ER-beta é amplamente expresso no pulmão, ovário, próstata, testículo, células hematopoiéticas, trato gastrointestinal, trato urinário e sistema nervoso central e periférico. Muitos tecidos, como ovário, glândulas mamárias, útero, cérebro, tecido esquelético e cardíaco expressam ambos ERs, com predominância de um ou outro receptor (KUIPER et al., 1997; BARROS; MACHADO; GUSTAFFSON, 2006; MATTHEWS; GUSTAFFSON, 2003). Nos tecidos sensíveis à insulina, já foi identificada a presença de ambos ER-alfa e ER-beta. Em tecido adiposo humano e de camundongo foi descrita a predominância de ER-alfa (DIEUDONNÉ et al., 2004; BARROS et al., 2009) e em músculo esquelético de humanos e de camundongos, foi observada a predominância do ER-beta (WIJK et al., 2003; BARROS et al., 2006; 2008; 2009).

Com o desenvolvimento de agonistas seletivos e de linhagens de camundongos *knockouts* para ER-alfa ou ER-beta, demonstrou-se que além de apresentarem variação na distribuição celular, os ERs exercem efeitos biológicos distintos e algumas vezes opostos. Além disso, em tecidos ou células que expressam ambos receptores pode ocorrer uma inter-relação entre os ERs (BARROS; MACHADO; GUSTAFSSON, 2006). A seguir comentaremos a importância fisiológica dos ERs no controle glicêmico.

Pesquisadores demonstraram que o tratamento com agonista seletivo de ER-alfa melhora o perfil lipídico e glicêmico, e o oposto foi observado após tratamento com agonista seletivo de ER-beta (BANSAL; CHOPRA, 2018). Além disso, camundongos *knockouts* para ER-alfa desenvolvem resistência insulínica, intolerância à glicose e obesidade, o que não é observado em animais *knockouts* para o ER-beta (BARROS et al., 2009; HEINE et al., 2000; COOKE et al., 2001).

Mais recentemente, demonstrou-se que o efeito protetor do estradiol contra a resistência insulínica e obesidade depende do ER-alfa (HANDGRAAF et al., 2013), e muitos estudos indicam que o ER-alfa desempenha papel importante na manutenção da homeostasia glicêmica, agindo em vários territórios como fígado, tecido adiposo, músculo esquelético e células betas pancreáticas (BARROS; GUSTAFSSON, 2011; MAUVAIS-JARVIS; CLEGG; HEVENER, 2013; ROPERO et al., 2008); no entanto, os mecanismos moleculares pelos quais a interação E2/ER-alfa regula a homeostasia glicêmica ainda não são claros.

Buscando caracterizar as ações do E2 na resistência à insulina, pesquisadores avaliaram a influência de estados que apresentam variações na concentração de E2 sobre a expressão do *Slc2a4*/GLUT4. Em tecido adiposo de ratas prenhas e gestantes normais, observou-se redução do conteúdo proteico de GLUT4, sendo que tal redução é mais pronunciada em ratas prenhas diabéticas e gestantes com diabetes *mellitus* (YAMADA et al., 1999; OKUNO et al., 1995). Além disso, em ratas ovariectomizadas observou-se que o GLUT4 aumentava, e a reposição com E2 reduzia o GLUT4 (BARROS et al., 2008). Observando que o estradiol podia regular a expressão do GLUT4, nosso grupo propôs, em 2006, que o E2 seria um importante modulador da sensibilidade insulínica no diabetes *mellitus* (BARROS; MACHADO; GUSTAFSSON, 2006).

A partir de então, clarear a regulação transcricional do gene *Slc2a4* pelo estradiol tornou-se uma meta importante nas nossas investigações, não apenas para caracterizar as alterações da homeostasia glicêmica em situações de aumento ou diminuição das concentrações de estrogênio, mas também para embasar novas estratégias de regulação da expressão do gene *Slc2a4*.

