CAIO YOGI YONAMINE

O DIABETES MELLITUS INDUZ ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS NO GENE *SLC2A4* EM MÚSCULO ESQUELÉTICO QUE SE RELACIONAM COM A REPRESSÃO DO GENE, E QUE PODEM SER REVERTIDAS PELA INSULINOTERAPIA OU PELO RESVERATROL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

SÃO PAULO
2017

CAIO YOGI YONAMINE

O DIABETES MELLITUS INDUZ ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS NO GENE *SLC2A4* EM MÚSCULO ESQUELÉTICO QUE SE RELACIONAM COM A REPRESSÃO DO GENE, E QUE PODEM SER REVERTIDAS PELA INSULINOTERAPIA OU PELO RESVERATROL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado

Versão original

SÃO PAULO
2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

YONAMINE, CAIO YOGI
O DIABETES MELLITUS INDUZ ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS NO GENE SLC2A4 EM MÚSCULO ESQUELÉTICO QUE SE RELACIONAM COM A REPRESSÃO DO GENE, E QUE PODEM SER REVERTIDAS PELA INSULINOTERAPIA OU PELO RESVERATROL / CAIO YOGI YONAMINE; orientador UBIRATAN FABRES MACHADO. -- São Paulo, 2017.
136 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Diabetes Mellitus. 2. resveratrol. 3. epigenética. 4. acetilação/metilação de histona H3. 5. SIRT1. I. FABRES MACHADO, UBIRATAN, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): CAIO YOGI YONAMINE

Título da Tese: O Diabetes Mellitus induz alterações epigenéticas no gene *Slc2a4* em músculo esquelético que se relacionam com a repressão do gene, e que podem ser revertidas pela insulinoterapia ou pelo resveratrol.

Orientador(a): PROF. DR. UBIRATAN FABRES MACHADO

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

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

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

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

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

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011)

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 74 nas fls. 07 do livro 03 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeitos do tratamento com resveratrol e de contração muscular em parâmetros epigenéticos potencias moduladores da expressão do gene Slc2a4 em músculo de ratos saudáveis e diabéticos*" do qual participam o(s) aluno(s) Caio Yogi Yonamine e as Especialistas de Laboratório Maristela M.Okamoto, Helayne Soares de Freitas, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em 18/06/2013, **com validade de 4 (três) anos.**

São Paulo, 18 de Junho de 2013.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador CEUA – ICB/USP

Profa. Dra. Ana Paula Lepique
Secretária CEUA – ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **004** nas fls.**028** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a **Ubiratan Fabres Machado,** Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeitos do resveratrol em camundongos MSC*" do qual participam o(s) aluno(s) **Caio Yogi Yonamine,** Iniciação Científica **Maria Luiza Esrimo Michalani, Erika Pinheiro Machado,** Especialista de Laboratório **Helayne Soares de Freitas,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **10.02.2015, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 23 de fevereiro de 2015.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador- CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedico este trabalho à minha família e colegas/amigos que me acompanharam e incentivaram durante mais uma etapa de minha formação.

AGRADECIMENTOS

Sou muitíssimo grato ao meu orientador, prof. Ubiratan Fabres Machado, que abriu as portas de seu laboratório, me orientou de forma plena e responsável, e me ensinou muitas coisas que possibilitaram o meu desenvolvimento e o desfecho de uma etapa importante de minha formação.

Agradeço aos meus pais pelo apoio, incentivo e orientação que foram essenciais para a realização das diversas etapas de minha vida. Agradeço também ao meu irmão e à Bia pela companhia e incentivo a ir sempre adiante.

Agradeço a todos os meus colegas, parentes e amigos. Em particular ao pessoal do laboratório (Maris, Helayne, João V., João Bahia, Zé, Malu, Erika, Ana Bárbara, Rosana, Luciana, Danilo, Raquel, Dani) pela auxílio nas diversas tarefas dentro e fora da bancada de laboratório; pela companhia, onde floresceram amizades e que de alguma maneira também foram essenciais para que eu pudesse concluir esse passo fundamental de meu desenvolvimento acadêmico.

Agradeço aos membros da banca pelo aceite do convite para avaliar o presente trabalho, e aos meus colaboradores, em especial, ao prof. Daniel Giannella e profa. Maria Lúcia Giannella, que recentemente contribuíram bastante para a elaboração e finalização de um artigo derivado desta Tese.

Agradeço ao Zé Maria e a Paloma pelo auxilío em todos os trâmites burocráticos, e ao pessoal da biblioteca pela orientação na etapa final de normalização técnica.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq), #142187/2013-5 pelo apoio financeiro para execução dos experimentos e conclusão da Tese.

“A persistência é o menor caminho do êxito”.
(Charles Chaplin)

RESUMO

YONAMINE, C. Y. **O Diabetes Mellitus induz alterações epigenéticas no gene *slc2a4* em músculo esquelético que se relacionam com a repressão do gene, e que podem ser revertidas pela insulinoterapia ou pelo resveratrol.** 2017. 136 f., Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A principal característica do diabetes mellitus (DM) é a perda da homeostasia glicêmica. Nesse processo, o músculo esquelético desempenha papel chave, visto que é responsável por aproximadamente 75% do clareamento da glicose extracelular; e, para tal, a adequada expressão do transportador de glicose GLUT4 (codificado pelo gene *Slc2a4*) é fundamental. Tanto no DM1 como no DM2 observa-se uma redução da expressão do gene *Slc2a4*, o que, junto com outros mecanismos fisiopatológicos, contribui para a perda do controle glicêmico. A investigação de mecanismos que regulem a expressão desse gene pode servir de base para o desenvolvimento de estratégias preventivas e/ou terapêuticas para o DM. Regulações epigenéticas do *Slc2a4*, como a acetilação e a trimetilação de histona H3 (H3KAc e H3K9me3, respectivamente), nunca foram investigadas no DM; e o resveratrol, sugerido como sensibilizador da insulina, poderia modular essas regulações, pois é um ativador da desacetilase sirtuína 1 (SIRT1). Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar em ratos DM1 (por estreptozotocina) tratados com insulina e em camundongos DM2 (por glutamato monossódico) o efeito do tratamento com resveratrol sobre a homeostasia glicêmica, a expressão de *Slc2a4*/GLUT4 em músculo esquelético, a regulação epigenética do *Slc2a4*, e a possível participação da SIRT1. Observou-se que o tratamento crônico com resveratrol melhorou a homeostasia glicêmica no DM1 tratado com insulina e, isoladamente, no DM2. Apesar disso, a expressão do gene *Slc2a4* no músculo esquelético foi modulada pelo resveratrol apenas no DM2, indicando que no DM1 tratado com insulina outros territórios participaram da melhora do controle glicêmico. Em todas as condições experimentais, a metilação de citosinas em sítios CCGG do promotor do gene *Slc2a4* mostrou-se pouco alterada, sem contribuir para explicar as alterações de expressão de *Slc2a4*. Por outro lado, ensaios de imunoprecipitação de cromatina evidenciaram importantes alterações na modulação pós-traducional (PTM) de histonas H3. No DM1, houve redução de H3KAc e aumento de H3K9me3 em região promotora estimuladora da transcrição do gene *Slc2a4*, e ambas as alterações foram revertidas com a insulinoterapia. Esses resultados estão em pleno acordo com as regulações de expressão do *Slc2a4* observadas. No DM1 tratado com insulina a adição do resverarol não alterou a expressão do *Slc2a4*; e, portanto, regulações epigenéticas não foram investigadas nessa condição. No DM2 observou-se redução no conteúdo de H3K9me3 no promotor do *Slc2a4*, e isso reverteu após tratamento com resveratrol; efeitos que podem explicar as alterações da expressão do gene *Slc2a4* observadas. Adicionalmente, verificou-se que o conteúdo de SIRT1 nuclear: 1) aumentou nos animais DM1 e reduziu com a insulinoterapia, e 2) aumentou nos animais DM2 tratados com resveratrol, indicando que a maquinaria epigenética reguladora da expressão do gene *Slc2a4* é, pelo menos parcialmente, regulada pela SIRT1. Em suma, o presente estudo revela a ocorrência de regulações epigenéticas no gene *Slc2a4* em músculo de animais diabéticos, com destaque para as PTMs de histona H3; além disso, mostra que o tratamento com resveratrol modula algumas dessas alterações, melhorando o controle glicêmico. Esses resultados apoiam o resveratrol como um sensibilizador da insulina, e constroem bases para o desenvolvimento de terapias epigenéticas para o DM.

Palavras-chave: diabetes mellitus. resveratrol. epigenética. acetilação de histona H3. trimetilação de histona H3. SIRT1.

ABSTRACT

YONAMINE, C. Y. **Diabetes Mellitus induces epigenetic alterations in the *slc2a4* gene in skeletal muscle that relate to gene repression and can be reversed by insulinotherapy or resveratrol.** 2017. 136 p., Ph.D. thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The main characteristic of diabetes mellitus (DM) is the loss of glycemic homeostasis. In this process, skeletal muscle plays a key role, since it accounts for approximately 75% of glucose uptake and, for this, the maintenance expression of the GLUT4 glucose transporter (encoded by the *Slc2a4* gene) is fundamental. In both DM1 and DM2, is observed a reduction in the expression of the *Slc2a4* gene, which, along with other pathophysiological mechanisms, contributes to the loss of glycemic control. The investigation of mechanisms that regulate the expression of this gene can serve as a basis for the development of preventive and/or therapeutic strategies for DM. Epigenetic regulations of *Slc2a4*, such as histone H3 acetylation and trimethylation (H3KAc and H3K9me3, respectively), have never been investigated in DM; and resveratrol, suggested as an insulin sensitizer, could modulate these regulations, as it is an activator of the deacetylase sirtuin 1 (SIRT1). Thus, the present study aimed to evaluate in DM1 rats (by streptozotocin) treated with insulin and in DM2 mice (by monosodium glutamate) the effect of resveratrol treatment on glycemic homeostasis, *Slc2a4* / GLUT4 expression in skeletal muscle, the epigenetic regulation of *Slc2a4*, and the possible participation of SIRT1. It was observed that chronic treatment with resveratrol improved glycemic homeostasis in insulin-treated DM1 and, alone, in DM2. Despite this, the expression of the *Slc2a4* gene in skeletal muscle was modulated by resveratrol only in DM2, indicating that in DM1 treated with insulin other territories participated in the improvement of glycemic control. In all experimental conditions, methylation of cytosines at CCGG sites located in *Slc2a4* gene promoter region has been shown to be slightly altered, without contributing to explain the changes in Slc2a4 expression. On the other hand, chromatin immunoprecipitation assays evinced important changes in post-translational modulation (PTM) of histone H3. In DM1, there was a reduction of H3KAc and an increase of H3K9me3 at stimulatory segment of transcription in promoter region of *Slc2a4* gene, and both alterations were reversed with the insulin therapy. These results are in full agreement with the observed *Slc2a4* expression settings. In DM1 treated with insulin the addition of resveratrol did not alter the expression of *Slc2a4*; and, therefore, epigenetic adjustments were not investigated in this condition. In DM2 a reduction in the content of H3K9me3 in the *Slc2a4* promoter was observed, and this reversed after treatment with resveratrol; effects that may explain changes in *Slc2a4* gene expression observed. Additionally, the nuclear SIRT1 content: 1) increased in the DM1 animals and reduced with insulin therapy, and 2) increased in the DM2 animals treated with resveratrol, indicating that the epigenetic machinery regulating the expression of the *Slc2a4* gene is, at least partially, regulated by SIRT1. In summary, the present study reveals the occurrence of epigenetic regulation in the *Slc2a4* gene in muscle of diabetic animals, with emphasis on histone H3 PTMs; furthermore, it shows that resveratrol treatment modulates some of these changes, improving glycemic control. These results support resveratrol as an insulin sensitizer, and build bases for the development of epigenetic therapies for DM.

Keywords: Diabetes mellitus. resveratrol. *Slc2a4*. GLUT4. epigenetic. Histone H3 methylation. Histone H3 acetylation. SIRT1.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática da reação de metilação da citosina envolvendo a doação do grupamento metil da S-adenosilmetionina (SAM) catalisada pelas DNMT1, 3a ou 3b..... 25

Figura 2 - Representação esquemática das fórmulas químicas estruturais dos intermediários formados ao longo do processo de desmetilação do DNA envolvendo reações de oxidação catalisada pelas enzimas TET. 26

Figura 3- Estrutura química do trans-resveratrol e do cis-resveratrol. 31

Figura 4 - Camundongos CD1 com 6 meses e 3 semanas de idade. Em (A) não tratado com MSG e em (B) tratado com MSG, e portador de diabetes tipo 2. 52

Figura 5 - Em A, evolução do peso corporal durante o período de tratamento com resveratrol. Os valores representados foram dias 0, 20, 40 e 60. Valores expressos como média ± erro padrão da média (n=10), comparados por Análise de Variância (ANOVA) de 2 vias e pós-teste Bonferroni. Em B, gráfico da área sob a curva. *P<0.05 e ***P<0.001 vs. ND. 52

Figura 6 - Expressão do gene Slc2a4 dos ratos não diabéticos (ND), diabéticos tipo 1 (DM1), diabéticos tipo 1 tratados com insulina (DM1 I) e diabéticos tipo 1 tratados com insulina e resveratrol (DM1 IR). O gene de referência utilizado foi o beta-2- microglobulina (B2m). Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=6). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. ***P<0.001vs. ND, ##P<0.01 e ###P<0.001 vs. DM1. 55

Figura 7 - Expressão do gene Slc2a4 no músculo gastrocnêmio de camundongos não diabéticos (ND), diabéticos tipo 2 (DM2) e diabéticos tipo 2 tratados com resveratrol (DM2 R). Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=7). Foi utilizado o gene de referência utilizado foi a subunidade beta do complexo mitocondrial F1, transportador H^+, da ATP sintase (Atp5b). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. *P<0.05, ***P<0.001 vs. ND e ##P<0.01 vs. DM2. 55

Figura 8 - Expressão de GLUT4 total nos animais não diabéticos (ND), diabéticos tipo 1 (DM1), diabéticos tipo 1 tratados com insulina (DM1 I) e diabéticos tipo 1 tratados com insulina e resveratrol (DM1 IR). A imagem de Ponceau foi utilizada para a normalização da análise. Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=6). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. *P<0.05 vs. ND; ##P<0.01 vs. DM1. 56

Figura 9 - Expressão proteica total de GLUT4 no músculo gastrocnêmio de animais não diabéticos (ND), diabéticos tipo 2 (DM2) e diabéticos tipo 2 tratados com resveratrol (DM2 R). A imagem de Ponceau foi utilizada para a normalização da análise. Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=6). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. *P<0.05 vs. ND; #P<0.05 vs. DM2. 56

Figura 10 - Porcentagem de metilação do DNA na região promotora do gene Slc2a4, na sequência 5' CCGG 3' localizada na posição -483/-480 relativa a primeira base da região 5`UTR (+1), em músculo sóleo de ratos não diabéticos (ND), diabéticos tipo 1 (DM1) e diabéticos tipo 1 tratados com insulina (DM1 I). Valores expressos em média ± erro padrão da

média (n=7). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. 57

Figura 11 - Porcentagem de metilação do DNA na região promotora do gene Slc2a4, na sequência 5' CCGG 3' localizada na posição -534/-531 relativa a primeira base da região 5`UTR (+1), em músculo sóleo de ratos não diabéticos (ND), diabéticos tipo 1 (DM1) e diabéticos tipo 1 tratados com insulina (DM1 I). Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=7). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. 57

Figura 12 - Porcentagem de metilação do DNA na região promotora do gene Slc2a4, na sequência 5' CCGG 3' localizada na posição -781/-778 relativa a primeira base da região 5`UTR (+1), em músculo sóleo de ratos não diabéticos (ND), diabéticos tipo 1 (DM1) e diabéticos tipo 1 tratados com insulina (DM1 I). Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=7). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. *P<0.05 vs. ND. 58

Figura 13 - Porcentagem de metilação do DNA na região promotora do gene Slc2a4, nas sequências 5' CCGG 3' localizadas nas posições –483/-480 e -432/-429 relativa a primeira base da região 5`UTR (+1), em músculo gastrocnêmio de ratos não diabéticos (ND), diabéticos tipo 2 (DM2) e diabéticos tipo 2 tratados com resveratrol (DM2 R). Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=7). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. *P<0.05 vs. ND. 59

Figura 14 - Em A, % relativa ao input entre a amostra mock e o grupo de animais não diabéticos (ND). Em B, conteúdo relativo de histona H3 acetilada (K9+14+18+23+27) na região -670/-461 do promotor do gene Slc2a4 em músculo sóleo de ratos não diabéticos (ND), diabéticos tipo 1 não tratado (DM1) e diabéticos tipo 1 tratados com insulina (DM1 I). Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=4). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. *P<0.05 vs. ND. 60

Figura 15 - Em A, % relativa ao input entre a amostra mock e o grupo de animais não diabéticos (ND). Em B, conteúdo relativo de histona H3 trimetilada na posição lisina 9 na região -670/-461 do promotor do gene Slc2a4 em músculo sóleo de ratos não diabéticos (ND), diabéticos tipo 1 não tratado (DM1) e diabéticos tipo 1 tratados com insulina (DM1 I). Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=4). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. *P<0.05 vs. ND e ##P<0.01 vs. DM1. 61

Figura 16 - Em A, % relativa ao input entre a amostra mock e o grupo de animais não diabéticos (ND). Em B, conteúdo relativo de MEF2A/D na região -670/-461 do promotor do gene Slc2a4 em músculo sóleo de ratos não diabéticos (ND), diabéticos tipo 1 não tratado (DM1) e diabéticos tipo 1 tratados com insulina (DM1 I). Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=4). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. *P<0.05 vs. ND e #P<0.05 vs. DM1. 62

Figura 17 - Em A, % relativa ao input entre a amostra mock e H3 acetilada (K9+14+18+23+27) na região -498 a -298 do promotor do gene Slc2a4 em músculo gastrocnêmio de camundongos não diabéticos (ND). Valores expressos em % relativa ao input ± erro padrão da média. Em B, conteúdo de histona H3 acetilada (K9+14+18+23+27) na região -498 a -298 do promotor do gene Slc2a4 em músculo gastrocnêmio de camundongos

não diabéticos (ND), diabéticos tipo 2 (DM2) e diabéticos tipo 2 tratados com resveratrol (DM2 R). Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=4). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. **P<0.01 vs. ND. 63

Figura 18 - Em A, % relativa ao input entre a amostra mock e H3K9me3 na região -498 a -298 do promotor do gene Slc2a4 em músculo gastrocnêmio de camundongos não diabéticos (ND). Valores expressos em % relativa ao input ± erro padrão da média. Em B, conteúdo de histona H3K9me3 na região -498 a -298 do promotor do gene Slc2a4 em músculo gastrocnêmio de camundongos não diabéticos (ND), diabéticos tipo 2 (DM2) e diabéticos tipo 2 tratados com resveratrol (DM2 R). Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=4). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. **P<0.01 vs. ND, ###P<0.001 vs. DM2. 64

Figura 19 - Conteúdo nuclear (A) e citosólico (B) de SIRT1 em amostras de músculo sóleo de animais não diabéticos (ND), diabéticos não tratado (DM1), diabéticos tipo 1 tratados com insulina (DM1 I) e diabéticos tipo 1 tratados com insulina e resveratrol (DM1 IR). A imagem de Ponceau foi utilizada para a normalização da análise. Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=7). *P<0.05 vs. ND; ##P<0.01 vs. DM1, &P<0.05 vs. todos os grupos. 65