Estudos desenvolvidos por nosso grupo foram precursores da ideia de que o E2 poderia regular a efetividade da insulina em estimular a captação de glicose, ao avaliar os efeitos do silenciamento dos ERs sobre a expressão do transportador GLUT4 em músculo esquelético. Primeiramente foi demonstrado que o *knockout* do ER-alfa reduz,

enquanto o do ER-beta aumenta, a expressão do GLUT4 no músculo esquelético. Além disso, foi observado em animais ArKO, deficientes para a enzima aromatase, tratados com agonista seletivo de ER-beta, a diminuição na expressão de GLUT4 (BARROS et al., 2006). Esses efeitos foram posteriormente confirmados como capazes de se refletir na homeostasia glicêmica, induzindo hiperglicemia e DM (silenciamento do ER-alfa) ou hipoglicemia de jejum (silenciamento do ER-beta) (BARROS et al., 2009).

A regulação do GLUT4 pelo E2 foi comprovada em músculo de ratas ovariectomizadas e em células musculares L6 tratadas com E2 por 6 dias (BARROS et al., 2008). Neste estudo, o efeito do E2 foi de reduzir a expressão de *Slc2a4*/GLUT4, indicando um balanço ER-beta/ER-alfa positivo, isto é, a ação repressora do ER-beta sobrepondo-se à ação estimuladora do ER-alfa no músculo (BARROS et al., 2008).

Posteriormente, confirmou-se em células adiposas que o ER-alfa estimula, enquanto o ER-beta inibe a expressão de *Slc2a4*/GLUT4; e a ação isolada de cada ER se reflete em alteração paralela na captação de glicose estimulada por insulina (CAMPELLO et al., 2012). Adicionalmente, foi demonstrado, por meio de ensaio de mobilidade eletroforética, que o fator transcricional NFkB (do inglês, *Nuclear Factor NF-kappa-B*), um repressor do gene *Slc2a4* (FURUYA et al., 2013), participa dos efeitos mediados pelos ER-alfa/beta, tanto induzidos por E2 como por agonistas/antagonistas seletivos para cada receptor (CAMPELLO et al., 2012).

Mais recentemente, Campello e colaboradores (2017), demonstraram que o E2 promove a translocação de ER-alfa, mas não de ER-beta, do núcleo para membrana plasmática, além de aumentar a fosforilação de AKT, expressão de *Slc2a4*/GLUT4 e translocação GLUT4 para membrana, contribuindo para melhora da absorção de glicose estimulada pela insulina. Ou seja, o E2 aumenta a captação de glicose através da ativação da via de sinalização da AKT, favorecendo a translocação de GLUT4 para membrana por mecanismos dependentes do ER-alfa. Esses resultados evidenciam mecanismos de ação não genômica do E2/ER-alfa envolvidos na melhora da sensibilidade à insulina. No entanto, nada se conhece ainda sobre a participação do fator transcricional SP1 (*transcription factor Sp1*) na regulação do *Slc2a4* pelo E2 e ERs, através de mecanismos de ação genômica não clássica.

O SP1 é um fator de transcrição descrito no início dos anos 80 (DYNAN; TJIAN, 1983; 1985; BRIGGS et al., 1986), pertencente à família *Specificity Protein/Krüppel-like* (SP/KLF), que atualmente inclui 26 fatores de transcrição (SUSKE; BRUFORD; PHILIPSEN, 2005; VAN VLIET et al., 2006). O SP1 é

composto por 785 aminoácidos, com peso molecular de 100 a 110 kDa (TAN; KHACHIGIAN, 2009). Possui no seu domínio C-terminal três dedos de zinco, tipo  $C_2H_2$ , os quais são necessários para que ocorra a ligação no DNA (PHILIPSEN; SUSKE, 1999; BLACK; BLACK; AZIZKHAN-CLIFFORD, 2001; BOUWMAN; PHILIPSEN, 2002), principalmente em sequências ricas em GC (tais como 5'-G/T-GGGCGG-G/A-G/A-C/T-3' ou 5'-G/T-G/A-GGCG-G/T-G/A-G/A-C/T-3'), pelas quais tem alta afinidade (BRIGGS et al., 1986; KADONAGA et al., 1987; KADONAGA; JONES; TJIAN, 1986). Ao ligar-se a esses domínios pode reprimir ou ativar a transcrição dos genes alvos.

O SP1 é expresso ubiquamente em todos os tipos de células de mamíferos, e foi inicialmente considerado apenas como um regulador de genes envolvidos na iniciação da transcrição (LI et al., 2004). No entanto, atualmente, sabe-se que o SP1 desempenha papel importante na regulação de genes envolvidos em diversos processos biológicos, incluindo ciclo celular e diferentes redes de sinalização, de maneira tecido-específica (VIZCAÍNO; MANSILLA; PORTUGAL, 2015; WIERSTRA, 2008). Além disso, estima-se que existem cerca de 12.000 sítios de ligação do SP1 no genoma humano, todos supostamente associados com a regulação da atividade transcricional de genes (CAWLEY et al., 2004), evidenciando a importância do SP1.

O SP1 é capaz de ativar sinergicamente a transcrição gênica através da interação com uma variedade de proteínas dependendo do contexto celular, demonstrando como os mecanismos envolvidos na transcrição gênica pelo SP1 são complexos, e sujeitos a variações em sua atividade de acordo com alterações nas condições celulares e vias de sinalização (WIERSTRA, 2008). Os receptores de estrógeno ER-alfa/beta são capazes de ligar ao SP1 e assim alterar a transcrição gênica de forma sinérgica. Esses efeitos parecem ocorrer em regiões do DNA de genes alvos que contêm sequências ricas em GC, associadas a elemento responsivo a estrógeno, tanto na forma completa (palindrômica) como em half-site (PORTER et al., 1997). Embora a interação funcional entre ER-alfa/beta e SP1 já tenha sido claramente demonstrada (KANDA; WATANABE, 2003; SALVATORI et al., 2003), os detalhes moleculares dessa interação ainda são pouco conhecidos.

Pesquisas demonstraram que tanto ER-alfa como ER-beta podem interagir fisicamente com o SP1 ligando-se preferencialmente no domínio C-terminal do SP1 (local de ligação do SP1 ao DNA do gene alvo); entretanto E2 ativa a transcrição mediada apenas por ER-alfa/SP1, sem alterar a ação ER-beta/SP1 (SAVILLE et al.,

2000). Outro estudo demonstrou que a interação ERs/SP1 aumenta a afinidade de ligação do SP1 ao DNA de gene alvo; e embora esta interação possa ocorrer na presença ou ausência do E2, a transativação da região promotora somente foi evidenciada na presença do hormônio (PORTER et al., 1997). Adicionalmente, os efeitos do E2 sobre as interações dos ERs/SP1 podem variar conforme outras proteínas nucleares; por exemplo, a ligação de GATA-1 (GATA-binding factor 1) aos ERs em sítios de ligação de SP1 é dependente de E2 (MERIKA; ORKIN, 1995), enquanto que a interação da ciclina D1 ao ER nos sítios de ligação de SP1 ocorre na presença ou ausência do hormônio (ZWIJSEN et al., 1997; CASTRO-RIVERA; SAMUDIO; SAFE, 2001). Dessa forma, os mecanismos envolvidos nas respostas dependentes ou não do hormônio ainda não são claros, necessitando de mais pesquisas.

Na década de 90, foi mostrado que o *Slc2a4* tem quatro sítios de ligação para o SP1 em sua região promotora, e que o SP1 aumenta a expressão do GLUT4 (KAESTNER; CHRISTY; LANE, 1990). Desde então, a participação do SP1 na regulação do *Slc2a4* por outros fatores transcricionais, como o clássico SREBP-1 (Sterol regulatory element-binding protein 1), tem sido reiterada (IM et al., 2006; 2007). Neste contexto, sabendo que o SP1 tem um papel importante na regulação do *Slc2a4*, e que o E2 e seus receptores estão envolvidos na regulação do *Slc2a4* e no desenvolvimento da resistência insulínica, nossa hipótese é que o SP1 possa estar envolvido na regulação da expressão do *Slc2a4* mediada pelo E2, principalmente via ER-alfa. Esse conhecimento deverá contribuir para compreensão do papel do E2 na regulação da homeostasia glicêmica.