Figura 20 - Conteúdo nuclear (A) e citosóico (B) de SIRT1 em amostras de músculo gastrocnêmio de animais não diabéticos (ND), diabéticos tipo2 (DM2), diabéticos tipo 2 tratados com resveratrol (DM2 R). A imagem de Ponceau foi utilizada para a normalização da análise. Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=5 para nuclear e n=4 para citosólica). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. &P<0.05 vs. todos os grupos. 66

Figura 21 - Conteúdo de AMPK total (A) e fosforilado (B) em músculo de ratos não diabéticos (ND), diabéticos tipo 1 não tratado (DM1), diabéticos tipo 1 tratados com insulina (DM1 I) e diabéticos tipo 1 tratados com insulina e resveratrol (DM1 IR). A imagem de Ponceau foi utilizada para a normalização da análise. Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=7). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls.**P<0.01 vs. ND; #P<0.05 vs. DM1. 67

Figura 22 - Expressão de AMPK α2 total (A) e fosforilada (B) em músculo gastrocnêmio de camundongos não diabéticos (ND), diabéticos tipo 2 (DM2) e diabéticos tipo 2 tratados com resveratrol (DM2 R). A imagem de Ponceau foi utilizada para a normalização da análise. Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=5). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. *P<0.05 vs. ND. 68

Figura 23 - Em A, DNA genômico obtido de músculo sóleo de rato. Em B, DNA genômico obtido de músculo gastrocnêmio de camundongo. 98

Figura 24 - Imagem de gel de agarose representando a eficiência da digestão das enzimas HpaII e MspI. Faixa 1: pUC 19 não metilada sem enzima; Faixa 2: pUC 19 não metilada + HpaII; Faixa 3: pUC 19 não metilada + MspI; Faixa 4: pUC 19 metilada sem enzima; Faixa 5: pUC 19 metilada + HpaII; Faixa 6: pUC 19 metilada + MspI. 99

Figura 25 - Em negrito estão destacadas as sequências 5`CCGG 3` analisadas, sublinhado estão destacadas as posições de alinhamento dos pares de iniciadores da reação de PCR em

tempo real. Em letra vermelha está representada a região 5`UTR e o ATG (primeiro códon). 101

Figura 26 - Em negrito estão destacadas as sequências 5`CCGG 3` analisadas, sublinhado estão destacadas as posições de alinhamento dos pares de iniciadores da reação de PCR em tempo real. Em letra vermelha está representada a região 5`UTR e o ATG (primeiro códon). 103

Figura 27 - Cromatina sonicada em diferentes quantidades de pulso..... 104

Figura 28 - Em negrito está destacada as posições de alinhamento dos pares de iniciadores da reação de PCR em tempo real após ensaio de imunoprecipitação da cromatina com os anticorpos H3K9me3, H3 Ac e MEF2. Em letra vermelha está representada a região 5`UTR e o ATG (primeiro códon). 105

Figura 29 - Em negrito está destacada as posições de alinhamento dos pares de iniciadores da reação de PCR em tempo real após ensaio de imunoprecipitação da cromatina com os anticorpos H3K9me3, H3 Ac e MEF2. Em letra vermelha está representada a região 5`UTR e o ATG (primeiro códon). 107

Figura 30 - Em negrito está destacada a sequência 5`CCGG 3`, sublinhado estão destacadas as posições dos sítios de ligação dos fatores NF-1 e O/E-1 descritos na literatura. 108

Figura 31 - Conteúdo de mRNA de genes Nfib (A) e Ebf-1 (B) de ratos não diabéticos (ND), diabéticos tipo 1 (DM1) e diabéticos tipo 1 tratados com insulina (DM1 I). Valores expressos porcentagem relativa ao input ± erro padrão médio (n=5). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. *P<0.05 vs. ND e #P<0.05 vs. DM1. 108

Figura 32 - Conteúdo de mRNA de genes associados à resposta pró-inflamatória. Em (A) Il-6, (B) Tnf, (C) Rela e (D) Nfkb1, de tecido adiposo periepididimal de camundongos não diabéticos (ND), diabéticos tipo 2 (DM2) e diabéticos tipo 2 tratados com resveratrol (DM2 R). Valores expressos porcentagem relativa ao input ± erro padrão médio (n=5). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. *P<0.05, **P<0.01 e ***P<0.001 vs. ND e #P<0.05 vs. DM2..... 110

Quadro 1 - Resumo de resultados de expressão Slc2a4 e de alterações epigenéticas. 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Detalhes dos parâmetros dos principais algoritmos de identificação de ilhas CpG. 27

Tabela 2 - Detalhes dos iniciadores e sondas para ratos e camundongos utilizadas no qPCR. 42

Tabela 3 - Detalhes dos anticorpos utilizados no Western blotting. 44

Tabela 4 - Sequências dos iniciadores utilizados no PCR e respectivas localizações das sequências 5'CCGG 3' no promotor do gene Slc2a4 de rato. 46

Tabela 5 - Sequências dos iniciadores utilizados no PCR e respectivas localizações das sequências 5'CCGG 3' no promotor do gene Slc2a4 de camundongo. 46

Tabela 6 - Detalhes dos anticorpos utilizados no ensaio de imunoprecipitação da cromatina. 48

Tabela 7 - Sequências dos iniciadores que amplificam a região -670 a -461 da região promotora do gene Slc2a4 de rato. 48

Tabela 8 - Sequências dos iniciadores que amplificam a região -497 a -288 da região promotora do gene Slc2a4 de camundongo. 48

Tabela 9 - Dados morfométricos e metabólicos de ratos diabéticos tratados após 30 dias de tratamento com insulina e insulina com resveratrol. 50

Tabela 10 - Dados morfométricos e metabólicos dos camundongos após 60 dias de tratamento com resveratrol. 51

Tabela 11 - Consumo alimentar e hídrico dos camundongos. 54

Tabela 12 - Sequências dos iniciadores utilizados no qPCR e tamanho do amplicon. 109

Tabela 13 - Sequências dos iniciadores utilizados no qPCR. 111

LISTA DE ABREVIATURAS

AHR	*aryl hydrocarbon receptor*
AKT	*RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*
AMPK	*5'-AMP-activated protein kinase*
ANOVA	análise de variância
ATGL	*Adipose triglyceride lipase*
ATP	trifosfato de adenosina
Atp5b	subunidade beta do complexo mitocondrial F1, transportador H^+, da ATP sintase
B2m	Beta-2-microglobulina
CAMKII	*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit gamma*
cDNA	DNA complementar
Ct	*cycle threshold*
CEBPA	*CCAAT/enhancer-binding protein alpha*
Cebpa	*CCAAT/enhancer binding protein alpha*
ChIP	Imunoprecipitação da cromatina
CpGi	Ilha Citosina-Guanina
Dgat-1	*Diacylglycerol O-acyltransferase 1*
DM1	diabetes mellitus tipo 1
DM2	diabetes mellitus tipo 2
DM1 I	diabético tipo 1 tratado com insulina
DM1 IR	diabético tipo 1 tratado com insulina e resveratrol
DM2 R	diabético tipo 2 tratado com resveratrol
DMSO	dimetilsulfóxido
DNMT	DNA metiltransferase
DTT	*dithiothreitol*
Ebf-1	*early B-cell factor 1*
ECL	*enhanced chemiluminescence*
EDTA	*Ethylenediamine tetraacetic acid*
ELISA	*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
FoxO	*Forkhead box protein O*
Gapdh	*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
GHRH	*growth hormone releasing-hormone*
GLUT4	*Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4*
G6pc	*glucose-6-phosphatase catalytic subunit*
H3KAc	acetilação da cauda peptídica N-terminal de histona H3
H3K9me3	trimetilação no resíduo lisina localizado na posição 9 da cauda peptídica N-terminal de histona H3
H3K4me	metilação no resíduo lisina localizado na posição 4 da cauda peptídica N-terminal de histona H3
H4K16me	metilação na lisina 16 da histona H4
HDAC	histona desacetilase
HIF1A	*hypoxia inducible factor 1 alpha*
ITT	*Insulin tolerance test*
Il-6	*interleukin 6*
i.v.	intravenosa

KCl	cloreto de potássio
KH_2PO_4	Fosfato monopotássico
KOH	hidróxido de potássio
LKB1	*Serine/threonine-protein kinase STK11*
LiCl	cloreto de lítio
Lipe	*lipase E, hormone sensitive type*
MEF2	*myocyte-specific enhancer factor 2*
$MgCl_2$	cloreto de magnésio
mRNA	RNA mensageiro
MSG	glutamato monosódico
MyoD	*Myoblast determination protein 1*
Na_2HPO_4	Fosfato dissódico
NaCl	cloreto de sódio
$NaHCO_3$	bicarbonato de sódio
ND	não diabético
NF-1	*Nuclear factor 1*
Nfib	*nuclear factor I B*
NFKB	*nuclear factor kappa-B*
Nfkb1	*nuclear factor kappa B subunit 1*
O/E-1	*Transcription factor COE1*
pb	pares de base
PBS	*phosphate buffer saline*
Pck1	*phosphoenolpyruvate carboxykinase 1*
PDK4	*pyruvate dehydrogenase kinase 4*
PGC-1-alfa	*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*
PI3K	*Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase*
PMSF	*phenylmethane sulfonyl fluoride*
PTM	*Post translational modification*
PPARG	*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*
Pparg	*peroxisome proliferator activated receptor gamma*
PPARGC1A	*PPARG coactivator 1 alpha*
PPARD	*peroxisome proliferator activated receptor delta*
p50	*Transcription factor p50*
p53	*Cellular tumor antigen p53*
p65	*Transcription factor p65*
qPCR	*quantitative real-time PCR*
Rela	*RELA proto-oncogene, NF-kB subunit*
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SDS	*Sodium Duodecyl Sulphate*
SDS-PAGE	*Sodium Duodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
SGLT2	*Sodium/glucose cotransporter 2*
Slc2a4	*solute carrier family 2 member 4*
Snf-1	*Carbon catabolite-derepressing protein kinase*
SP1	*Transcription factor Sp1*
SUV39H1	*Histone-lysine N-methyltransferase SUV39H1*
SIRT1	*NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-1*
TE	tampão EDTA

TET	*Ten eleven translocation*
Tnf	*tumor necrosis factor*
TR	*thyroid hormone receptor*
5`UTR	5` *untranslated region*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **22**
2 JUSTIFICATIVA **37**
3 OBJETIVO **38**
3.1 Estratégias experimentais **38**
4 MATERIAIS E MÉTODOS **39**
4.1 Obtenção de ratos portadores de diabetes mellitus tipo 1 (DM1) **39**
4.2 Obtenção de camundongos portadores de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) **39**
4.3 Avaliação do estado diabético **40**
4.4 Teste de tolerância à insulina **40**
4.5 Eutanásia e coleta dos tecidos **41**
4.6 Dosagens plasmáticas de insulina, frutosamina, colesterol e triglicérides **41**
4.7 Avaliação da expressão do gene *Slc2a4* por PCR em tempo real (qPCR) **41**
4.8 Avaliação da expressão proteica de GLUT4, AMPK (total e fosforilada) e SIRT1 (citosólica e nuclear) por Western blotting **42**
4.8.1 Método de extração de fração de proteína celular total **42**
4.8.2 Método de extração de fração enriquecida em proteína citosólica ou nuclear **43**
4.8.3 Western blotting **43**
4.9 Avaliação da metilação de citosinas do DNA na região promotora do gene *Slc2a4* **44**
4.9.1 Extração de DNA genômico **44**
4.9.2 Digestão do DNA com enzimas de restrição **45**
4.9.3 Desenho dos iniciadores e PCR em tempo real **45**
4.10 Imunoprecipitação da cromatina **47**
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA **49**
6 RESULTADOS **50**
6.1 Dados morfométricos e metabólicos dos ratos portadores de DM1 ..... **50**
6.2 Dados morfométricos e metabólicos dos camundongos portadores de DM2 ..... **51**
6.3 Consumo alimentar e hídrico dos camundongos portadores de DM2 ..... **54**
6.4 Avaliação da expressão do gene *Slc2a4* por PCR em tempo real **55**
6.5 Avaliação do conteúdo total de proteína GLUT4 ..... **56**
6.6 Avaliação do grau de metilação no DNA na região promotora do gene *Slc2a4* em músculo de rato DM1 ..... **57**
6.7 Avaliação do grau de metilação no DNA na região promotora do gene *Slc2a4* em músculo de camundongo DM2 ..... **59**

6.8 Avaliação do conteúdo de H3 acetilada e metilada na região -670/-461 do promotor do gene *Slc2a4* de rato DM1 60

6.9 Avaliação da ligação do MEF2D na região promotora do gene *Slc2a4* de rato DM1 62

6.10 Avaliação do conteúdo de H3 acetilada e metilada na região -498/-298 do promotor do gene *Slc2a4* de camundongo DM2 63

6.11 Avaliação do conteúdo de SIRT1 nuclear e citosólica em músculo de rato DM1 65

6.12 Avaliação do conteúdo de SIRT1 nuclear e citosólica em músculo de camundongo DM2 66

6.13 Avaliação da expressão da proteína AMPK em músculo de rato DM1 67

6.14 Avaliação da expressão da proteína AMPK em músculo de camundongo DM2 68

7 DISCUSSÃO 70

8 CONCLUSÃO 82

REFERÊNCIAS* 83

APÊNDICE 98

A - Gel de verificação de integridade do DNA e eficiência de digestão enzimática 98

B - Esquematização da localização das sequências CCGG e dos iniciadores para reação da PCR. 100

C - Gel de verificação da sonicação da cromatina 104

D - Esquematização da localização dos iniciadores para reação da PCR após ensaio de imunoprecipitação da cromatina 105

E - Esquematização de um fragmento da região promotora do gene *Slc2a4* destacando sítios de ligação dos fatores NF-1 e O/E-1 108

F - Avaliação do conteúdo de mRNA dos genes *Il-6, Tnf, Rela e Nfkb1* no tecido adiposo periepididimal por PCR em tempo real (SYBR Green) 110

ANEXO 112

1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica caracterizada principalmente pela perda da homeostasia glicêmica. Conforme a etiologia, o DM pode ser classificado em tipos 1 e 2 (DM1 e DM2). O DM1 tem como causa primária a destruição autoimune das células B das ilhotas pancreáticas, acarretando ausência de produção e secreção de insulina; enquanto a causa primária do DM2 é a resistência periférica à ação da insulina. Independentemente da causa do DM, a hiperglicemia é a principal característica fisiopatológica, e é responsável direta ou indiretamente pelo aparecimento de diversas complicações crônicas que acometem vários territórios alvos (COLEMAN et al., 2015).

Conforme os últimos dados publicados pela Federação Internacional do Diabetes, estima-se que no Brasil haja aproximadamente 14 milhões de indivíduos diabéticos e, em 2040, esse número subirá para aproximadamente 23 milhões. Esses dados *per se* contextualizam a importância epidemiológica de estudar o diabetes no intuito de reduzir o avanço de sua incidência.

A compreensão do DM exige explorar as consequências que a ausência do hormônio insulina ou a deficiência de sua ação provocam na homeostasia glicêmica. A insulina atua por meio da interação com seu receptor do tipo tirosina cinase, localizado na membrana plasmática, ativando vias de sinalização intracelulares, como a PI3K/AKT que estimula a translocação de vesículas contendo a isoforma 4 dos transportadores de glicose (GLUT4) do citosol para a membrana plasmática em músculo esquelético e cardíaco, e em tecido adiposo branco e marrom (ZIERATH; KROOK; WALLBERG-HENRIKSSON, 2000). Além disso, a ação da insulina é capaz de estimular a maquinaria de expressão do gene *Slc2a4* (solute carrier family 2 member 4), responsável pela codificação da proteína GLUT4 (MORAES et al., 2014). Importante salientar que a manutenção adequada do conteúdo proteico de GLUT4 nas vesículas é crucial para o processo de captação de glicose, uma vez que determina a quantidade absoluta de transportadores translocados à membrana plasmática (CORRÊA-GIANNELLA; MACHADO, 2013). Essas informações contextualizam os fundamentos básicos da captação de glicose pelo músculo esquelético, cuja alteração participa da fisiopatologia do DM. Com base nisso, muitos estudos focaram em aprofundar os conhecimentos acerca dos mecanismos regulatórios da expressão do gene *Slc2a4* nesse território (CORRÊA-GIANNELLA; MACHADO, 2013).

O músculo esquelético é responsável, em condições fisiológicas, por aproximadamente 75% do total de clareamento de glicose da circulação sanguínea (KOISTINEN; ZIERATH, 2002; ZIERATH et al., 2000). No DM, observa-se uma redução na captação de glicose, que

envolve menor expressão/translocação de GLUT4, principalmente no músculo esquelético, contribuindo para a sustentação da hiperglicemia. A manutenção de níveis adequados de expressão de GLUT4 no músculo esquelético é, portanto, elemento chave no controle da homeostasia glicêmica, incluindo prevenção e tratamento da resistência à insulina, condição presente no DM (CORRÊA-GIANNELLA; MACHADO, 2013; OKAMOTO et al., 2011).

O desenvolvimento de técnicas de manipulação genética permitiu a caracterização das consequências diretas da superexpressão ou repressão do gene *Slc2a4* sobre a homeostasia glicêmica. Tsao e colaboradores (1999) demonstraram que camundongos com deleção heterozigótica do gene *Slc2a4* em músculo esquelético desenvolvem um quadro de resistência à ação da insulina, enquanto a normalização da expressão nesses mesmos animais recupera a sensibilidade normal da ação à insulina, provando que a expressão do gene *Slc2a4* é decisiva para a manutenção da captação de glicose pelo músculo, e consequentemente da homeostasia glicêmica. Adicionalmente, em camundongos diabéticos *db/db*, que apresentam resistência à insulina, a superexpressão do gene *Slc2a4* é capaz de normalizar a sensibilidade à insulina e a tolerância à sobrecarga de glicose (BROZINICK et al., 2001; GIBBS et al., 1995).

O desenvolvimento de técnicas para medir a atividade de regiões promotoras de genes foi crucial para o entendimento do processo de transcrição do gene *Slc2a4*, e permitiu a identificação de inúmeros fatores transcricionais que regulam a sua expressão (OLSON; KNIGHT, 2003). A caracterização desses fatores e de seus modos de atuação foram essenciais para a compreensão detalhada da regulação da expressão do gene *Slc2a4*, permitindo o aprimoramento de estratégias que poderão contribuir para o controle da homeostasia glicêmica no DM (ZORZANO; PALACÍN; GUMÀ, 2005).

Analisando os fatores transcricionais participantes da regulação da expressão do gene *Slc2a4* no músculo esquelético, observa-se que a maioria deles são ativadores, como o MEF2 (myocyte-specific enhancer factor 2), TR (thyroid hormone receptor), MyoD (Myoblast determination protein 1), HIF1A (hypoxia inducible factor 1 alpha), e SP1 (Transcription factor Sp1) entre outros (RICHARDSON; PESSIN,1993; SANTALUCIA et al., 2001; SILVA et al., 2005). É interessante que a expressão de alguns desses fatores e a sua afinidade de interação ao promotor de gene *Slc2a4* são primorosamente reguladas pela ação da insulina (MORAES et al., 2014). No DM, já foi descrito que a ligação do MEF2 na região promotora do gene *Slc2a4* está reduzida, concomitantemente à sua expressão, e o tratamento com insulina é capaz de reverter a expressão do *Slc2a4* por aumentar a ligação do MEF2 à região promotora do *Slc2a4* (THAI et al., 1998).

Por outro lado, poucos fatores transcricionais foram descritos como inibidores da expressão do gene *Slc2a4*. O PPARG (peroxisome proliferator-activated receptor gama) é um repressor da transcrição que age na sua forma não-ligada, isto é, na ausência de agonistas, como as glitasonas, que na verdade são ligantes indutores de desrepressão do gene *Slc2a4* (KARNIELLI; ARMONI, 2008). De suma importância foi a recente demonstração de que o NFKB (nuclear factor kappa-B), um potente mediador de efeitos pró-inflamatórios, é capaz de reprimir a expressão do gene *Slc2a4*, ligando-se em duas sequências da região promotora desse gene (FURUYA et al., 2013).