## CONCLUSÃO

O presente estudo reitera que o E2 aumenta a expressão de *Slc2a4*/GLUT4 em célula adiposa, por meio da ação estimulatória do ER-alfa e da ação inibitória do ER-beta, com preponderância da ação ER-alfa. O estímulo com o agonista do ER-alfa PPT induz aumento da interação SP1/ER-alfa, acompanhado de aumento da atividade de ligação do SP1 no promotor do *Slc2a4*, revelando que o agonista do ER-alfa aumenta a expressão do gene, pelo menos em parte, por mecanismo de transativação.

Essas observações colocam a cooperação ER-alfa/SP1 como um novo alvo para o desenvolvimento de medidas terapêuticas para resistência à insulina e diabetes *mellitus* tipo 2.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADA - AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes care**, v. 33, n.1, 2010.

ANDREWS, N. C.; FALLER, D.V. A rapid micropreparation technique for extration of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 9, p. 2499, 1991.

BANSAL, S.; CHOPRA K. Selective ER- $\alpha$  agonist alleviates vascular endothelial dysfunction in ovariectomized type 2 diabetic rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 460, p. 152-161, 2018.

BARROS, R. P. et al. Participation of ER $\alpha$  and ER $\beta$  in glucose homeostasis in skeletal muscle and white adipose tissue. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 297, n. 1, p.124-133, 2009.

BARROS, R. P.; GUSTAFSSON, J. A. Estrogen receptors and the metabolic network. **Cell Metab.**, v. 14, n. 3, 9-10, p. 289-299, 2011.

BARROS, R. P.; MACHADO, U. F.; GUSTAFSSON, J. A. Estrogen receptors: new players in diabetes mellitus. **Trends Mol Med.**, v. 12, n. 9, p. 425-431, 2006.

BARROS, R. P. et al. Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ER $\beta$  and ER $\alpha$ . **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 103, n. 5, p. 1605-1608, 2006.

BARROS, R. P. et al. Insulin resistance of pregnancy involves estrogen-induced repression of muscle GLUT4. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 295, n. 1-2, p. 24-31, 2008.

BERGER, J. et al. Decreased expression of the insulin-responsive glucose transporter in diabetes and fasting. **Nature (London)**, v. 340, p. 70-72, 1989.

BLACK, A. R.; BLACK, J. D.; AZIZKHAN-CLIFFORD, J. Sp1 and Kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. **Journal of Cellular Physiology**, v. 188, n. 2, p. 143-160, 2001.

BONDS, D. E. et al. The effect of conjugated equine oestrogen on diabetes incidence: the Women's Health Initiative randomised trial. **Diabetologia**, v. 49, n. 3, p. 459-468, 2006.

BOUWMAN, P.; PHILIPSEN, S. Regulation of the activity of Sp1- related transcription factors. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 195, p. 27-38, 2002.

BRIGGS, M. R. et al. Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. **Science**, v. 234, n. 4772, p. 47-52, 1986.

BRYANT, N. J.; GOVERS, R.; JAMES, D. E. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 3, n. 4, p. 267-77, 2002.

BROZINICK J. T. JR. et al. GLUT4 overexpression in db/db mice dose-dependently ameliorates diabetes but is not a lifelong cure. **Diabetes**, v. 50, n. 3, p. 593-600, 2001.

BUCHANAN, T. A. et al. Insulin sensitivity and B-cell responsiveness to glucose during late pregnancy in lean and moderately obese women with normal glucose tolerance or mild gestational diabetes. **Am J Obstet Gynecol.**, v. 162, n. 4, p.1008-1014, 1990.

BUNONE, G. et al. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. **The EMBO Journal**, v. 15, n. 9, p. 2174–2183, 1996.

CAMPBELL, R. A. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. **J Biol Chem.**, v. 276, n. 13, p. 9817-9824, 2001.

CAMPELLO, R. S. et al. Estrogen Receptor 1 Agonist PPT Stimulates *Slc2a4* Gene Expression and Improves Insulin-Induced Glucose Uptake in Adipocytes. **Curr Top Med Chem.**, v. 12, n. 19, p. 2059-69, 2012.

CAMPELLO, R. S. et al. Estradiol-induced regulation of GLUT4 in 3T3-L1 cells: involvement of ESR1 and AKT activation. **Journal Molecular Endocrinology**, v. 59, n. 3, p. 257-268, 2017.

CAWLEY, S. et al. Unbiased Mapping of Transcription Factor Binding Sites along Human Chromosomes 21 and 22 Points to Widespread Regulation of Noncoding RNAs. **Cell**, v. 116, n. 4, p. 499-509, 2004.

CASE, A.M.; REID, R.L. Menstrual cycle effects on common medical conditions. **Compr Ther.**, v. 27, n. 1, p. 65-71, 2001.

CASTRO-RIVERA, E.; SAMUDIO, I.; SAFE. S. Estrogen Regulation of Cyclin D1 Gene Expression in ZR-75 Breast Cancer Cells Involves Multiple Enhancer Elements. **J Biol Chem.**, v. 276, n. 33, p. 30853-30861, 2001.

CIARALDI, T.; HENRY, R. R. Thiazolidinediones and their effects on glucose transporters. **Eur J Endocrinol.**, v. 137, p. 610–612, 1997.

CHANG, E. C. et al. Estrogen receptors alpha and beta as determinants of gene expression: influence of ligand, dose, and chromatin binding. **Mol Endocrinol.**, v. 22, n.5, p. 1032-43, 2008.

CHEN, X. et al. The TGF- $\beta$ -induced up-regulation of NKG2DLs requires AKT/GSK-3 $\beta$ -mediated stabilization of SP1. **J Cell Mol Med.**, v. 21, n. 5, p. 860-870, 2017.

COOKE, P. S. et al. The role of estrogen and estrogen receptor-alpha in male adipose tissue. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 178, n. 1-2, p. 147-154, 2001.

CORRÊA-GIANNELLA, M. L.; MACHADO, U. F. SLC2A4 gene: a promising target for pharmacogenomics of insulin resistance. **Pharmacogenomics**, v. 14, n. 8, p. 847-850, 2013.

DeFRONZO, R. A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Med Clin N Am.**, v. 88, p. 787-835, 2004.

DIEUDONNÉ, M. N. et al. Evidence for functional estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in human adipose cells: regional specificities and regulation by estrogens. **Am. J. of Physiol. Cell Physiol.**, v. 286, n. 3, p. 655-661, 2004.

DYNAN, W. S.; TJIAN, R. The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. **Cell**, v. 35, p. 79-87, 1983.

DYNAN, W. S.; TJIAN, R. Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins. **Nature**, v. 316, p. 774-778, 1985.

DUNAIF, A. et al. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. **Diabetes**, v. 38, n. 9, 1165-1174, 1989.

FÁTIMA, L. A. et al. Estrogen receptor 1 (ESR1) regulates VEGFA in adipose tissue. **Scientific Reports**, 2017.

FISHER, C. R. et al. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, p. 6965-6970, 1998.

FURTADO, L. M. et al. Activation of the glucose transporter GLUT4 by insulin. **Biochem. Cell Biol.**, v. 80, n. 5, p. 569-578, 2002.

FURUYA, D. T. et al Identification of nuclear factor- $\kappa$ B sites in the Slc2a4 gene promoter. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 370, n. 1-2, p. 87-95, 2013.

GARFIN, D. E. Onde-dimensional gel electrophoresis. **Methods Enzymol.**, v. 182, p. 425-411, 1990.

GARRIDO, P. et al. 17 $\beta$ -estradiol activates glucose uptake via GLUT4 translocation and PI3K/Akt signaling pathway in MCF-7 cells. **Endocrinology**, v. 154, p. 1979-1989, 2013.

GRAVHOLT, C. H. et al. Lp(a) and lipids in adult Turner's syndrome: impact of treatment with 17 $\beta$ -estradiol and norethisterone. **Atherosclerosis**, v. 150, n. 1, p. 201-208, 2000.

GRAVHOLT, C, H. et al. Muscle fiber composition and capillary density in Turner syndrome: evidence of increased muscle fiber size related to insulin resistance. **Diabetes Care**. v. 24, n. 9, p. 1668-1673, 2001.