O NF-1 (Nuclear fator 1) e o O/E-1 (Transcription factor COE1) são dois fatores transcricionais relacionados à repressão do gene *Slc2a4*, mas que são muito pouco mencionados na literatura. A ação deles como repressores foi demonstrada em linhagens celulares provenientes de adipócitos de camundongos (3T3-L1) (COOKE; LANE, 1999; DOWELL; COOKE, 2002; MIURA et al., 2004). No entanto, não há evidências até hoje a respeito da ação deles em modelos celulares provenientes de músculo e menos ainda se sabe sobre a participação deles em modelos *in vivo* de DM.

Apesar dos grandes avanços na compreensão da regulação da expressão gênica do *Slc2a4*, muito ainda há que se aprender. Nesse sentido, uma nova e promissora área de conhecimento envolve a epigenética, visto que há fortes evidências de que alterações epigenéticas participam da fisiopatologia do DM (KWAK; PARK, 2016). A atuação de mecanismos epigenéticos sobre a maquinaria de expressão do gene *Slc2a4* em músculo esquelético é muito pouco conhecida, sobretudo na condição do DM, carecendo, portanto de investigações mais detalhadas.

A epigenética não possui uma definição exata, mas pode ser relacionada a um ramo da ciência que estuda a interação entre fatores ambientais e gênicos, que até podem ser herdados, mas que não envolvem modificações na sequência de nucleotídeos do DNA, e que se refletem na regulação da expressão gênica, replicação e diferenciação celular (JAENISCH; BIRD, 2003). Estudos evidenciam que a maquinaria epigenética é crucial na regulação da expressão de genes, provavelmente interferindo na atividade de ligação de fatores transcricionais (QUANTE; BIRD, 2016). Importante destacar que as alterações epigenéticas podem ser transmitidas para a próxima geração tanto por herança mitótica, divisão celular, quanto por herança meiótica, isto é, ao longo de gerações (BIRD, 2007).

Há evidências de que os mecanismos epigenéticos participam diretamente na predisposição e no desenvolvimento de doenças metabólicas, sendo que no DM já foram descritas diversas alterações epigenéticas afetando diretamente o padrão de expressão de genes

relacionados ao metabolismo em diferentes territórios do organismo (AL-HADDAD et al., 2016; KIRCHNER et al., 2013; STEFAN et al., 2014). Com base nisso, a investigação de mecanismos epigenéticos relacionados à expressão do gene *Slc2a4* contribuirá para evoluir o conhecimento que temos até o momento acerca da regulação desse gene no DM.

A metilação do DNA, mecanismo epigenético mais estudado, consiste na adição de grupamento metil (CH_3) no carbono localizado na posição 5` do anel pirimidínico de citosinas situadas principalmente em dinucleotídeos chamados CpG, sendo que a letra p representa a ligação fosfato entre os nucleosídeos citosina e guanina (DEATON; BIRD, 2011). Essa reação química é catalisada por enzimas conhecidas como DNA metiltransferases (DNMT). O grupamento metil provém da conversão da S-adenosilmetionina (SAM) em S-adenosilhomocisteína (SAH). As DNMTs conhecidas são a DNMT1 que é responsável pela manutenção da metilação das citosinas durante o processo de replicação celular, sendo também a primeira isoforma descoberta (BESTOR et al., 1988) e as DNMT3a/b que são responsáveis pela metilação *de novo*. Existe também a DNMT2, mas pouco se sabe sobre suas ações (ROBERTSON, 2001).

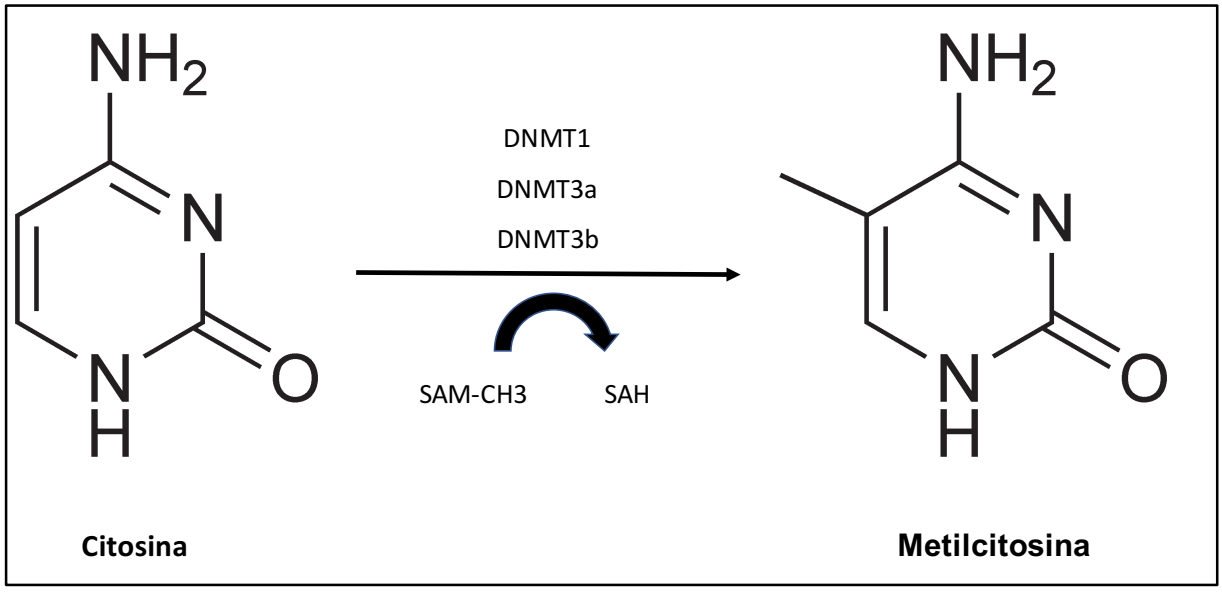


Figura 1 - Representação esquemática da reação de metilação da citosina envolvendo a doação do grupamento metil da S-adenosilmetionina (SAM) catalisada pelas DNMT1, 3a ou 3b.

Recentemente, Tahiliani e colaboradores (2009) identificaram enzimas denominadas metilcitosina dioxigenases, mais conhecidas como TET (Ten eleven translocation). Existem três isoformas caracterizadas (TET1, TET2 e TET3) e todas elas são capazes de oxidar as citosinas metiladas, convertendo-as em produtos intermediários do processo de desmetilação

do DNA, que inclui a 5-hidroximetilcitosina, a 5-formilcitosina e a 5-carboxilcitosina (RASMUSSEN; HELIN, 2016).

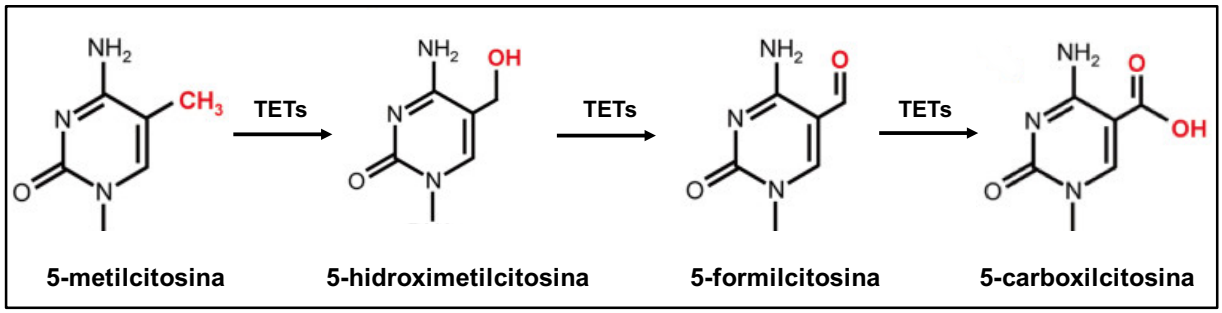


Figura 2 - Representação esquemática das fórmulas químicas estruturais dos intermediários formados ao longo do processo de desmetilação do DNA envolvendo reações de oxidação catalisada pelas enzimas TET.

Interessante notar que na estrutura química molecular de todas as TETs existem domínios de ligação para Fe^{2+} e 2-oxoglutarato, dado que sugere que a ação dessas enzimas pode ser regulada pela dieta e por produtos do metabolismo, e explica a reversibilidade e a dinamicidade da metilação/desmetilação do DNA (RASMUSSEN; HELIN, 2016). De fato, nesse sentido, Barrès e colaboradores (2012) verificaram, em músculo esquelético exercitado agudamente, alterações no grau de metilação principalmente em genes diretamente envolvidos no metabolismo oxidativo como *PPARGC1A*, *PDK4* e *PPARD*.

Interessante que nos últimos anos diversas mutações genéticas nas enzimas DNMT e TET foram identificadas em modelos de câncer (HAMIDI; SINGH; CHEN, 2015), dados que fortalecem o papel delas na manutenção dos níveis adequados de metilação do DNA, e que sugerem suas participações na fisiopatologia de inúmeras doenças, incluindo o DM.

Considerando os dinucleotídeos CpG num contexto mais amplo, estima-se que correspondam à aproximadamente 25% da sequência genômica de mamíferos e podem ou não estarem localizadas em regiões denominadas como ilhas (CGi), que constituem de forma genérica regiões do DNA que apresentam elevada frequência de C+G (HAN; ZHAO, 2009). Estima-se que, em mamíferos, apenas aproximadamente 1% do genoma seja constituído por CGi, no entanto, cerca de 60-70% dos genes possuem ao menos uma CGi na região promotora, o que sugere a crucial importância da metilação do DNA na regulação da transcrição gênica (ILLINGWORTH; BIRD, 2009; WEBER et al., 2007). Ainda, as citosinas podem sofrer metilação fora do contexto de CG, mas poucos estudos até o momento investigaram profundamente as implicações funcionais dessas modificações (PATIL; WARD; HESSON, 2014).

Devido ao importante papel da metilação no DNA sobre a regulação da transcrição, alguns autores sugeriram distintos critérios de classificação e identificação de CGis (ZHAO; HAN, 2009). O primeiro critério, mais antigo, fundamenta-se em três parâmetros: 1) tamanho da sequência; 2) conteúdo GC dado em porcentagem; 3) razão CpG observado/CpG esperado. Os primeiros autores que determinaram esses parâmetros de classificação de CGi foram Gardiner-Garden e Frommer (1987) e, mais tarde, Takai e Jones (2001) revisaram e aprimoraram esses parâmetros. Já o segundo critério fundamenta-se na significância estatística, a partir da identificação e frequência de dinucleotídeos CpG, em determinado fragmento da sequência do DNA (ZHAO; HAN, 2009). O CpGcluster e o CG Cluster são os algoritmos mais conhecidos para essa análise. Os detalhes técnicos de cada um dos principais algoritmos estão apresentados na tabela abaixo.

Tabela 1 - Detalhes dos parâmetros dos principais algoritmos de identificação de ilhas CpG.

	Parâmetros
Gardiner-Garden e Frommer (1987)	>200 pb, >50%GC, ObsCpG/ExpCpG >0.60
Takai e Jones (2002)	≥500 pb, ≥55% GC, ObsCpG/ExpCpG ≥0.65
CpGPRod	>500 pb, GC >50%, ObsCpG/ExpCpG >0.60
CpGcluster	Agrupamento de CpGs separados por distância mediana com significância de $P < 10^{-5}$
CG Cluster	Humano ≥ 27 CpGs em fragmento de DNA com 6531 pb Camundongos ≥ 24 CpGs em fragmento de DNA com 6585 pb

Do ponto de vista funcional, a metilação no DNA pode recrutar proteínas e formar complexos capazes de regular o quanto os fatores transcricionais podem interagir com o DNA, e afetar assim o grau de expressão dos genes (JAENISCH; BIRD, 2003). Em geral, a hipermetilação da região promotora está relacionada com a repressão da expressão gênica, enquanto a hipometilação é um evento associado ao favorecimento da expressão gênica (RAZIN; CEDAR, 1991). Existem pelo menos dois mecanismos descritos que explicam esse fenômeno: 1) a metilação no DNA impede diretamente a acessibilidade de fatores transcricionais ao DNA e 2) a metilação no DNA recruta proteínas como a MCP2, formando complexos que impedem a atuação da maquinaria de transcrição gênica (RAZIN, CEDAR, 1991). Estudos mais recentes ampliam essa lógica mostrando que a metilação do DNA é capaz

de provocar um remodelamento na cromatina, explicado parcialmente pelo recrutamento de enzimas histonas desacetilases (HDAC), que são responsáveis pela remoção enzimática de grupamento acetil de aminoácidos lisina constituintes da cauda peptídica N-terminal das histonas H3 e H4, principalmente (BIRD, 2011). As consequências desse mecanismo serão detalhadas adiante.

No entanto, há estudos que evidenciam uma quebra nesse paradigma, como no DM2 em que genes envolvidos no metabolismo apresentam redução no grau de metilação e de expressão (KIRCHNER et al., 2016). De fato, a desmetilação de citosinas localizadas dentro ou próximas a sítios de reconhecimento de fatores transcricionais repressores facilita a ligação dos mesmos, e isso acarreta em repressão da expressão do gene. Apesar disso, todos os estudos que até o momento avaliaram o grau de metilação da região promotora do gene *Slc2a4* corroboram a visão clássica, ou seja, demonstraram uma correlação inversa com a atividade transcricional.

A concomitante hipermetilação de sítios CpG localizados no promotor do gene *Slc2a4* e redução da expressão do gene *Slc2a4* foi observada em músculo esquelético de ratos adultos que receberam excesso de nutrientes no período pós-natal (LIU et al., 2013), ou que foram expostos ao ftalato, um composto presente em plásticos, durante a gestação materna (RAJESH; BALASUBRAMANIAN, 2014). Recentemente foi demonstrado que o aumento no grau de metilação de uma citosina no domínio de ligação do fator Sp1 na região promotora do gene *Slc2a4*, impede a ligação do Sp1 e, consequentemente, reduz a expressão do gene *Slc2a4* (RÜEGG et al., 2011). Esse último estudo exemplifica um mecanismo pelo qual a metilação do DNA pode interferir na maquinaria transcricional do *Slc2a4*. Apesar desses estudos terem mostrado correlações interessantes entre o grau de metilação e a expressão do *Slc2a4*, ainda não há evidências na literatura, especificamente na condição do DM, acerca do envolvimento da metilação na região promotora do gene *Slc2a4* em músculo esquelético.

Outra importante regulação epigenética da maquinaria transcricional é a modificação pós-traducional (*do inglês* PTM) da extremidade N-terminal das histonas, principalmente da histona H3 (STRAHL; ALLIS, 2000). No núcleo das células, as histonas formam octâmeros compostos por dímeros dos 4 tipos de histonas (H2A, H2B, H3 e H4), e a dupla fita de DNA (aproximadamente 147 pares de bases) se enovela a esses octâmeros formando os conhecidos nucleossomos (OUDET; GROSS-BELLARD; CHAMBON, 1975). Os níveis de organização funcional dos nucleossomos ainda não foram totalmente elucidados devido a limitações metodológicas, mas o que se sabe é que a formação dos nucleossomos é o estágio mais simples de organização da cromatina, que implica em última instância na regulação da função do material gênico (CAVALLI, 2011).

Os nucleossomos são unidades funcionais capazes de sofrer alterações dinâmicas, a partir de PTMs das histonas, que afetam diretamente a expressão gênica (MARIÑO-RAMÍREZ et al., 2005). Existem inúmeras PTMs, que incluem acetilação/metilação/ubiquitinação/sumoilação de lisina, metilação/citrulinação de arginina, ADP-ribosilação e isomerização de prolina e fosforilação de serina, treonina e tirosina (ROTHBART; STRAH, 2014). Dentre essas modificações, as mais estudadas são a acetilação e a metilação de lisinas pertencentes à extremidade N-terminal das histonas.

A hiperacetilação de lisinas das histonas favorece o estado conformacional conhecido como eucromatina, o que permite maior acessibilidade de fatores transcricionais ao DNA e, em geral, associa-se esse estado ao aumento da expressão gênica. O inverso, a hipoacetilação, promove um condensamento dos nucleossomos, estado de heterocromatina, que dificulta a interação de fatores transcricionais ao DNA e consequentemente, em geral, esse mecanismo está associado à repressão da expressão gênica (VERDONE; CASERTA; DI MAURO, 2005). O mecanismo de alteração conformacional dos nucleossomos envolve alteração na carga elétrica dos resíduos de aminoácidos que sofrem acetilação. Mecanisticamente, a acetilação de lisinas neutraliza a carga elétrica dos mesmos, evento que resulta na repulsão entre o octâmero de histonas e a dupla fita de DNA, explicando o mecanismo físico pelo qual a acetilação de histonas está associada ao estado conformacional menos compactado do material gênico. (GARDNER; ALLIS; STRAHL, 2011; KOUZARIDES, 2007).

Já a metilação dos resíduos lisina e arginina das extremidades N-terminal das histonas pode ativar ou reprimir a expressão gênica, mecanismo que depende da posição do resíduo que sofrer essa modificação (BLACK et al., 2012). É importante enfatizar que a metilação/desmetilação de histonas não altera diretamente o estado conformacional dos nucleossomos, mas altera o recrutamento de proteínas, que associadas formam complexos capazes de regular a transcrição, alterando indiretamente a conformação dos nucleossomos (KOUZARIDES, 2007). A trimetilação do resíduo lisina localizado na posição 9 da cauda peptídica N-terminal de histona H3 (H3K9me3) é associada à repressão transcricional (GREER; SHI, 2012), enquanto que a metilação do resíduo lisina localizado na posição 4 da cauda peptídica N-terminal de histona H3 (H3K4me) é associada à ativação transcricional (BERNSTEIN et al., 2002).

Alguns estudos já investigaram a influência da acetilação e metilação das histonas na expressão do gene *Slc2a4*. Foi demonstrado que a hiperacetilação da H3 na região de ligação do MEF2 aumenta a ligação deste fator no promotor do gene *Slc2a4,* resultando em aumento da sua expressão (SMITH et al., 2008). Resultados semelhantes foram descritos por Mukwevho

e colaboradores (2008) em modelo de incubação aguda (2 horas) de células musculares (C2C12) com cafeína (10 mM). Adicionalmente, outro estudo demonstrou que a exposição à dieta rica em carboidratos no período neonatal promove, na vida adulta e no músculo esquelético, aumento no conteúdo de metilação na lisina 16 da histona H4 (H4K16me), perto do sítio de ligação do receptor do hormônio tireoidiano (TR) no promotor do gene *Slc2a4*, reduzindo a ligação do TR e a expressão do gene *Slc2a4* e da proteína GLUT4 (RAYCHAUDHURI et al., 2014).

No entanto, nenhum estudo investigou tais mecanismos no gene *Slc2a4* em modelo de diabetes, o que pode contribuir na determinação de novos reguladores desse gene, visando melhorar a homeostasia glicêmica no DM. Nesse sentido, destacam-se os polifenóis, abundantes micronutrientes não-essenciais classicamente conhecidos como anti-oxidantes (LANDETE, 2013).

Os polifenóis são encontrados em diversos tipos de alimentos como frutas, verduras, cereais e bebidas, incluindo o café, variados tipos de chás e vinhos (SCALBERT et al., 2005). Nos últimos anos, o conhecimento acerca das ações biológicas dos polifenóis expandiu, e estudos destacam um potente efeito no remodelamento da cromatina, afetando a expressão de genes por meio de variados mecanismos epigenéticos, que incluem a metilação do DNA e as PTMs de histonas. No entanto, a maioria dos estudos que investigaram o efeito dos polifenóis sobre mecanismos epigenéticos o fizeram em modelos experimentais relacionados a diversos tipos de câncer (GROH et al., 2013; KUMAR et al., 2015; VANDEN BERGHE, 2012). Nesse contexto, há indícios de que os polifenóis regulem a atividade das enzimas responsáveis pela metilação/desmetilação do DNA, como é o caso da epigalocatequina-3-galato e da genisteína, que são polifenóis encontrados na planta *Camellia sinensis* (chá verde) e na *Glycine max* (soja), respectivamente (FANG et al., 2007), bem como também há evidências de que outros polifenóis regulem PTMs das histonas, regulando a atividade de histonas acetiltransferases, desacetilases, metilases e desmetilases (KIM et al., 2016).

Outros estudos demonstram que os polifenóis também regulam marcações epigenéticas em genes envolvidos na gênese e progressão de outras doenças que não o câncer, tais como doenças cardiovasculares, neuro-degenerativas e distúrbios metabólicos que incluem o DM e a obesidade. Nesse sentido, é fundamental aprofundar a investigação desses compostos na fisiopatologia do DM (RUSSO et al., 2015).

Existem aproximadamente 8000 polifenóis e todos possuem, em sua estrutura química, anéis fenólicos com um ou mais grupamentos hidroxila (AYISSI; EBRAHIMI; SCHLUESENNER, 2014). Conforme a natureza do esqueleto de carbono, os polifenóis podem

ser classificados em quatro grupos: flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos e ligninas (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000). O resveratrol, foco do presente estudo, pertence ao grupo estilbeno, e é encontrado em abundância em diversas espécies de plantas, incluindo determinadas frutas como uva e amora, e estendendo-se ao vinho.

Assim como todos os polifenóis, em plantas, o resveratrol é produzido em resposta a agentes agressores como fungos, parasitas, radiação UV e substâncias químicas que, em geral, são fatores estressantes (GAMBINI et al., 2015). A fórmula química estrutural do resveratrol foi identificada a partir de sua extração da raíz da *Veratrum grandiflorum* (TAKAOKA, 1940), e consiste em dois anéis fenólicos unidos por dupla ligação de estireno, o que permite a formação de isomeria –cis e –trans, ilustradas na figura abaixo.

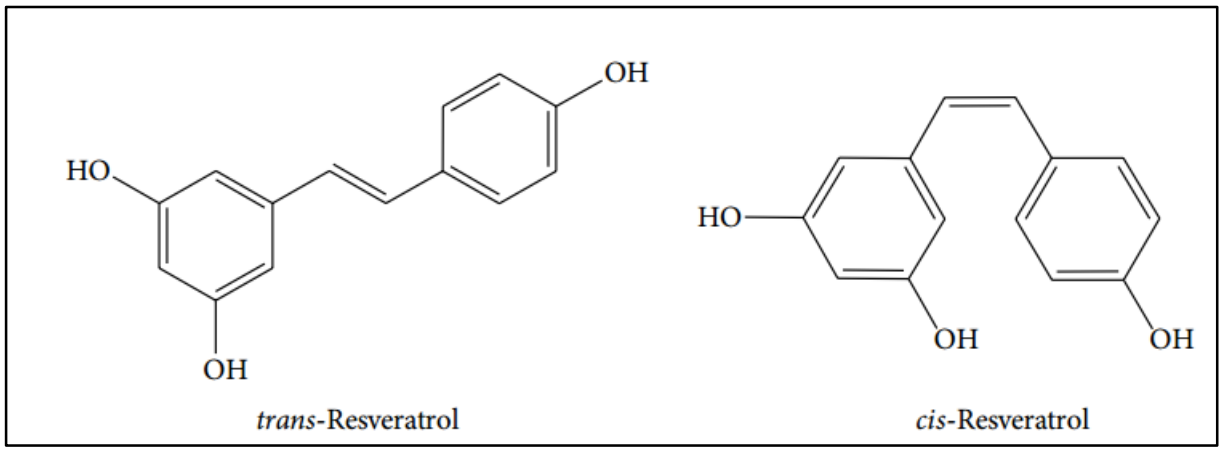


Figura 3- Estrutura química do trans-resveratrol e do cis-resveratrol.

É importante salientar que o trans-resveratrol é a isoforma mais estudada tanto em modelos experimentais (*in vitro* e *in vivo*), devido a sua maior estabilidade, apesar de apresentar baixa solubilidade em água (3 mg/100 mL), e moderada solubilidade em álcool (50 mg/mL) e em dimetilsulfóxido (DMSO) (16 mg/mL) (DELMAS, 2011).

Apesar de diversos estudos até o momento terem reportado efeitos benéficos do resveratrol, a sua farmacocinética ainda é muito pouco conhecida. Em humanos, ensaios de rastreamento do resveratrol após administração oral aguda (0,35 mg/Kg de peso corporal) demonstram que após 30 minutos há um pico de resveratrol livre na corrente sanguínea, mas que equivale a apenas 1,5% do total administrado. O restante apresenta-se nas formas conjugadas com ácido glicurônico ou sulfato, indicando que o resveratrol sofre intensa e rápida metabolização *in vivo* (BOOCOCK et al., 2007; GOLDBERG; YAN; SOLEAS, 2003). O trânsito do resveratrol na corrente sanguínea é dependente de interações principalmente com

proteínas e lipoproteínas plasmáticas, fato decorrente da baixa hidrosolubilidade desses compostos, enquanto que os metabólitos do resveratrol são hidrosolúveis (DELMAS, 2011).

Apesar das limitações relacionadas à baixa biodisponibilidade *in vivo*, há cerca de 25 anos as propriedades terapêuticas do resveratrol foram associadas ao consumo regular de vinho pela população francesa e sua baixa incidência de mortes por doença cardiovascular, apesar do baixo nível de atividade física e consumo elevado de alimentos gordurosos e tabaco. Na época, esse dado ficou popularmente conhecido como paradoxo francês (RENAUD; LORGERIL, 1992). Em seguida, o possível efeito cardioprotetor do resveratrol foi reiterado pela redução do dano no miocárdio, induzida por isquemia, da oxidação de LDL e da agregação plaquetária (WU et al., 2001). A partir de então, diversos estudos demonstraram que o resveratrol possui propriedades anti-envelhecimento, anti-inflamatória, anti-oxidante e anti-cancerígena (KASIOTIS et al., 2013; MOMKEN et al. 2011; PRASAD, 2012; ZHU et al., 2012). Recentemente, estudos demonstraram que o tratamento com resveratrol também possui efeitos anti-diabetogênicos, sendo capaz de promover melhorias em situações de resistência à ação da insulina e disfunção das células β pancreática, associadas ou não à obesidade (SMOLIGA; BAUR; HAUSENBLAS, 2011; SZKUDELSKI; SZKUDELSKA, 2011).

O tratamento com resveratrol parece ser capaz de promover melhorias na sensibilidade à ação da insulina em modelos de DM1 e DM2 (SZUDELSKI; SZKIDELSKA, 2015). Há dados recentes confirmando que a resistência à insulina também está presente no DM1 (BACHA; KLINEPETER BARTZ, 2015; OKAMOTO et al., 2011) e, portanto, a investigação das ações do resveratrol sobre a sensibilidadeà insulina é relevante para ambos os tipos de DM (LEBOVITZ, 2010).

Poucos estudos investigaram o efeito do resveratrol em modelo DM1, sobre tudo em relação à homeostasia glicêmica e expressão de GLUT4 no músculo esquelético. Ainda, os poucos dados encontrados na literatura são conflitantes: alguns reportam melhoria sobre a homeostasia glicêmica e incluem aumento na expressão de GLUT4 (CHEN et al., 2011; CHI et al., 2007; PENUMATHSA et al., 2008), enquanto outros não observaram o mesmo efeito (SCHMATZ et al., 2009). Ainda, é importante salientar que nesses estudos nenhuma reposição de insulina foi utilizada, fato imprescindível no tratamento do DM1 (LEBOVITZ, 2010).

Outra parcela dos estudos, que são maioria, demonstraram efeitos do resveratrol na redução da glicemia em modelos animais de DM2 (CHEN et al., 2012) e em humanos DM2 (BHATT; THOMAS; NANJAN, 2012).

Em camundongos *db/db*, o tratamento com resveratrol parece estimular a translocação de GLUT4 e aumentar a captação de glicose em músculo esquelético (DO et al., 2012). Além

disso, há indícios de um efeito protetor sobre as células B pancreáticas envolvendo a inibição do estresse oxidativo gerado pela ação de produtos de glicação avançada. Tais efeitos benéficos do resveratrol sobre a homeostasia glicêmica podem ainda ser associados ao aumento significativo do peso do pâncreas, massa das células B e redução da fibrose das ilhotas em camundongos *db/db* tratados com 20 mg/kg/dia de resveratrol (MINAKAWA et al., 2011). Dose mais elevada de resveratrol (400 mg/Kg/dia) promove efeito protetor semelhante sobre a função do pâncreas por atenuar o estresse oxidativo (ZHANG et al., 2012). Adicionalmente, estudos *in vitro* demonstraram que tanto células INS-1E, quanto ilhotas humanas provenientes de um doador portador de DM2, quando incubadas com resveratrol na dose de 25 μM apresentam aumento significante na secreção de insulina em resposta a sobrecarga de glicose (VETTERLI et al., 2011).

Portanto, os efeitos benéficos do resveratrol no DM2 parecem envolver uma melhora da sensibilidade à insulina e concomitante preservação da função das células B, apesar deste último ser relevante somente quando há uma população residual de células B, como evidenciado em estágios menos avançados de DM2 (WEYER et al., 1999).

Adicionalmente, há dados importantes na literatura sugerindo papel anti-obesidade do resveratrol (FERNÁNDEZ-QUINTELA et al., 2015). A obesidade, cuja incidência cresce exponencialmente, é um importante fator de risco para a gênese e progressão do DM2 (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006), e estudos em células adiposas, *in vitro*, mostram que o resveratrol, de maneira dose- e tempo-dependente promove a inibição da transcrição de genes e da tradução de proteínas envolvidas na lipogênese, destacando-se o PPAR gama, C/EBP-alfa e SREBP-1c (LASA et al., 2012). Lagouge e colaboradores (2006) foram os pioneiros em investigar as possíveis ações anti-obesidade do resveratrol, *in vivo*, demonstrando que camundongos C57BL/6J submetidos à dieta hiperlipídica recebendo resveratrol (200 ou 400 mg/Kg de peso corporal, durante 15 semanas) apresentaram perda de peso, redução do tamanho de adipócitos, e aumento do metabolismo basal, demonstrado pelo aumento da expressão de PGC-1-alfa e UCP-1 no tecido adiposo marrom. Outros autores verificaram resultados semelhantes, inclusive estendendo o protocolo de tratamento com resveratrol até 55 semanas (BAUR et al., 2006) e utilizando variadas doses (1, 10 e 30 mg/Kg/dia) (CHANG et al., 2016).

Paralelamente aos efeitos gerais do resveratrol comentados até aqui, no contexto celular e molecular, existem informações limitadas na literatura acerca de seu mecanismo de ação. Primeiramente, a maior parte do resveratrol parece se difundir passivamente pela membrana plasmática, mas alternativamente pode interagir com receptores de membrana, as integrinas ($\alpha v\beta 3$), e nesse caso, mais especificamente pode ligar-se a subunidade β3, ativando cascata de

sinalização intracelular envolvida na atenuação da apoptose celular, efeito bem caracterizado em células de câncer de mama humano (LIN et al., 2006).

Há alguns mecanismos propostos de atuação do resveratrol no compartimento intracelular. O primeiro a ser descrito envolve a interação com receptor hidrocarboneto aril, codificado pelo gene *AHR* (em humanos); foi descrito que o resveratrol inibe a transativação desse receptor promovendo a inibição da expressão de citocromo P-450 e interleucina 1-b, proteínas envolvidas na carcinogênese e imunossupressão, mecanismo que contribuiria para sua ação anti-carcinogênica (CASPER et al., 1999). Ainda, pelo fato do resveratrol ser considerado um fitoestrógeno, estudos demonstram que o resveratrol possui afinidade de ligação com os receptores de estrógeno alfa e beta, caracterizando mais um mecanismo de ação (BOWERS et al., 2000; GEHM et al., 1997).

No entanto, as inúmeras ações benéficas do resveratrol apontadas pela literatura parecem serem promovidas, principalmente, pela ativação de uma classe de enzimas chamadas de sirtuínas (SIRT) (BORRA; SMITH; DENU, 2005). As sirtuínas são codificadas por genes homólogos ao gene *SIR2*, presente em organismos mais simples como *Caenorhabditis elegans*. Em mamíferos, existem sete isoformas de SIRT (SIRT1-7), cada uma delas atua em diferentes compartimentos celulares (núcleo, citoplasma e mitocôndria), e todas elas apresentam em comum um domínio catalítico, onde se liga o co-fator NAD^+; portanto, a modulação de sua atividade possui interface direta com o metabolismo (FLICK; LÜSCHER, 2012; IMAI et al., 2000; TANNO et al., 2007). Dependendo da isoforma e da sua localização intracelular, as sirtuínas possuem diversas atividades catalíticas que inclui desacetilação, ADP-ribosilação, demalonilação, desuccinação, dentre outras. A SIRT1 é a isoforma mais estudada, possui atividade desacetilase e maior homologia com o gene ancestral *SIR2* (GUARENTE, 2013).

Conforme o tipo celular e o estágio de diferenciação em que uma dada célula se encontra, a SIRT1 pode ser encontrada tanto no compartimento citosólico quanto nuclear. Pelo fato da SIRT1 ser uma proteína de peso molecular hipotético de ~120 kD, o seu trânsito através da carioteca não ocorre por simples difusão, mas depende de mecanismo específico. Este mecanismo envolve a existência de duas sequências de aminoácidos, na cauda N-terminal, que sinalizam a importação e exportação nuclear (TANNO et al., 2007). Dessa maneira, há a possibilidade da SIRT1 atuar diretamente no núcleo, controlando processos relacionados à transcrição gênica, bem como no citosol, regulando vias de sinalização envolvidas em processos celulares como metabolismo, inflamação, estresse oxidativo e apoptose.

A SIRT1 é considerada uma importante proteína reguladora da homeostasia metabólica, sendo até sugerida como alvo importante no tratamento do DM (CHANG; GUARENTE, 2014;

KUME et al., 2010). Classicamente, a restrição calórica é capaz de ativar a SIRT1 (GUARENTE, 2013), e o resveratrol mimetizaria os efeitos da restrição calórica, uma vez que é um potente ativador de SIRT1 (ALCAÍN; VILLALBA, 2009).

Em camundongos saudáveis submetidos à restrição alimentar foi detectado um aumento significante da atividade de SIRT1, acompanhado de redução da concentração plasmática de insulina, glicose e colesterol. Ainda, em modelos *in vivo* de resistência à insulina, a superexpressão de SIRT1 promoveu melhorias na tolerância à glicose, devido a uma redução da produção hepática de glicose e aumento dos níveis de adiponectina (hormônio produzido no tecido adiposo com ações sensibilizadoras à insulina) (BANKS et al., 2008). Em ratos Sprague-Dawley saudáveis submetidos à restrição calórica de 4 semanas (60% de calorias da dieta normal) e, em seguida, submetidos à dieta normal, foi observada uma resistência à insulina, fenômeno descrito na literatura como *catch-up*. No entanto, após esses animais serem tratados, durante 12 semanas, com resveratrol (100 mg/kg/d), os mesmos apresentaram, em músculo tibial anterior, aumento da atividade de SIRT1, concomitantemente a um aumento na atividade mitocondrial e na sensibilidade à ação da insulina, reforçando que o resveratrol seja eficaz no tratamento de distúrbios metabólicos (ZHENG et al., 2012). Com base nessa última informação, é possível que o aumento da atividade de SIRT1, induzido pelo resveratrol, envolva regulação importante na expressão do gene *Slc2a4* em músculo esquelético de modelos experimentais de DM, o que nunca foi investigado.

Adicionalmente, o resveratrol é capaz de ativar a proteína cinase ativada por AMP (AMPK), que assim como a SIRT1, é considerada um importante sensor metabólico (FULLERTON; STEINBERG, 2010; KAHN et al., 2005). Como o próprio nome indica, a sua atividade está diretamente relacionada ao aumento nos níveis de AMP intracelulares. A AMPK é um complexo heterotrimérico, composto por três subunidades distintas (α, β e γ), as quais possuem, cada uma, três isoformas conhecidas, denominadas como 1, 2 e 3. A subunidade regulatória γ, reconhece o aumento dos níveis de AMP, o qual interage com esta subunidade, promovendo uma mudança conformacional, expondo o sítio catalítico da subunidade α a proteínas cinases, como LKB1 e CAMKII, e aumentando a atividade do complexo (FRIEDRICHSEN et al., 2013). Do ponto de vista farmacológico, diversos trabalhos demonstram que o resveratrol é capaz de aumentar a atividade de AMPK por meio de fosforilação no sítio treonina 172 da subunidade catalítica α (BREEN et al., 2008; ITO-NAGAHATA et al., 2013; PENUMATHSA et al., 2008).

Do e colaboradores (2012) demonstraram que os efeitos benéficos sobre a homeostasia glicêmica em camundongos *db/db* envolve aumento na atividade da AMPK. De fato,

camundongos AMPKa1$^{-/-}$ e AMPKa2$^{-/-}$ tratados com resveratrol não apresentam melhorias sobre a homeostasia glicêmica, como observado nos animais nativos (UM et al., 2010). No entanto, Price e colaboradores (2012) demonstraram que a atividade da AMPK é dependente da SIRT1, enquanto Cantó e colaboradores (2010) afirmaram o oposto, que a AMPK ativa a enzima NAMPT, responsável pela produção de NAD^+ (esse é co-fator essencial para atividade de SIRT1). Com base nesses dados, a princípio os efeitos do resveratrol na melhoria da homeostasia glicêmica devem envolver a atividade de ambas as proteínas (AMPK e SIRT1), mas isso ainda carece de maiores esclarecimentos no DM.

Em relação aos efeitos do resveratrol mediados pela SIRT1, tem sido proposta a participação de mecanismos epigenéticos (BAGUL et al., 2015; FARGHALI; KUTINOVÁ CANOVÁ; LEKIC, 2013). A SIRT1 é conhecida como uma histona desacetilase capaz de diretamente reduzir o grau de acetilação de histonas, e de indiretamente alterar o grau de metilação de histonas e do DNA (ZHANG; KRAUS, 2010). Portanto, o resveratrol poderia, via ativação de SIRT1, regular mecanismos epigenéticos em importantes processos celulares que possam melhorar a sensibilidade à insulina, o que representa um importante alvo para tratamento do DM ainda não investigado (AL-HADDAD et al., 2016).

Como exposto até então, os efeitos benéficos do resveratrol sobre a homeostasia glicêmica devem envolver mecanismos ainda não elucidados, incluindo os epigenéticos, principalmente aqueles que se alteram no estado diabético. Entretanto, nada se sabe quanto à possibilidade do resveratrol, via mecanismos epigenéticos / SIRT1, regular a expressão do gene *Slc2a4* em músculo de animais diabéticos.

2 JUSTIFICATIVA

O diabetes mellitus tornou-se uma epidemia do mundo moderno. Até o presente, as terapêuticas disponíveis para o DM não estão garantindo um bom controle glicêmico, propiciando, em longo prazo, o desenvolvimento de complicações degenerativas. Nesse sentido, a necessidade de ampliar a farmacopéia dos sensibilizadores da insulina para o DM é imperativa.