GODSLAND, I.F. Oestrogens and insulin secretion. **Diabetologia**. v. 48, n. 11, p. 2213-2220, 2005.

HALL, J. M.; McDONNELL, D. P. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. **Endocrinology**, v. 140, p. 5556-5578, 1999.

HANDGRAAF, S. et al. Prevention of Obesity and Insulin Resistance by Estrogens Requires ER $\alpha$  Activation Function-2 (ER $\alpha$ AF-2), Whereas ER $\alpha$ AF-1 Is Dispensable. **Diabetes**, v. 62, n. 12, p. 4098-4108, 2013.

HEINE, P. A. et al. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 97, n. 23, p. 12729-12734, 2000.

IGNOTZ, R. A.; MASSAGUÉ, J. Type beta transforming growth factor controls the adipogenic differentiation of 3T3 fibroblasts. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 82, n. 24, p. 8530-8534, 1985.

IM, S. S. et al. AHN, Y. H. Regulation of GLUT4 gene expression by SREBP-1c in adipocytes. **Biochemical Journal**, v. 399, n. 1, p. 131-139, 2006.

IM, S. S. et al. Regulation of glucose transporter type 4 isoform gene expression in muscle and adipocytes. **IUBMB Life**, v. 59, n. 3, p. 134-145, 2007.

JIANG, L. et al. ZBED6 modulates the transcription of myogenic genes in mouse myoblast cells. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e94187, 2014.

JONES, M. E. E. et al. Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 97, n. 23, p. 12735-12740, 2000.

JONES, M. E. E. et al. Aromatase-deficient (ArKO) mice accumulate excess adipose tissue. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 79, n. 1-5, p. 3-9, 2001.

KADONAGA, J. T. et al. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. **Cell**, v. 51, n. 6, p. 1079-1090, 1987.

KADONAGA J. T.; JONES, K.A.; TJIAN, R. Promoter-specific activation of RNA polymerase II transcription by Sp1. **Trends Biochem., Sci.**, v.11, n. 1, p. 20-23, 1986

KAESTNER, K. H.; CHRISTY, R. J.; LANE, M. D. Mouse insulin-responsive glucose transporter gene: characterization of the gene and trans-activation by the CCAAT/enhancer binding protein. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 87, p. 251-255, 1990.

KAAJA, R. J.; GREER, I. A. Manifestations of chronic disease during pregnancy. **Jama**, v. 294 n. 21, p. 2751-2757, 2005.

KANDA, N.; WATANABE, S. 17 $\beta$ -estradiol inhibits MCP-1 production in human keratinocytes. **J. Invest. Dermatol.**, v. 120, n. 6, p. 1058-1066, 2003.

KATO, S. et al. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. **Science**, v. 270, n. 5241, p. 1491-1494, 1995.

KAVARTHAPU, R.; DUFAU, M. L. Role of EGF/ERBB1 in the transcriptional regulation of the prolactin receptor independent of estrogen and prolactin in breast cancer cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 40, p. 65602-65613, 2016.

KEEMBIYEHETTY, C. N. et al. Paradoxical Regulation of Sp1 Transcription Factor by Glucagon. **Endocrinology**, v. 143, n. 4, p. 1512–1520, 2002.

KUIPER, G. G. J. M. et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors and  $\alpha$  and  $\beta$ . **Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 863-870, 1997.

KUMAR, A. et al. TGF- $\beta$  mediates suppression of adipogenesis by estradiol through connective tissue growth factor induction. **Endocrinology**, v. 143, n. 1, p. 254-263, 2012.

LEVIN, E. R.; HAMMES, S. R. Nuclear receptors outside the nucleus: extranuclear signalling by steroid receptors. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 12, p. 783-797, 2016.

LI, L. et al. Gene regulation by Sp1 and Sp3. **Biochem. Cell. Biol.**, v. 82, n. 4, p. 460-471, 2004.

LI, X. et al. Single-chain estrogen receptors (ERs) reveal that the ER $\alpha$ /beta heterodimer emulates functions of the ER $\alpha$  dimer in genomic estrogen signaling pathways. **Mol Cell Biol.**, v. 24, n. 17, p. 7681-7684, 2004.