Para tanto, o conhecimento detalhado dos mecanismos fisiopatológicos da doença é fundamental, pois propicia o desenvolvimento de alvos terapêuticos e/ou contribui para estabelecer a eficácia de agentes potencialmente benéficos.

Dentro desse contexto, hipotetizamos: 1) que mecanismos epigenéticos possam estar regulando a expressão do gene *Slc2a4* no músculo de portadores de DM, contribuindo para prejudicar o clareamento da glicose sanguínea; e 2) que o resveratrol, um potencial modulador de regulações epigenéticas via SIRT1, possa melhorar a expressão do *Slc2a4* e consequentemente o controle glicêmico no DM.

Esperamos poder revelar o resveratrol como um sensibilizador da insulina, que possa ser utilizado no tratamento de DM2 e DM1, nesse último, como coadjuvante à insulinoterapia.

3 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo é investigar em ratos DM1 tratados com insulina e em camundongos DM2 o efeito do resveratrol sobre 1) a homeostasia glicêmica, e 2) a participação de mecanismos epigenéticos na regulação da expressão do gene *Slc2a4* em músculo esquelético.

3.1 Estratégias experimentais

Avaliar os efeitos do resveratrol sobre a homeostasia glicêmica de ratos DM1 tratados com insulina e de camundongos DM2;

Avaliar o efeito do resveratrol, no músculo sóleo de ratos DM1 tratados com insulina e no músculo gastrocnêmio de camundongos DM2, sobre:

a) a expressão do gene *Slc2a4* (qPCR) e da proteína GLUT4 (Western blotting);

b) o grau de metilação de DNA (qPCR) e as alterações pós-traducionais da histona H3 na região promotora do gene *Slc2a4* (ensaio de imunoprecipitação da cromatina);

c) o conteúdo de sirtuína 1 no citosol e núcleo (Western blotting);

d) a expressão de AMPK e o seu conteúdo fosforilado (Western blotting).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo aprovou a utilização de ratos da linhagem Wistar (n° 004, fls. 028, livro 03) e camundongos da linhagem CD1 (n° 74, fls. 07, livro 03) para a realização de todos os procedimentos experimentais do presente estudo.

4.1 Obtenção de ratos portadores de diabetes mellitus tipo 1 (DM1)

Ratos Wistar (200-250 g) provenientes do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da USP foram mantidos em condições padronizadas de temperatura ambiental (23 ± 2 ºC) e ciclo claro/escuro (12/12 horas diárias). A água e alimentação foram fornecidas *ad libitum*.

Aos 75 dias de idade, após período de jejum noturno (±12 horas), e previamente anestesiados com Tanohalo® (Cristália, Itapira, SP, Brasil), os ratos receberam uma injeção i.v. de estreptozotocina dissolvida em tampão citrato pH 4,5 (55 mg/kg de peso corporal), para indução do DM, ou apenas tampão citrato no mesmo volume, como controles não diabéticos.

Após 14 dias da indução do DM, os animais diabéticos receberam tratamento por 30 dias com 5 U/dia de insulina NPH (Humulin) (Eli Lilly & Co., Indianapolis, IN., EUA) ou com a associação insulina e resveratrol (5 U insulina NPH + 10 mg/kg/dia resveratrol). A insulina e o resveratrol foram administrados por via subcutânea e intraperitoneal, respectivamente. A outra parcela dos animais diabéticos recebeu injeção de NaCl 0,9% (salina) subcutânea e salina+DMSO (30%) intraperitoneal, servindo como grupo diabético não tratado. A dose de insulina foi baseada em Okamoto e colaboradores (2011) e a de resveratrol em Schmatz e colaboradores (2009).

Assim foram constituídos 4 grupos: não diabéticos (ND), diabéticos tipo 1 não tratados (DM1), diabéticos tipo 1 tratados com insulina (DM1 I) e diabéticos tipo 1 tratados com insulina + resveratrol (DM1 IR).

4.2 Obtenção de camundongos portadores de diabetes mellitus tipo 2 (DM2)

Camundongos CD1, machos e fêmeas, foram mantidos em condições padronizadas de temperatura ambiental (23 ± 2 ºC) e ciclo claro/escuro (12/12 horas diárias), com água e alimentação *ad libitum*, no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Após período de adaptação, os animais foram colocados para acasalamento durante 7 dias. As fêmeas prenhes foram acomodadas em gaiolas individuais até o desmame das ninhadas (os filhotes foram desmamados no 20º dia, após

o nascimento). Logo após o nascimento, os filhotes foram sexados e identificados. Os filhotes machos passaram a receber injeção subcutânea de 2 mg/g de peso corporal de glutamato monossódico (Sigma-Aldrich CO., Steinhein, NW., Alemanha) durante 5 dias consecutivos, e, no sétimo dia, uma dose adicional de 4 mg/g de peso corporal, para indução de obesidade com DM2 na vida adulta. Parte dos animais foi injetada com salina, para compor o grupo controle. Esse protocolo foi baseado em estudos prévios do laboratório (MACHADO et al., 1994; PAPA et al., 1997). Após o desmame, os animais foram mantidos em ambiente com ciclo de luz controlado de 12 horas claro / 12 horas escuro e temperatura constante de 23 ± 2 ºC, com livre acesso a água e alimento.

Assim que os animais completaram 19 semanas de idade, os animais tratados com MSG passaram a receber o resveratrol na água de beber, dissolvido em 0,1% de etanol absoluto na dose de 30 mg/Kg de peso corporal/dia, durante 60 dias (TUNG et al., 2015). Para padronizar a diluição do resveratrol, a fim de fornecer a dose desejada, verificamos a quantidade média de água ingerida por cada camundongo. O controle de ingestão hídrica foi realizado duas vezes por semana, para a ajustes na concentração de resveratrol ao longo do período de tratamento. Assim, organizamos três grupos experimentais: não diabético (ND); diabético tipo 2 (DM2) e diabético tipo 2 tratados com resveratrol (DM2 R).

4.3 Avaliação do estado diabético

Em ambos os delineamentos experimentais avaliamos o estado diabético antes e após o período de tratamento com resveratrol. Para avaliar o estado diabético dos ratos DM1 verificamos a evolução ponderal, glicemia, frutosamina e glicosúria. Foram selecionados como diabéticos os animais que apresentaram glicemia pós-prandial ≥ 300 mg/dL. Para avaliar o estado diabético dos camundongos DM2 verificamos a evolução ponderal, a glicemia e realizamos o teste de tolerância à insulina. Foram selecionados como diabéticos os animais que apresentaram glicemia pós-prandial ≥ 200 mg/dL.

4.4 Teste de tolerância à insulina

O teste foi realizado apenas nos camundongos, após restrição alimentar de 4 horas, entre 8:00 e 10:00 horas. O primeiro procedimento foi coletar a glicemia basal (tempo zero) e, em seguida, 0,75 U/Kg de peso corporal de insulina regular foi administrada por injeção intraperitoneal. Posteriormente, amostras de sangue caudal foram coletadas nos tempos 5, 10, 15, 20, 30 e 40 minutos, e a glicemia foi aferida utilizando um glicosímetro (Accu-Check Active

BSL., Suíça). A constante de decaimento da glicose (kITT) foi calculada com base nos valores da regressão linear do logaritmo neperiano dos valores glicêmicos obtidos durante o teste.

4.5 Eutanásia e coleta dos tecidos

Ao final dos tratamentos, entre 8:00 e 10:00 horas, após 4 horas de restrição alimentar, os animais foram pesados e anestesiados com Tiopental sódico–Thiopentax® (Cristália, Itapira, SP., Brasil) (50 mg/Kg do peso corporal, via intraperitoneal). Após a abolição dos reflexos corneanos e retirada da pata ao estímulo da dor, removemos os músculos sóleo dos ratos e os músculos gastrocnêmio dos camundongos e os armazenamos em nitrogênio líquido até o término dos procedimentos experimentais. Em seguida, coletamos o sangue da veia cava inferior dos ratos e do ventrículo esquerdo do coração dos camundongos e os armazenamos em tubos heparinizados. As amostras de sangue foram centrifugadas (2.000 g, 4 ºC, 15 minutos) para obtenção de plasma que foi armazenado à -20 °C e os tecidos musculares sóleo e gastrocnêmio foram estocados à -80 ºC para futuras análises.

4.6 Dosagens plasmáticas de insulina, frutosamina, colesterol e triglicérides

A dosagem de insulina plasmática foi realizada pelo método ELISA (*Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*), conforme recomendações do fabricante (Cat. #EZRMI-13K, EMD Millipore Corporation, St. Charles, MO., EUA). A concentração plasmática de frutosamina, colesterol e triglicérides foi medida por meio de ensaios colorimétricos específicos (Labtest Diagnótica SA, Lagoa Santa, MG., Brasil), conforme determinações do fabricante.

4.7 Avaliação da expressão do gene *Slc2a4* por PCR em tempo real (qPCR)

As amostras de músculo sóleo de ratos e gastrocnêmio de camundongos foram processadas para extração de RNA total, utilizando o método Trizol® (Gibco BRL, Life Technologie Research Products - Grand Island, NY., EUA), conforme as instruções do fabricante. A concentração de RNA total das amostras foi determinada utilizando um espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA., EUA).

A síntese do DNA complementar (cDNA) a partir do RNA total, foi realizada utilizando-se a enzima transcriptase reversa SuperScript TMII RT Rnase H (Invitrogen, Carlsbad, CA., EUA), conforme recomendação do fabricante. O cDNA obtido foi armazenado à -20 ºC até a realização da qPCR. O gene alvo *Slc2a4* e os genes referência Beta-2-microglobulina (*B2m*) para ratos e subunidade beta do complexo mitocondrial F1, transportador

H^+, da ATP sintase (*Atp5b*) para camundongos foram amplificados por PCR em tempo real, no equipamento StepOne Plus Instrument (Applied Biosystems, Forest City, CA., EUA). A escolha dos genes de referência descritos foi baseada no resultado da análise de estabilidade da expressão gênica utilizando o programa chamado REFFINDER. O mesmo baseia-se no resultado de quatro plataformas (geNorm, Normfinder, BestKeeper e método Delta Ct). Segue abaixo os detalhes dos iniciadores e sondas utilizadas, assim como o código de identificação dos ensaios.

Tabela 2 - Detalhes dos iniciadores e sondas para ratos e camundongos utilizadas no qPCR.

Gene	Sequência	Sonda	ID
***Slc2a4* (rato)**	S: 5'GGCTGTGCCATCTTGATGAC3' AS: 5'CACGATGGACACATAACTCATGGAT3'	FAM	
***B2m* (rato)**	Inventoriado	FAM	Rn00560865_m1
***Slc2a4* (camundongo)**	Inventoriado	FAM	Mm01245502_m1
***Atp5b* (camundongo)**	Inventoriado	FAM	Mm00443967_g1

A quantificação do gene alvo (*Slc2a4*) foi analisada em relação ao seu gene referência (*B2m* ou *Atp5b*), conforme descrito por Livak e Schmittgen (2001). ID, refere-se ao código de identificação do ensaio (Applied Biosystems).

4.8 Avaliação da expressão proteica de GLUT4, AMPK (total e fosforilada) e SIRT1 (citosólica e nuclear) por Western blotting

Abaixo segue os detalhes dos procedimentos experimentais para a realização do Western blotting.

4.8.1 Método de extração de fração de proteína celular total

Para quantificação da proteína GLUT4 total, os músculos foram homogeneizados utilizando Polytron em tampão contendo 10 mM Tris, 1 mM EDTA e 250 mM sacarose, seguindo centrifugação à 760 g por 10 min e à 4 ºC, e o sobrenante foi estocado à -80 ^{o}C. Para quantificação da proteína AMPK total e fosforilada, os músculos foram homogeneizados em tampão contendo 137 mM cloreto de sódio; 2,7 mM cloreto de potássio; 1 mM cloreto de magnésio; 20 mM Tris [pH 7,8]; 1 mM EDTA; 5 mM pirofosfato de sódio; 10 mM fluoreto de sódio; 1% Triton X-100; 10% glicerol; 0,2 mM fenilmetilsulfonil fluoreto; 0,5 mM ortovanadato de sódio e coquetel de inibidor de protease (1:100). Após homogeneização, as

amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 40 min a 4 ºC, e o sobrenadante foi estocado à -80 ^{o}C. O conteúdo proteico das amostras foi determinado pelo método Bradford, conforme as instruções do fabricante (BioRad Laboratories, Hercules, CA., EUA).

4.8.2 Método de extração de fração enriquecida em proteína citosólica ou nuclear

Para avaliar o conteúdo de SIRT1 no citosol e no núcleo, os músculos sóleo de ratos e gastrocnêmio de camundongos foram pulverizados em nitrogênio líquido e o material foi transferido para tubos de 1,5 mL. Na sequência, as amostras foram lavadas com 1 mL de tampão gelado contendo 137 mM NaCl; 2,68 mM KCl; 1,27 mM KH_2PO_4; 8,06 mM Na_2HPO_4 e inibidores de proteases (PMSF 1:500 e 200 mM DTT), seguindo-se centrifugação a 1.000 g, 4 ºC por 10 min. O sobrenadante foi separado, correspondendo à fração enriquecida em proteínas citosólicas. O pellet foi ressuspendido em 500 µL de tampão contendo 10 mM HEPES-KOH [pH 7,9]; 1,5mM $MgCl_2$; 10mM KCl; 0,5mM DTT; 0,2 mM PMSF; leupeptina (5 µg/mL); aprotinina (15 µg/mL), e incubado em gelo por 10 minutos, seguido de adição de 12,5 µL de Nonidet P-40 10% e agitação vigorosa por 30 s. Após centrifugação (15.000 g, 4 ºC, 30 segundos), o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 80 µL de tampão de extração contendo 20 mM HEPES-KOH [pH 7,9]; 1,5 mM $MgCl_2$; 0,5 mM EDTA; 0,2 mM DTT; 420 mM NaCl; Glicerol 25%; 0,2 mM PMSF; leupeptina (5 µg/ml); aprotinina (15 µg/ml), e incubado por 20 min em gelo. O extrato obtido foi centrifugado (12.000 g, 4 °C, 2 minutos) e o sobrenadante foi separado, correspondendo a fração enriquecida em proteínas nucleares. O método descrito acima foi modificado a partir do descrito por Andrews e Faller (1991), e foi previamente qualificado no músculo esquelético pela determinação do conteúdo histona H1 (marcador nuclear) nas frações. O conteúdo proteico das amostras foi determinado pelo método Bradford e as amostras foram estocadas à –80 ºC até a realização do Western blotting.

4.8.3 Western blotting

Quantidades iguais de proteínas da amostra foram separadas por SDS-PAGE (Sodium Duodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis), conforme método desenvolvido por Laemmli e modificado por Garfin e colaboradores (1990) que envolve um sistema descontínuo de dois géis contíguos para o empacotamento (stacking gel) e separação (resolving gel) das amostras. Após a corrida, foi realizada a transferência eletroforética das proteínas para uma membrana de nitrocelulose Hybond-ECL (Amersham, Buckinghahmshire, Reino Unido), seguindo bloqueio com solução contendo 5% de albumina por 2 horas, e, em seguida, incubação

com anticorpo primário de interesse (GLUT4; p-AMPKα2 $^{Thr\ 172}$; AMPK α2 total e SIRT1). Os anticorpos e a forma de utilização estão detalhados na tabela abaixo.

Tabela 3 - Detalhes dos anticorpos utilizados no Western blotting.

Anticorpo primário	Diluição	Fabricante/Código	Anticorpo secundário (diluição)
Anti-GLUT4	1:3000	Millipore / 07-1404	Anti- IgG coelho (1:10000)
Anti-AMPK	1:1000	Cell Signaling Technologies / #2632	Anti-IgG coelho (1:10000)
Anti-pAMPK	1:1000	Cell Signaling Technologies / #2535	Anti-IgG coelho (1:10000)
Anti-SIRT1	1:1000	Abcam / 1F3	Anti-IgG camundongo (1:2000)

Em seguida foram realizadas lavagens (1 X 15 minutos e 3 X 5 minutos) das membranas com PBS+Tween 1X (0,1%), para que o excesso de anticorpo primário fosse removido, seguindo a incubação com o anticorpo secundário adequado, diluído conforme tabela 1, em solução contendo 1% de albumina. Após duas horas de incubação com o anticorpo secundário, a membrana foi novamente lavada (1X 15 minutos e 3 X 5 minutos) com PBS+Tween 1 X (0,1%), adicionando-se, a seguir, solução de ECL contendo Tris 1M pH 8,5; luminol; ácido pecumárico e peróxido de hidrogênio durante 2 minutos. A intensidade do sinal correspondente das bandas foi expressa em unidades arbitrárias (U.A.) e a normalização feita pela densitometria da respectiva lane, avaliada na membrana previamente corada com Ponceau (KLEIN; KERN; SOKOL, 1995; ROMERO-CALVO et al., 2010).

4.9 Avaliação da metilação de citosinas do DNA na região promotora do gene *Slc2a4*

Abaixo seguem os detalhes dos procedimentos experimentais para avaliar o grau de metilação no DNA.

4.9.1 Extração de DNA genômico

Os músculos sóleo de rato e gastrocnêmio de camundongo foram pulverizados em nitrogênio líquido, e acrescentado de 500 µL de tampão contendo EDTA 0,1 M pH 8,1, Tris-HCL 0,05 M, SDS 0,5% e Proteinase K (2 mg/mL). As amostras foram incubadas overnight à 55 °C. No dia seguinte, foi adicionado 1 volume de fenol, seguido de agitação no vórtex por 10-15 segundos e centrifugação à 4.100 g por 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e ao pellet formado foi acrescentado 1 volume de clorofórmio:álcool isoamil (24:1).

Esta última etapa foi executada duas vezes. Em seguida, foi adicionado ½ volume de acetato de amônio (10 M), homogeneização cuidadosa, seguindo adição de 2 volumes de etanol absoluto (100%) gelado e nova homogeneização cuidadosa. As amostras foram centrifugadas à 4.100 g por 2 minutos e o etanol foi desprezado. Na sequência, o *pellet* foi lavado duas vezes com etanol 70%, seguido de centrifugação e secagem do *pellet*. O *pellet* foi ressuspendido com água livre de nucleases e incubado à 55 °C por 60 minutos. Para determinar a concentração de DNA em cada amostra foi utilizado o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA., EUA).

Antes de passar à próxima etapa, as amostras de DNA (10 µg) foram diluídas em DNA Gel Loading Dye (6 X) (Thermo Fisher Scientific) e aplicadas em um gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio (6 µL/100 mL) para verificação da integridade. Nota: a agarose foi diluída em tampão contendo Tris, Ácido Bórico e EDTA e o mesmo foi utilizado como tampão na corrida eletroforética. Os padrões de corrida foram 90 V por 1 hora. A imagem do gel de verificação da integridade está no APÊNDICE A.

4.9.2 Digestão do DNA com enzimas de restrição

As amostras de DNA genômico (400 ng) foram submetidas à etapa de digestão utilizando as enzimas de restrição (*HpaII e MspI*) e os procedimentos foram realizados conforme determinação do kit EpiJET DNA Methylation Analysis Kit (*MspI*/*HpaII*) (Thermo Fisher Scientific). Em paralelo, o plasmídeo pUC19 foi digerido para verificar a eficiência da digestão das amostras (dado mostrado no APÊNDICE A). Interessante notar que ambas as enzimas reconhecem a sequência de nucleotídeos (5’ CCGG 3’), e clivam essa sequência de maneira distinta. A enzima *MspI* é capaz de clivar a sequência CC, enquanto a enzima *HpaII* é capaz de clivar esta mesma sequência, porém somente quando a citosina interna não estiver metilada (o C 5’ terminal é externo enquanto o outro C a jusante é interno). Por este motivo, este par de enzimas é classificado como isoesquizômeros e dessa forma é possível comparar o grau de metilação (que ocorre no C interno) de amostras de grupos distintos, a partir do padrão de clivagem da enzima *HpaII.*

4.9.3 Desenho dos iniciadores e PCR em tempo real

Para determinar as possíveis sequências de clivagem reconhecidas pelas enzimas (*HpaII* e *MspI*) na região promotora do gene *Slc2a4*, utilizamos o software pDRAW32.

Com base nas sequências de clivagem indicadas pelo software pDRAW32, fizemos o desenho dos iniciadores utilizando o software Primer 3, de forma que o produto gerado na PCR

em tempo real contivesse as sequências (5’ CCGG 3’), permitindo a análise. A ilustração da região promotora do gene *Slc2a4* de rato e camundongo com a localização das sequências de reconhecimento das enzimas de restrição *HpaII* e *MspI*, está apresentada no APÊNDICE B.

O experimento de PCR em tempo real foi realizado com Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen Life Technologies), e cada amostra foi analizada em triplicata. Abaixo seguem as tabelas com as sequências dos iniciadores utilizados para amplificar as regiões do promotor do *Slc2a4* de rato e de camundongo que contêm sequências 5’ CCGG 3’. A numeração nos iniciadores indica a posição da sequência (5’ CCGG 3’) em relação a primeira base da região 5`UTR. Nota-se que para ratos avaliamos apenas 3 das 5 sequências de reconhecimento das enzimas *HpaII* e *MspI*, devido a limitações no desenho dos iniciadores, e para camundongos o mesmo par de iniciadores amplifica uma região contendo as 2 sequências de reconhecimento das enzimas *HpaII* e *MspI*.

Tabela 4 - Sequências dos iniciadores utilizados no PCR e respectivas localizações das sequências 5’CCGG 3’ no promotor do gene Slc2a4 de rato.

Posição sequência CCGG	**Sense**	**Anti-sense**
-781/-778	CATCCCCTCCACACATTTCT	GAGCCTAACGTGGGAGCTAA
-534/-531	GCGTGGAAAGATAGGACGAC	TTTTAGCTCCCACGTTAGGC
-483/-480	GAGCCTAACGTGGGAGCTAA	GGAGGGTATGGGCTAGGTGT

Tabela 5 - Sequências dos iniciadores utilizados no PCR e respectivas localizações das sequências 5’CCGG 3’ no promotor do gene Slc2a4 de camundongo.

Posição sequência CCGG	**Sense**	**Anti-sense**
-483/-480 -432/-429	CCCTTTAAGGCTCCATCTCC	AGGGTACGGGGTAACTCCAG

A fórmula utilizada para determinar a porcentagem de metilação foi:

% metilação = $100 / (1+E)^{Cq2-Cq1}$ em que:

E = Eficiência da reação da PCR;

Cq1 = ciclo de amplificação da amostra não digerida;

Cq2 = ciclo de amplificação da amostra digerida com *HpaII*.

Antes da realização da PCR em tempo real das amostras de DNA digeridas com as enzimas de restrição, fizemos uma curva de eficiência para cada par de iniciadores, fizemos

uma curva de *melt* para verificar a ocorrência de formação de dímeros e corremos um gel de agarose com o produto do PCR no intuito de verificar a formação do *amplicon* no tamanho predito no desenho dos iniciadores (dados não mostrados).

4.10 Imunoprecipitação da cromatina

Primeiramente foi feita a pulverização dos músculos sóleo de ratos e gastrocnêmio de camundongos em PBS 1X. Este material foi incubado com formaldeído por 10 minutos (para o *cross-link*), e a reação foi interrompida adicionando glicina por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado tampão de lise por 2 horas para o rompimento das membranas. Posteriormente o material foi homogeneizado em Douncey e então a cromatina foi fragmentada por sonicação (8 pulsos de 10 segundos cada, com intervalo de 30 segundos entre cada pulso; 35% de amplitude). A cromatina foi rompida em fragmentos de 200 a 1.000 pares de bases. A imagem do gel de agarose das amostras sonicadas está apresentada no APÊNDICE C. Cem microlitros de amostra sonicada (~700 µg de proteína) foram diluídos em tampão (0,1% SDS, 1% Triton X-100, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris pH 8,0) e acrescidos com 20 µL de proteína A sefarose (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) saturada com esperma de salmão, seguido de agitação por 4 horas à 4 ºC. Após esta etapa, uma alíquota de 10 µl foi coletada e usada como "input". O restante do sobrenadante foi incubado com 10 µg de anticorpo anti-H3K9me3, anti-H3KAc, anti-MEF2D ou sem anticorpo ("mock") por 16 horas sob agitação à 4 ºC. Em seguida, foi adicionado 65 µl de proteína A sefarose (GE Healthcare) saturada com esperma de salmão, por 4 horas sob agitação à 4 ºC. O sobrenadante foi descartado e o complexo (proteína A+anticorpo+DNA) foi submetido a diversas lavagens (low salt, high salt, LiCl, TE). Depois, as amostras foram eluídas em tampão (1% SDS, 0,1 M NaHCO3) por 15 minuos sob agitação em temperatura ambiente. Ao sobrenadante foi adicionado NaCl 5 M, seguindo incubação por 16 horas à 65 ºC (para reverter o *cross-link*). Em seguida foi removido RNA e proteína das amostras, adicionando 10 µg de RNAse (por 30 minutos à 37 ºC) e de proteínase K (por 1 hora à 65 ºC), e o DNA foi extraído (pelo método fenol-clorofórmio). Finalmente, 10% do volume final de cada amostra foi utilizado para a análise de qPCR, utilizando o método SYBR (tabelas 7 e 8, confeccionadas por Invitrogen Life Technologies), e os dados foram analisados pela fórmula 2^-(Ct Input – Ct IP) x100. A ilustração da região promotora do gene *Slc2a4* de rato e camundongo com a localização das sequências dos iniciadores está contida na seção APÊNDICE D.

Tabela 6 - Detalhes dos anticorpos utilizados no ensaio de imunoprecipitação da cromatina.

Anticorpo	Fabricante/Código
Anti-H3K9me3	Abcam / ab8898
Anti-H3KAc	Abcam / ab47915
Anti-MEF2D	Santa Cruz / sc-271153

Tabela 7 - Sequências dos iniciadores que amplificam a região -670 a -461 da região promotora do gene Slc2a4 de rato.

	Iniciadores	Amplicon (pb)
Sense	5'CCAGACACGGTTCTCAGACA3'	210
Anti-sense	5'GAAACAATGCCCCGAAGTAA3'	

Tabela 8 - Sequências dos iniciadores que amplificam a região -497 a -288 da região promotora do gene Slc2a4 de camundongo.

	Iniciadores	Amplicon (pb)
Sense	5`CCCTTTAAGGCTCCATCTCC3`	209
Anti-sense	5`ATGTACTTGCCAGGGTACGG3`	

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newnman-Keuls, após aprovação no teste de Bartlett.

6 RESULTADOS

6.1 Dados morfométricos e metabólicos dos ratos portadores de DM1

A tabela 9 ilustra os dados metabólicos obtidos em animais não diabéticos (ND), diabéticos tipo 1 (DM1), diabéticos tipo 1 tratados com insulina (DM1 I) e diabéticos tipo 1 tratados com insulina e resveratrol (DM1 IR).

Tabela 9 - Dados morfométricos e metabólicos de ratos diabéticos tratados após 30 dias de tratamento com insulina e insulina com resveratrol.

	ND	DM1	DM1 I	DM1 IR
Peso corporal (g)	416,0 ± 10,8	294,0 ± 15,7***	354,0 ± 7,4$^{**\#\#\#}$	363,0 ± 9,5$^{**\#\#\#}$
Peso do músculo sóleo (mg)	149,0 ± 9,9	85,0 ± 2,9***	130,0 ± 5,4$^{\#\#\#}$	154,0 ± 8,2$^{\#\#\#}$
Glicemia (mg/dL)	125,2 ± 2,5	502,1 ± 18,7***	140,0 ± 27,5$^{\#\#\#}$	153,0 ± 31,0$^{\#\#\#}$
Glicosúria (mg/24h)	2,7 ± 0,9	234,0 ± 20,9***	162,0 ± 23,7$^{***\#\#}$	59,2 ± 5,4$^{*\#\#\#\S\S\S}$
Frutosamina plasmática (µmol/L)	98,7± 4,3	205,0± 11,0***	138,0± 4,6$^{**\#\#\#}$	84,6± 11,3$^{\#\#\#\S\S\S}$

ND, não diabético; DM1, diabéticos tipo 1 não tratados, DM1 I, DM1 tratados com insulina; DM1 IR, DM1 tratados com insulina e resveratrol. Valores expressos como média ± erro padrão da média (n=9-10), comparados por Análise de Variância (ANOVA) de 1 via e pós-teste Newman-Keuls. *P<0,05, **P<0.01 e ***P<0.001 vs. ND; ##P<0,01 e ###P<0.001 vs. DM1; §§§ vs. DM1 I.

Os animais que receberam estreptozotocina desenvolveram um quadro típico de DM1 verificado por drástico aumento dos valores de glicemia, glicosúria e frutosamina plasmática, e redução da massa corporal e do músculo sóleo. Os animais diabéticos tipo 1 tratados com insulina (DM1 I) recuperaram parcialmente a homeostasia glicêmica, enquanto os animais diabéticos tratados com insulina e resveratrol (DM1 IR) apresentaram melhora adicional no controle glicêmico, evidenciada pela completa recuperação da glicosúria de 24 horas e da frutosamina plasmática.

6.2 Dados morfométricos e metabólicos dos camundongos portadores de DM2

A tabela 10 ilustra os dados morfométricos e metabólicos dos animais não diabéticos, diabéticos tipo 2 (DM2) e diabéticos tipo 2 tratados com resveratrol (DM2 R).

Tabela 10 - Dados morfométricos e metabólicos dos camundongos após 60 dias de tratamento com resveratrol.

	ND	DM2	DM2 R
Peso corporal (g)	43,00±1,06	54,15±1,48***	52,73±1,09***
Comprimento (cm)	10,70±0,17	9,20±0,13***	9,46±0,13***
Índice de Lee	32,67±0,46	40,32±0,52***	39,16±0,40***
Peso do tecido adiposo periepididimal (g)	1,01±0,09	2,07±0,20***	2,39±0,16***
Peso músculo gastrocnêmio (mg)	156,7±6,7	110,0±8,2**	136,6±12,5##
Insulinemia (ng/mL)	0,73±0,28	5,34±0,90***	1,63±0,73##
Glicemia (mg/dL)	132,00±14,02	243,60±18,92***	133,90±8,49###
ITT (%/min)	2,77±0,27	1,22±0,66*	2,74±0,40#
Frutosamina plasmática (µmol/L)	131,8±4,90	202,00±25,80*	118,70±12,80#
Colesterol plasmático (mg/dL)	102,14±7,93	133,73±10,33	116,00±8,59
Triglicerídeo plasmático (mg/dL)	100,02±15,99	195,60±54,53	128,80±42,93

Não diabético (ND); diabético tipo 2 (DM2); DM2 tratado com resveratrol (DM2 R). O índice de Lee foi calculado a partir da seguinte fórmula: (raíz cúbica do peso em gramas) / comprimento naso-anal em centímetros X 100. Valores expressos como média ± erro padrão da média (n=7-10), comparados por Análise de Variância (ANOVA) de 1 via e pós-teste Newman-Keuls. *P<0.05, **P<0.01 e ***P<0.001 vs. ND; #P<0.05, ##P<0.01 e ###P<0.001 vs. DM2.

Conforme podemos observar, aos 6 meses e 3 semanas de idade, os camundongos tratados com MSG (DM2) apresentaram aumento significante de peso corporal e redução do comprimento naso-anal, dado que provocou um aumento no índice de Lee (que corresponde ao índice de massa corporal medido em humanos). A obesidade dos animais MSG é visível, conforme se pode observar na Figura 4.

Figura 4 - Camundongos CD1 com 6 meses e 3 semanas de idade. Em (A) não tratado com MSG e em (B) tratado com MSG, e portador de diabetes tipo 2.

Em relação ao desenvolvimento da massa corporal dos camundongos (Figura 4), observamos que ao longo do período de tratamento com resveratrol não houve alteração importante na evolução do ganho de peso corporal dos animais DM2 (MSG) tratados ou não com resveratrol, o qual evolui. A avaliação do ganho de massa corporal ao longo dos 60 dias de tratamento foi feita pela análise da área sob a curva de peso corporal (Figura 4B).

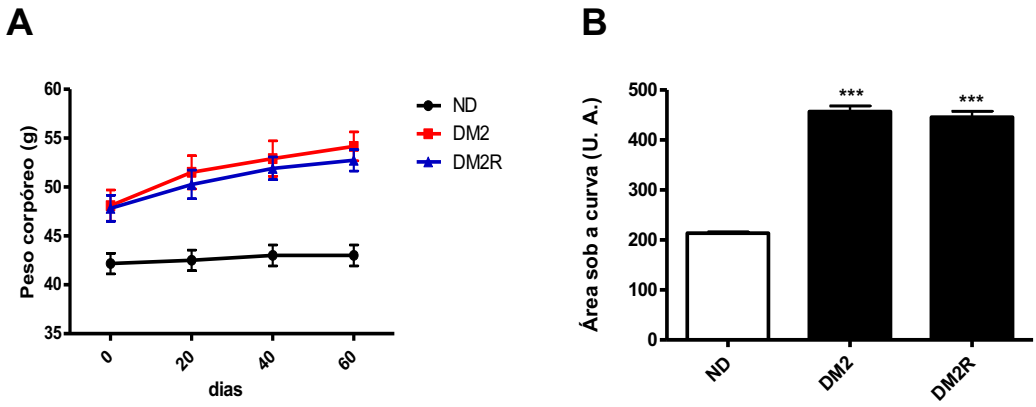


Figura 5 - Em A, evolução do peso corporal durante o período de tratamento com resveratrol. Os valores representados foram dias 0, 20, 40 e 60. Valores expressos como média ± erro padrão da média (n=10). Em B, gráfico da área sob a curva comparados por Análise de Variância (ANOVA) de 1 via e pós-teste Newman-Keuls *P<0.05 e ***P<0.001 vs. ND.

Ainda em relação à obesidade, observamos um aumento no peso do tecido adiposo periepididimal que não se alterou significativamente com o resveratrol. Diferentemente, o peso do músculo gastrocnêmio reduziu no camundongo com DM2, e o tratamento com resveratrol recuperou parcialmente a massa muscular (Tabela 10).

Na Tabela 10 ainda se observa que os animais DM2 apresentaram aumento na glicemia e na frutosamina plasmática, caracterizando um estado diabético. Esse quadro acompanhou-se de aumento na insulinemia, sugerindo uma resistência à ação da insulina, o que foi confirmado pelo teste de tolerância à insulina. O tratamento com resveratrol reverteu completamente essas alterações metabólicas detectadas nos camundongos com DM2.

Com relação aos valores de colesterol e triglicerídeo plasmáticos, não foi detectado nenhuma diferença significante entre os grupos, apesar de haver uma ligeira tendência de aumento nos animais DM2 e recuperação desse parâmetro após o tratamento com resveratrol.

6.3 Consumo alimentar e hídrico dos camundongos portadores de DM2

Conforme os dados apresentados na tabela 11, não houve diferença estatística nos dados de consumo alimentar e hídrico entre os animais ND, DM2 e DM2 R. No entanto, apesar disso, observamos que os animais DM2 apresentaram consumo hídrico aproximadamente 40 % maior comparado aos animais não diabéticos. A estimativa de consumo de ambas as variáveis foi realizada pelo cálculo do consumo absoluto da caixa divido pelo número de animais contidos na mesma.

Tabela 11 - Consumo alimentar e hídrico dos camundongos.

	ND	**DM2**	**DM2 R**
Consumo alimentar (g/dia)	5,89 ± 0,81	6,39 ± 1,00	5,12 ± 0,84
Consumo hídrico (mL/dia)	6,81 ± 0,97	9,61 ± 1,71	8,22 ± 1,65

Não diabético (ND); diabético tipo 2 (DM2); DM2 tratado com resveratrol (DM2 R). Valores expressos como média ± erro padrão da média (n=10), comparados por Análise de Variância (ANOVA) de 1 via e pós-teste Newman-Keuls.

6.4 Avaliação da expressão do gene *Slc2a4* por PCR em tempo real

A figura 6 mostra que, no músculo sóleo, a expressão do gene *Slc2a4* reduziu nos ratos DM1 (~60%), e o tratamento com insulina ou insulina com resveratrol foram igualmente eficientes em restaurar os níveis de expressão do gene *Slc2a4*. Portanto, não verificamos efeito aditivo do tratamento com resveratrol sobre a expressão do gene *Slc2a4*.

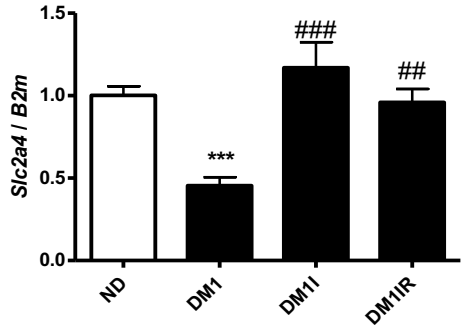


Figura 6 - Expressão do gene Slc2a4 dos ratos não diabéticos (ND), diabéticos tipo 1 (DM1), diabéticos tipo 1 tratados com insulina (DM1 I) e diabéticos tipo 1 tratados com insulina e resveratrol (DM1 IR). O gene de referência utilizado foi o beta-2- microglobulina (B2m). Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=6). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. ***P<0.001vs. ND, ##P<0.01 e ###P<0.001 vs. DM1.

A figura 7 mostra que, no músculo gastrocnêmio, a expressão do gene *Slc2a4* reduziu significantemente nos camundongos DM2 (~32%) e o tratamento com resveratrol reverteu parcialmente esse parâmetro, elevando esses valores significantemente (~25%) comparado aos animais DM2.

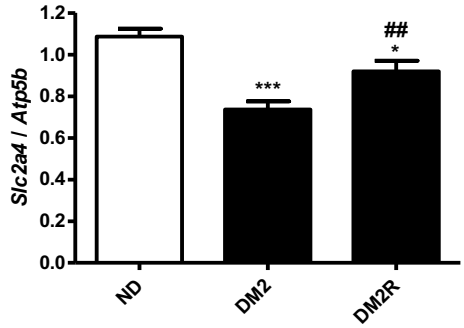


Figura 7 - Expressão do gene Slc2a4 no músculo gastrocnêmio de camundongos não diabéticos (ND), diabéticos tipo 2 (DM2) e diabéticos tipo 2 tratados com resveratrol (DM2 R). Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=7). Foi utilizado o gene de referência utilizado foi a subunidade beta do complexo mitocondrial F1, transportador H^+, da ATP sintase (Atp5b). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. *P<0.05, ***P<0.001 vs. ND e ##P<0.01 vs. DM2.

6.5 Avaliação do conteúdo total de proteína GLUT4

A figura 8 mostra que a expressão de GLUT4 total reduziu em músculo de ratos DM1 (~57%). Os animais DM1 tratados com insulina ou com insulina mais resveratrol restabeleceram o nível de GLUT4 total em relação aos animais não diabéticos. Assim, mais uma vez, não detectamos efeito aditivo do tratamento com resveratrol na expressão do GLUT4.