LINDBERG, M. K. et al. Estrogen receptor (ER)-beta reduces ER $\alpha$ -regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ER $\alpha$  and ERbeta in mice. **Mol Endocrinol.**, v. 17, n. 2, p. 203-208, 2003.

MACHADO, U. F. Transportadores de glicose. Arq. Bras. **Endocrinol Metabo.**, v. 42, n. 6, p. 413-421, 1998.

MACHADO, UF. et al. Decreased glucose transporter (GLUT4) content in insulin-sensitive tissues of obese aurothioglucose - and monosodium glutamate-treated mice. **Horm Metab Res.**, v. 25, p. 462-465, 1993.

MANAVATHI, B.; KUMAR, R. Steering estrogen signals from the plasma membrane to the nucleus: two sides of the coin. **J Cell Physiol.**, v. 207, n.3, p. 594-604, 2006.

MARGOLIS, K. L. et al. Effect of oestrogen plus progestin on the incidence of diabetes in postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative Hormone Trial. **Diabetologia**, v. 47, n.7, p. 1175-1187, 2004.

MATTHEWS, J.; GUSTAFSSON J. A. Estrogen signaling: a subtle balance between ER  $\alpha$  and ER  $\beta$ . **Molecular Interventions**, v. 3, n.5, p. 281-292, 2003.

MAUVAIS-JARVIS, F.; CLEGG, D. J.; HEVENER, A. L. The Role of Estrogens in Control of Energy Balance and Glucose Homeostasis. **Endocrine Reviews**, v.34, n. 3, p. 309-338. 2013.

MERIKA, M.; ORKIN, S. H. Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Krüppel family proteins Sp1 and EKLf. **Mol Cell Biol.**, v. 15, n.5, p. 2437-2447, 1995.

NAGIRA, K. et al. Altered subcellular distribution of estrogen receptor alpha is implicated in estradiol-induced dual regulation of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. **Endocrinology**, v. 147, p. 1020-1028, 2006.

NILSSON, S. et al. Mechanisms of estrogen action. **Physiol. Rev.**, v. 81, n. 4, p. 1535-1565, 2001.

OKUNO, S. et al. Decreased expression of the GLUT4 glucose transporter protein in adipose tissue during pregnancy. **Horm Metab Res.**, v. 27, n. 5, p. 231-234, 1995.

PAECH, K. et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$  at AP1 sites. **Science**, v. 277, n. 5331, p. 1508–1510, 1997.

PAYNE, A. H.; BALES, D. B. Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway from Cholesterol to Active Steroid Hormones. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 6, p. 947-970, 2004.

PETTERSSON, K.; DELAUNAY, F.; GUSTAFSSON, JA. Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling. **Oncogene**, v. 19, n. 43, p. 4970-4978, 2000.

PHILIPSEN, S.; SUSKE, G. A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 15, p. 2991-3000, 1999.

PORTER, W. et al. Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. **Mol Endocrinol.**, v. 11, n. 11, p. 1569-1580, 1997.

ROCHIRA, V. et al. Oestradiol replacement treatment and glucose homeostasis in two men with congenital aromatase deficiency: evidence for a role of oestradiol and sex steroids imbalance on insulin sensitivity in men. **Diabet Med.**, v. 24, n. 12, p. 1491-1495, 2007.

ROMERO-CALVO I. et al. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. **Anal. Biochem.**, v. 401, n. 2, p. 318-320, 2010.

ROPERO, A. B. et al. The role of estrogen receptors in the control of energy and glucose homeostasis. **Steroids**, v. 73, n. 9-10, p. 874-879, 2008.

SALPETER, S. R. et al. Meta-analysis: effect of hormone-replacement therapy on components of the metabolic syndrome in postmenopausal women. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 8, p. 538-554, 2006.

SALVATORI, L. et al. Oestrogens and selective oestrogen receptor (ER) modulators regulate EGF receptor gene expression through human ER  $\alpha$  and  $\beta$  subtypes via an Sp1 site. **Oncogene**, v. 22, p. 4875–4881, 2003.