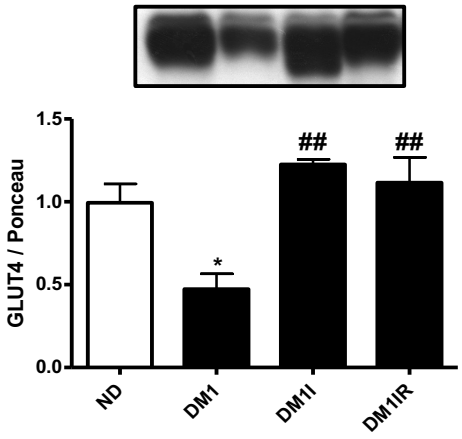


Figura 8 - Expressão de GLUT4 total nos animais não diabéticos (ND), diabéticos tipo 1 (DM1), diabéticos tipo 1 tratados com insulina (DM1 I) e diabéticos tipo 1 tratados com insulina e resveratrol (DM1 IR). A imagem de Ponceau foi utilizada para a normalização da análise. Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=6). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. *P<0.05 vs. ND; ##P<0.01 vs. DM1.

A figura 9 mostra que a expressão de GLUT4 total em músculo de camundongos reduziu nos animais DM2 (~50%), e o tratamento com resveratrol recuperou esse parâmetro ao nível dos animais não diabéticos.

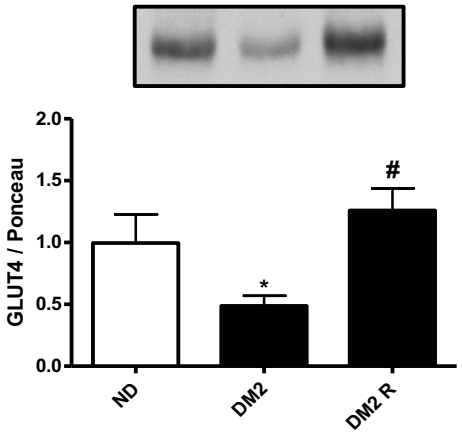


Figura 9 - Expressão proteica total de GLUT4 no músculo gastrocnêmio de animais não diabéticos (ND), diabéticos tipo 2 (DM2) e diabéticos tipo 2 tratados com resveratrol (DM2 R). A imagem de Ponceau foi utilizada para a normalização da análise. Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=6). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. *P<0.05 vs. ND; #P<0.05 vs. DM2.

6.6 Avaliação do grau de metilação no DNA na região promotora do gene *Slc2a4* em músculo de rato DM1

As análises epigenéticas não foram realizadas nos ratos DM1 tratados com insulina e resveratrol (DM1 IR) pelo fato de não termos detectado efeito aditivo significante do tratamento com resveratrol na expressão do gene *Slc2a4* em comparação aos animais diabéticos tratados apenas com insulina (figura 6).

As figuras 10 e 11 mostram que o grau de metilação das citosinas localizadas nas sequências 5` CCGG 3` localizadas nas posições -483/-480 e -534/-531 da região promotora do gene *Slc2a4* em músculo sóleo não variou entre os grupos experimentais.

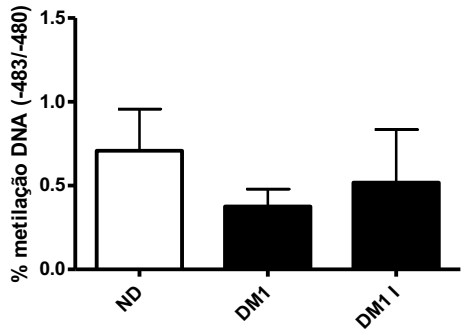


Figura 10 - Porcentagem de metilação do DNA na região promotora do gene Slc2a4, na sequência 5' CCGG 3' localizada na posição -483/-480 relativa a primeira base da região 5`UTR (+1), em músculo sóleo de ratos não diabéticos (ND), diabéticos tipo 1 (DM1) e diabéticos tipo 1 tratados com insulina (DM1 I). Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=7). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls.

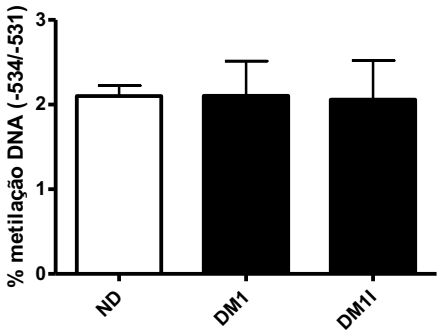


Figura 11 - Porcentagem de metilação do DNA na região promotora do gene Slc2a4, na sequência 5' CCGG 3' localizada na posição -534/-531 relativa a primeira base da região 5`UTR (+1), em músculo sóleo de ratos não diabéticos (ND), diabéticos tipo 1 (DM1) e diabéticos tipo 1 tratados com insulina (DM1 I). Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=7). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls.

Entretanto, na figura 12 observa-se que o grau de metilação da sequência -781/-778 do *Slc2a4* reduziu significantemente nos animais DM1 (~42%); e o tratamento com insulina restaurou parcialmente esse parâmetro.

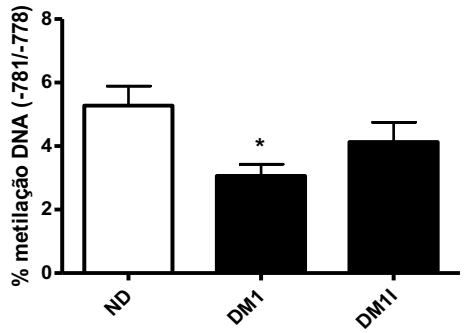


Figura 12 - Porcentagem de metilação do DNA na região promotora do gene Slc2a4, na sequência 5' CCGG 3' localizada na posição -781/-778 relativa a primeira base da região 5`UTR (+1), em músculo sóleo de ratos não diabéticos (ND), diabéticos tipo 1 (DM1) e diabéticos tipo 1 tratados com insulina (DM1 I). Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=7). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. *P<0.05 vs. ND.

6.7 Avaliação do grau de metilação no DNA na região promotora do gene *Slc2a4* em músculo de camundongo DM2

A figura 13 mostra que o grau de metilação do DNA na região promotora do gene *Slc2a4* de músculo gastrocnêmio de camundongos DM2 aumentou (263%) e o tratamento com resveratrol reverteu esse dado.

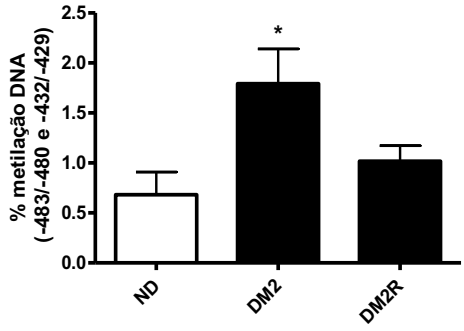


Figura 13 - Porcentagem de metilação do DNA na região promotora do gene Slc2a4, nas sequências 5' CCGG 3' localizadas nas posições –483/-480 e -432/-429 relativa a primeira base da região 5`UTR (+1), em músculo gastrocnêmio de ratos não diabéticos (ND), diabéticos tipo 2 (DM2) e diabéticos tipo 2 tratados com resveratrol (DM2 R). Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=7). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. *P<0.05 vs. ND.

6.8 Avaliação do conteúdo de H3 acetilada e metilada na região -670/-461 do promotor do gene *Slc2a4* de rato DM1

A figura 14A mostra a porcentagem relativa ao input entre a amostra "mock" e o grupo de animais não diabéticos, enquanto que a figura 14B mostra que na região -670/-461 do promotor do gene *Slc2a4*, o conteúdo relativo de histona H3 acetilada nos resíduos do aminoácido lisina nas posições 9, 14, 18, 23 e 27 da extremidade N-terminal reduziu (~ 49%) significantemente nos animais DM1. O tratamento com insulina (DM1 I) restaurou parcialmente esse parâmetro.

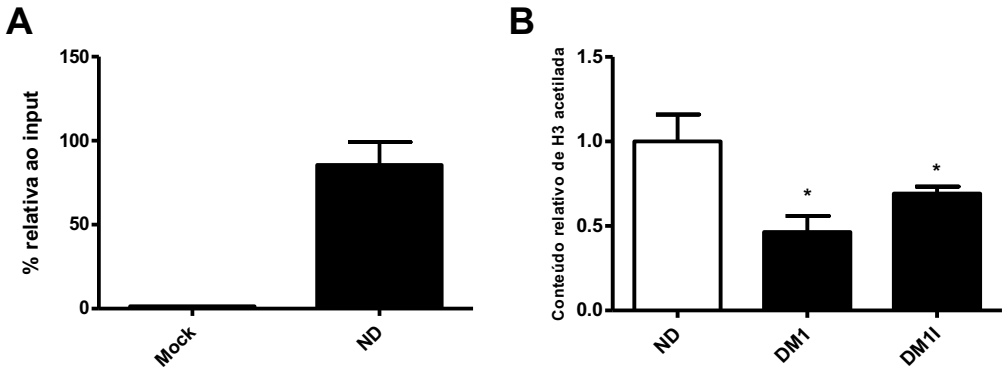


Figura 14 - Em A, % relativa ao input entre a amostra mock e o grupo de animais não diabéticos (ND). Em B, conteúdo relativo de histona H3 acetilada (K9+14+18+23+27) na região -670/-461 do promotor do gene Slc2a4 em músculo sóleo de ratos não diabéticos (ND), diabéticos tipo 1 não tratado (DM1) e diabéticos tipo 1 tratados com insulina (DM1 I). Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=4). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. *P<0.05 vs. ND.

A figura 15A mostra a porcentagem relativa ao input entre a amostra "mock" e o grupo de animais não diabéticos, enquanto que a figura 15B mostra que, na região promotora do gene *Slc2a4*, o conteúdo relativo de histona H3 trimetilada no resíduo do aminoácido lisina na posição 9 da extremidade N-terminal aumentou significantemente nos músculos de ratos DM1 (~ 112%); e o tratamento com insulina (DM1 I) reduziu em nível menor que dos animais não diabéticos (~60%).

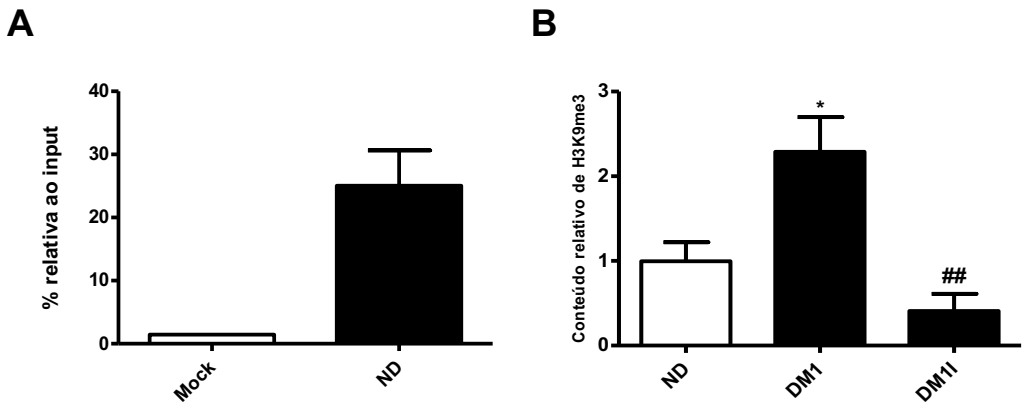


Figura 15 - Em A, % relativa ao input entre a amostra mock e o grupo de animais não diabéticos (ND). Em B, conteúdo relativo de histona H3 trimetilada na posição lisina 9 na região -670/-461 do promotor do gene Slc2a4 em músculo sóleo de ratos não diabéticos (ND), diabéticos tipo 1 não tratado (DM1) e diabéticos tipo 1 tratados com insulina (DM1 I). Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=4). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. *P<0.05 vs. ND e ##P<0.01 vs. DM1.

6.9 Avaliação da ligação do MEF2D na região promotora do gene *Slc2a4* de rato DM1

A Figura 16A mostra a porcentagem relativa ao input entre a amostra "mock" e o grupo de animais não diabéticos, enquanto que a figura 16B mostra que, na região promotora do gene *Slc2a4*, o conteúdo relativo de ligação de MEF2A/D reduziu no DM1 (37%) e o tratamento com insulina (DM1 I) reverteu parcialmente esse dado.

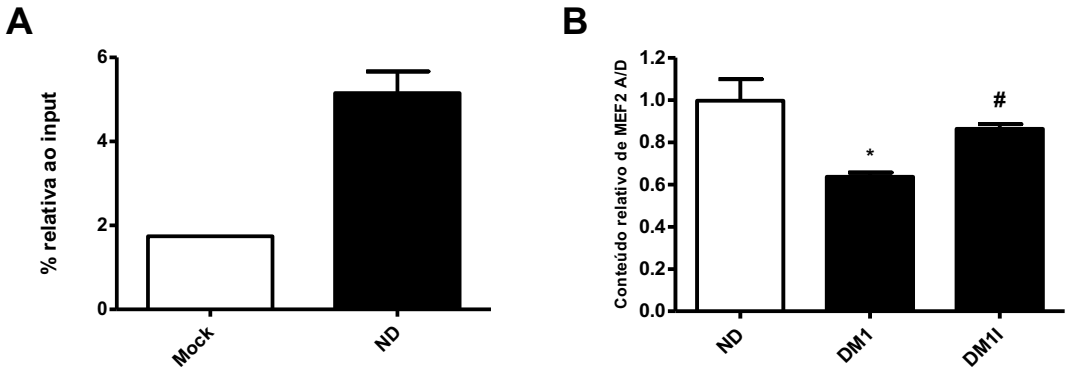


Figura 16 - Em A, % relativa ao input entre a amostra mock e o grupo de animais não diabéticos (ND). Em B, conteúdo relativo de MEF2A/D na região -670/-461 do promotor do gene Slc2a4 em músculo sóleo de ratos não diabéticos (ND), diabéticos tipo 1 não tratado (DM1) e diabéticos tipo 1 tratados com insulina (DM1 I). Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=4). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. *P<0.05 vs. ND e #P<0.05 vs. DM1.

6.10 Avaliação do conteúdo de H3 acetilada e metilada na região -498/-298 do promotor do gene *Slc2a4* de camundongo DM2

A figura 17A mostra a porcentagem relativa ao input entre a amostra "mock" e o grupo de animais não diabéticos, enquanto que a figura 17B mostra que, na região -498/298 do promotor do gene *Slc2a4*, o conteúdo relativo de histona H3 acetilada nos resíduos do aminoácido lisina nas posições 9, 14, 18, 23 e 27 da extremidade N-terminal aumentou significantemente. O tratamento com resveratrol (DM2 R) não alterou esse dado.

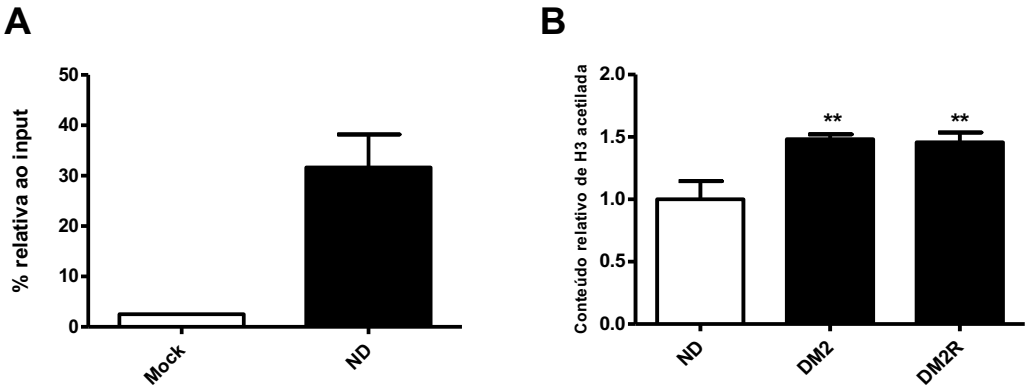


Figura 17 - Em A, % relativa ao input entre a amostra mock e H3 acetilada (K9+14+18+23+27) na região -498 a -298 do promotor do gene Slc2a4 em músculo gastrocnêmio de camundongos não diabéticos (ND). Valores expressos em % relativa ao input ± erro padrão da média. Em B, conteúdo de histona H3 acetilada (K9+14+18+23+27) na região -498 a -298 do promotor do gene Slc2a4 em músculo gastrocnêmio de camundongos não diabéticos (ND), diabéticos tipo 2 (DM2) e diabéticos tipo 2 tratados com resveratrol (DM2 R). Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=4). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. **P<0.01 vs. ND.

A figura 18A mostra a porcentagem relativa ao input entre a amostra "mock" e o grupo de animais não diabéticos, enquanto que a figura 18B mostra que, na região promotora do gene *Slc2a4*, o conteúdo relativo de histona H3 trimetilada no resíduo do aminoácido lisina na posição 9 da extremidade N-terminal aumentou significantemente nos músculos de camundongos DM2 (~ 27%); e o tratamento com resveratrol (DM2 R) reduziu em nível menor que dos animais não diabéticos (~ 30%).

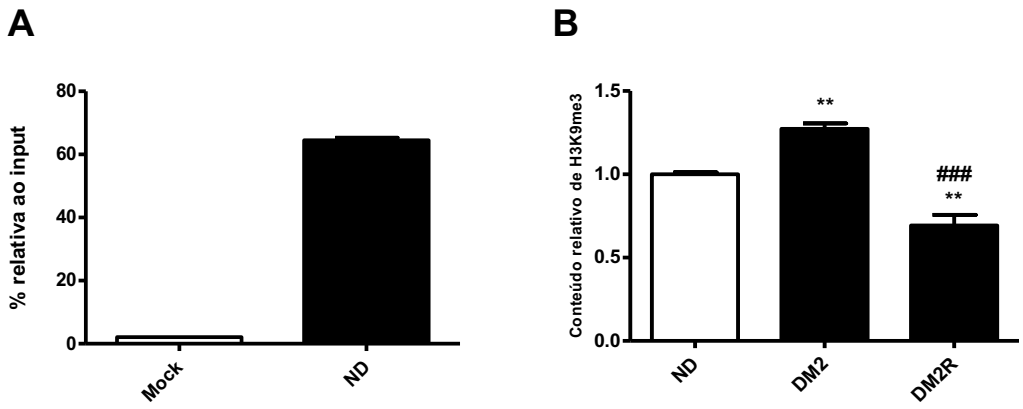


Figura 18 - Em A, % relativa ao input entre a amostra mock e H3K9me3 na região -498 a -298 do promotor do gene Slc2a4 em músculo gastrocnêmio de camundongos não diabéticos (ND). Valores expressos em % relativa ao input ± erro padrão da média. Em B, conteúdo de histona H3K9me3 na região -498 a -298 do promotor do gene Slc2a4 em músculo gastrocnêmio de camundongos não diabéticos (ND), diabéticos tipo 2 (DM2) e diabéticos tipo 2 tratados com resveratrol (DM2 R). Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=4). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. **P<0.01 vs. ND, ###P<0.001 vs. DM2.

6.11 Avaliação do conteúdo de SIRT1 nuclear e citosólica em músculo de rato DM1

A figura 19A mostra que o conteúdo de SIRT1 nuclear aumentou em músculo de ratos DM1 (~44%), e o tratamento com insulina ou insulina e resveratrol reverteu esse aumento. A figura 19B mostra que o conteúdo de SIRT1 aumentou em fração de proteínas citosolólicas do músculo dos ratos DM1 tratado com insulina e resveratrol (~70%) em relação aos demais grupos experimentais.