SAUCEDO, R. et al. Effect of estrogen therapy on insulin resistance and plasminogen activator inhibitor type 1 concentrations in postmenopausal women. **Gynecol Obstet Invest.**, v. 64, n. 2, p. 61-64, 2007.

SAVANGE, D. B.; PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. **Physiol. Rev.**, v. 87, n. 2, p. 507-520, 2007.

SAVILLE, B. et al. Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype ( $\alpha/\beta$ ) dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. **J Biol Chem.**, v. 275, n. 8, p. 5379-5387, 2000.

SCHANTON, M. et al. Sp1 transcription factor is a modulator of estradiol leptin induction in placental cells. **Placenta**, v. 57, p. 152-162, 2017.

SHEN, M.; SHI, H. Estradiol and Estrogen Receptor Agonists Oppose Oncogenic Actions of Leptin in HepG2 Cells. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, 2016.

SIMONCINI, T. et al. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. **Nature**, v. 407, n. 5241, p. 538-541, 2000.

SIMPSON, E. R. Sources of estrogen and their importance. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 86, p. 225-230, 2003.

SINDEREN, M. V. et al. Sexual dimorphism in the glucose homeostasis phenotype of the Aromatase Knockout (ArKO) mice. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 170, p. 39-48, 2017.

SOLOMON, C. G. et al. Long or highly irregular menstrual cycles as a marker for risk of type 2 diabetes mellitus. **Jama**, v. 286, n. 19, p. 2421-2426, 2001.

STENBIT, A. E. et al. GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. **Nat Med.**, v. 3, n. 10, p. 1096-1101, 1997.

SUSKE, G.; BRUFORD, E.; PHILIPSEN, S. Mammalian SP/KLF transcription factors: bring in the family. **Genomics**, v. 85, p. 551–556, 2005.

TAKEDA, K. et al. Progressive development of insulin resistance phenotype in male mice with complete aromatase (CYP19) deficiency. **J. Endocrinol.**, v. 176, n. 2, p. 237-246, 2003.

TAN, N. Y.; KHACHIGIAN, L. M. Sp1 Phosphorylation and Its Regulation of Gene Transcription. **Mol Cell Biol.**, v. 29, n. 10, p. 2483–2488, 2009.

THACKER, J. S. et al. Total protein or high-abundance protein: Which offers the best loading control for Western blotting?. **Anal Biochem.**, v. 1, n. 496, p. 76-78, 2016.



THAMMACHAROEN, S. et al. Divergent effects of estradiol and the estrogen receptor- $\alpha$  agonist PPT on eating and activation of PVN CRH neurons in ovariectomized rats and mice. **Brain Research**, v. 1268, p. 88-96, 2009.

VAN VLIET, J. et al. Human KLF17 is a new member of the Sp/KLF family of transcription factors. **Genomics**. v. 87, n.4, p. 474-482, 2006.

VIZCAÍNO, C.; MANSILLA, S.; PORTUGAL, J. Sp1 transcription factor: A long-standing target in cancer chemotherapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 152, p. 111-124, 2015.

VRTACNIK, P. et al. The many faces of estrogen signaling. **Biochemia Medica**, v. 24, n. 3, p. 329-342, 2014.

WIERSTRA, I. Sp1: Emerging roles - Beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 372 n. 1, p. 1-13, 2008.

WIIK, A. et al. Oestrogen receptor beta is expressed in adult human skeletal muscle both at the mRNA and protein level. **Acta Physiol Scand.**, v. 179, p. 381-387, 2003.

WILD, S. et al. Global Prevalency of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes care**, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Technical report: Definition and diagnosis of diabetes mellitus and impaired glycaemic regulation. Geneva: **OMS**, 2006.

YAMADA, K. et al. Expression of GLUT4 glucose transporter protein in adipose tissue and skeletal muscle from streptozotocin-induced diabetic pregnant rats. **Horm Metab Res.**, v. 31, n 9, p. 508-513, 1999.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 782-7, 2001.

ZWIJSEN, R. M. et al. Cdk-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. **Cell**, v. 88, p. 405-415, 1997