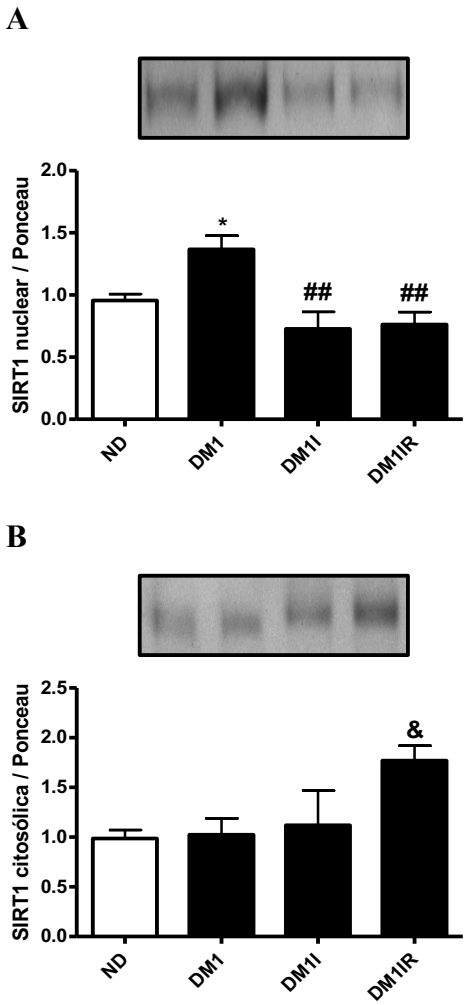


Figura 19 - Conteúdo nuclear (A) e citosólico (B) de SIRT1 em amostras de músculo sóleo de animais não diabéticos (ND), diabéticos não tratado (DM1), diabéticos tipo 1 tratados com insulina (DM1 I) e diabéticos tipo 1 tratados com insulina e resveratrol (DM1 IR). A imagem de Ponceau foi utilizada para a normalização da análise. Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=7). *P<0.05 vs. ND; ##P<0.01 vs. DM1, &P<0.05 vs. todos os grupos.

6.12 Avaliação do conteúdo de SIRT1 nuclear e citosólica em músculo de camundongo DM2

A figura 20A mostra que o conteúdo de SIRT1 nuclear aumentou em músculo de camundongos DM2 tratados com resveratrol (~220%) em comparação aos demais animais. Não foi detectada diferença significante entre os animais não diabéticos e diabéticos tipo 2. A figura 20B mostra que o conteúdo de SIRT1 citosólica uma tendência à aumento em músculo de camundongos DM2 tratados com resveratrol (~56%) em comparação aos demais animais. Não foi detectada diferença significativa entre os animais não diabéticos e diabéticos tipo 2.

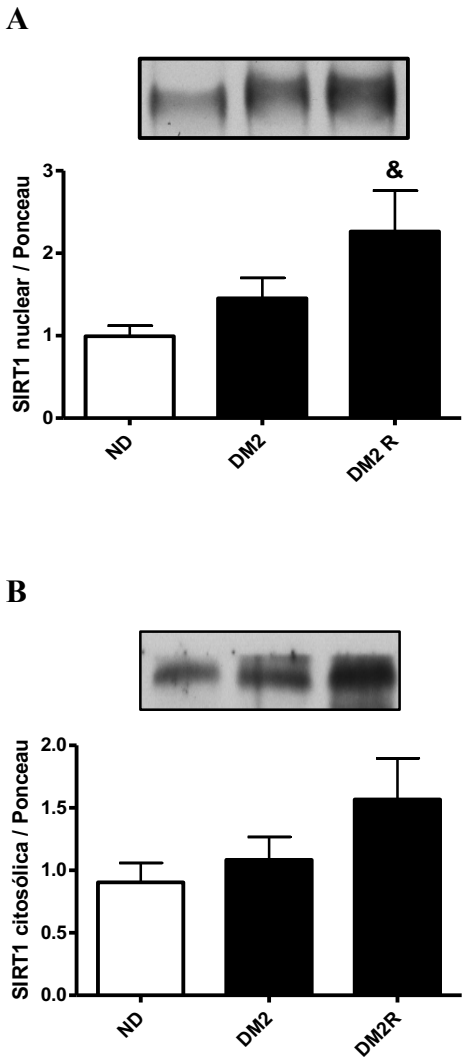


Figura 20 - Conteúdo nuclear (A) e citosóico (B) de SIRT1 em amostras de músculo gastrocnêmio de animais não diabéticos (ND), diabéticos tipo2 (DM2), diabéticos tipo 2 tratados com resveratrol (DM2 R). A imagem de Ponceau foi utilizada para a normalização da análise. Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=5 para nuclear e n=4 para citosólica). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. &P<0.05 vs. todos os grupos.

6.13 Avaliação da expressão da proteína AMPK em músculo de rato DM1

A figura 21A mostra que a expressão proteica de AMPK total não alterou significantemente entre os grupos experimentais. A figura 21B mostra que o conteúdo de AMPKα2 fosforilada reduziu nos músculos de ratos DM1 (~57%), e tanto em ratos DM1 tratados com insulina quanto os tratados com insulina e resveratrol recuperaram a atividade de AMPK.

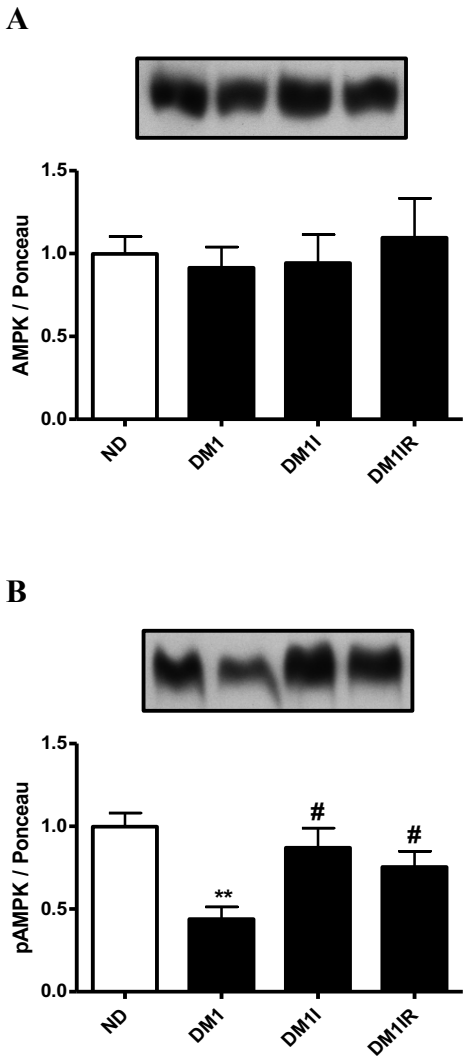


Figura 21 - Conteúdo de AMPK total (A) e fosforilado (B) em músculo de ratos não diabéticos (ND), diabéticos tipo 1 não tratado (DM1), diabéticos tipo 1 tratados com insulina (DM1 I) e diabéticos tipo 1 tratados com insulina e resveratrol (DM1 IR). A imagem de Ponceau foi utilizada para a normalização da análise. Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=7). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls.**P<0.01 vs. ND; #P<0.05 vs. DM1.

6.14 Avaliação da expressão da proteína AMPK em músculo de camundongo DM2

A figura 22A mostra que a expressão proteica total de AMPK não alterou significantemente entre os grupos experimentais. A figura 22B mostra que o conteúdo de AMPKα2 fosforilada reduziu nos músculos de camundongos DM2 (~33%), e o tratamento com resveratrol recuperou a atividade de AMPK.

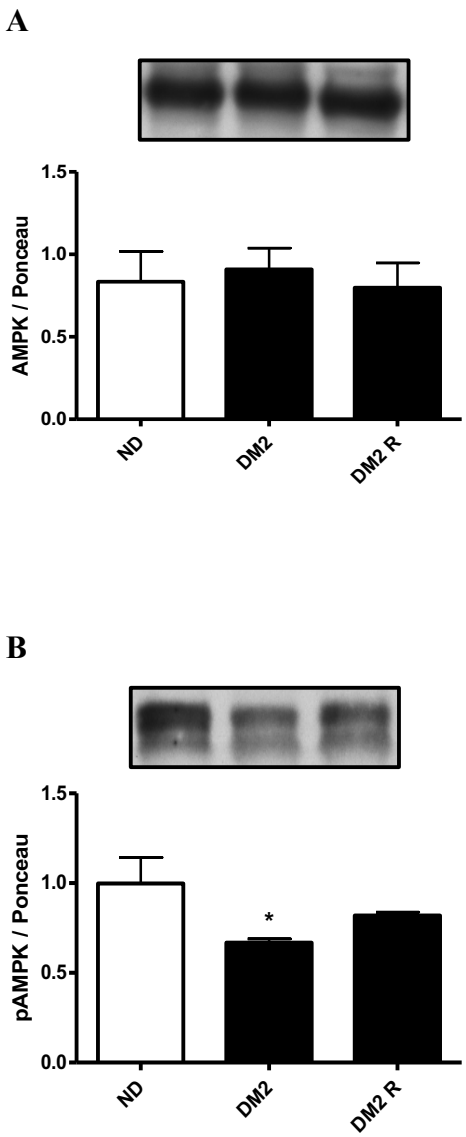


Figura 22 - Expressão de AMPK α2 total (A) e fosforilada (B) em músculo gastrocnêmio de camundongos não diabéticos (ND), diabéticos tipo 2 (DM2) e diabéticos tipo 2 tratados com resveratrol (DM2 R). A imagem de Ponceau foi utilizada para a normalização da análise. Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=5). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. *P<0.05 vs. ND.

O quadro abaixo resume os resultados referentes às possíveis alterações epigenéticas envolvidas na regulação da expressão do gene *Slc2a4* e poderá ser utilizado como material de consulta rápida para melhor compreensão da discussão que virá em seguida.

Quadro 1 - Resumo de resultados de expressão Slc2a4 e de alterações epigenéticas.

	DM1	**DM1 I**	**DM2**	**DM2R**
Slc2a4	↓	↑	↓	↑
H3 Ac	↓	—	↑	—
H3K9me3	↑	↓	↑	↓
SIRT1 nuclear	↑	↓	—	↑

As colunas DM1 e DM2 representam variações relativas aos seus respectivos ND.
DM1 I é relativo à DM1.
DM2R é relativo à DM2.

7 DISCUSSÃO

O presente trabalho almejou investigar de modo inédito o papel do tratamento com resveratrol sobre a regulação da homeostasia glicêmica e a participação de mecanismos epigenéticos reguladores da transcrição do gene *Slc2a4* em músculo esquelético, de ratos diabéticos tipo 1 (DM1) tratados com insulina e de camundongos diabéticos tipo 2 (DM2). Em ambos os modelos verificamos que o tratamento com resveratrol melhorou a sensibilidade à insulina, avaliada no organismo como um todo, melhorando o controle glicêmico. Destaque-se que, no DM1, o efeito do resveratrol foi coadjuvante ao da insulina. Adicionalmente, caracterizamos alguns mecanismos epigenéticos envolvidos na repressão do gene *Slc2a4* induzida tanto no DM1 como no DM2, que foram revertidos totalmente pelo tratamento com insulina no DM1 e parcialmente pelo tratamento com resveratrol no DM2. Por fim, demonstramos os efeitos do resveratrol sobre as alterações epigenéticas no gene *Slc2a4* em músculo esquelético podem ser mediados pela SIRT1.

A estreptozotocina é utilizada para indução de diabetes em murinos há muitas décadas, e sabidamente causa necrose e apoptose nas células B das ilhotas pancreáticas, comprometendo diretamente a síntese e secreção de insulina (LENZEN, 2008; MURATA et al., 1999). O resultado disso é a instalação de um quadro semelhante ao DM1, caracterizado por importante perda de peso, hiperglicemia grave com aumento de frutosamina plasmática, níveis de insulina plasmática muito baixos, poliúria e glicosúria. Nessa situação, o tratamento com dose única de insulina, conforme era esperado, não foi capaz de recuperar completamente a homeostasia glicêmica, dado que evidencia a dificuldade de obtenção de um bom controle glicêmico com a insulinoterapia (VORA; HEISE, 2013), e que reforça a importância de se investigar tratamentos que possam servir como coadjuvantes efetivos à insulinoterapia (DEGEETER; WILLIAMSON, 2016).

Nessa linha de proposta, a adição de resveratrol ao tratamento com insulina em animais DM1 amplificou a melhora do controle glicêmico, conforme observado pela redução da frutosamina plasmática e da glicosúria de 24 horas, ambos parâmetros que refletem o controle glicêmico em médio prazo. A frutosamina é uma cetoamina formada a partir da união estável de moléculas de glicose e de proteínas por uma reação não enzimática de glicação (ARMBRUSTER, 1987). A concentração de frutosamina plasmática indica a qualidade do controle glicêmico em médio prazo (2 a 3 semanas em humanos), e elevadas concentrações indicam descontrole da homeostasia glicêmica (YOUSEFF et al., 2008). Portanto, a redução na concentração de frutosamina plasmática apresentada com a adição do resveratrol evidencia que

esse composto atuou eficientemente como um agente coadjuvante ao tratamento com insulina em ratos DM1.

Há diversos estudos sugerindo que o resveratrol seja capaz de melhorar a homeostasia glicêmica em modelos de DM1 (CHI et al., 2007; GENCOGLU et al, 2015; PENUMATSHA et al, 2008; SILAN, 2008). No entanto, a eficácia de tais tratamentos deve ser contestada, uma vez que as reduções glicêmicas descritas são de 525 para 450 mg/dL (CHEN et al., 2011) e de 469 para 373 mg/dL (GENCOGLU et al., 2015) e, portanto, persistindo níveis muito elevados de glicemia após o tratamento com resveratrol (~350 mg/dL). Além disso, nesses estudos os animais DM1 não foram tratados com insulina, conduta esta proscrita em portadores de DM1. Esses fatos ressaltam a originalidade e a relevância de nosso desenho experimental, no qual o resveratrol foi investigado como coadjuvante à insulinoterapia no DM1.

O músculo esquelético é um importante território regulador da homeostasia glicêmica, pois é potente clareador da glicose sanguínea, e participa de maneira importante na fisiopatologia do DM (KOISTINEN; ZIERATH, 2002). No músculo sóleo de animais DM1, a expressão do gene *Slc2a4* e da proteína GLUT4 reduziu significantemente, o que certamente prejudica a capacidade do músculo em clarear a glicose extracelular. O tratamento com insulina foi eficiente em recuperar a expressão de *Slc2a4*/GLUT4, o que se acompanhou de recuperação da homeostasia glicêmica. De fato, estudos em músculo esquelético, *in vitro*, já indicaram que a insulina é capaz de estimular a expressão do mRNA do *Slc2a4* e da proteína GLUT4 (MORAES et al., 2014). Esse efeito da insulinoterapia sobre a expressão de *Slc2a4*/GLUT4, entretanto, não foi modificado pela adição do tratamento com resveratrol, apesar desse tratamento ter ampliado a melhora da homeostasia glicêmica. Esses resultados sugerem a participação de outros territórios, que não o músculo esquelético, na melhora do controle glicose pelo resveratrol. De fato, experimentos paralelos indicaram que o tratamento com resveratrol intensificou os efeitos da insulina no território hepático, promovendo maior inibição da expressão dos genes *Pck1* e *G6pc*, bem como da proteína GLUT2, sugerindo maior supressão do efluxo de glicose hepático, o que contribui para o melhor controle da glicemia observado após o tratamento com resveratrol. Esses resultados já foram publicados (YONAMINE et al., 2016) e podem ser consultados no ANEXO.

Em ratos DM1 já foi descrito que o resveratrol, isoladamente, é capaz de aumentar a expressão da proteína GLUT4, com a mesma eficácia da insulina (CHI et al., 2007). No entanto, esse estudo deve ser visto com muita cautela, pois nele a média da glicemia caiu de 432 para 360 mg/dL em resposta ao resveratrol, e nenhum marcador de controle glicêmico em

médio/longo prazo foi avaliado. Ainda, mais uma vez ressaltamos inadmissibilidade da ausência do tratamento com insulina em portadores de DM1.

Confirmado que o resveratrol foi um eficiente agente coadjuvante ao tratamento com insulina sobre a homeostasia glicêmica de animais DM1, o nosso próximo passo foi verificar se o tratamento com resveratrol promovia benefícios semelhantes sobre a homeostasia glicêmica no modelo de DM2, e, se nesse caso o músculo esquelético participaria dessa regulação, avaliando a expressão de *Slc2a4*/GLUT4 como marcador dessa participação.

A indução de DM2 consistiu em injeções de glutamato monosódico (MSG) em camundongos CD1 durante o período neonatal. OLNEY (1969) foi um dos primeiros autores a descrever que injeções de MSG em camundongos Swiss neonatos promovia evidentes lesões causadas por necrose neuronal em diversas áreas do cérebro, destacando os núcleos arqueado e paraventricular, e estendendo-se a eminência mediana. Esses danos promovem prejuízos no eixo endócrino hipotalâmico-hipofisário (MORRIS et al., 1998) na vida adulta, que incluem redução na secreção de hormônio do crescimento, o que explica a deficiência de crescimento corporal dos animais (MAITER et al., 1991), e contribuiu para a obesidade. Outra alteração importante promovida pelo MSG é a redução no tônus simpático direcionado ao tecido adiposo marrom, o que reduz a atividade termogênica deste tecido, e, portanto, o gasto energético, contribuindo para o acúmulo de gordura corporal (BUNYAN; MURRELL; SHAH, 1976). Além disso, como consequência da obesidade, esses animais desenvolvem resistência insulina com hiperglicemia e hiperinsulinemia. Uma vez que a glicemia de camundongos MSG alcança níveis superiores a 200 mg/dL (MACHADO et al.,1994; PAPA et al., 1997), esses animais têm sido utilizados como modelo de DM2. Ainda não há estudo, em longo prazo, demonstrando o estabelecimento da falência pancreática desses animais, talvez devido à grande capacidade proliferativa da célula beta nessa espécie e/ou menor resposta apoptótica.

O tratamento de camundongos DM2 com resveratrol durante 60 dias não foi capaz de atenuar a obesidade, embora o resveratrol já tenha sido descrito como capaz de atenuar o ganho de peso corporal de camundongos obesos por dieta hiperlipídica, e assim melhorar a homeostasia glicêmica (KIM et al., 2011). Curiosamente, apesar da massa corporal e do tecido adiposo periepididimal DM2 não ter reduzido com o resveratrol, a massa muscular parece ter aumentado, o que sugere que outros territórios adiposos possam ter apresentado alguma redução de massa, porém como este não é o principal foco do presente trabalho, essa questão não foi aprofundada. Outro motivo que devemos considerar a respeito da evolução da adiposidade em nossos animais tratados com resveratrol é o tempo de tratamento, que na maioria dos estudos

que relatam perda de peso é de 9 a 15 semanas, sendo que o nosso foi de apenas 8 semanas (BAUR et al., 2006; LAGOUGE et al., 2006; MENDES et al., 2016; QUIAO et al., 2014).

Verificamos que houve uma tendência a aumento do consumo hídrico nos animais DM2, o que parece ter apresentado uma pequena redução nos animais tratados com resveratrol, embora nenhuma dessas alterações tenha sido estatisticamente significante. No DM2, a hiperglicemia grave induz glicosúria, que leva a poliúria, que por sua vez leva a aumento da ingestão hídrica. Por isso, um aumento da ingestão hídrica nos animais DM2 seria bastante razoável, assim como sua redução em resposta ao resveratrol que reduziu a glicemia a níveis abaixo do limiar de reabsorção renal de glicose.

Em relação ao consumo alimentar, também nenhuma alteração estatística foi observada entre os grupos. Isso era esperado para os animais DM2 (MSG), que têm sido descritos como normofágicos, ou até mesmo como hipofágicos quando se avalia a ingestão calórica relativa ao peso corporal (DE PAPA CARVALHO et al., 2002). Entretanto, o tratamento com resveratrol promoveu uma redução (não estatisticamente significante) de 19,8% na ingestão alimentar, o que poderia representar um ajuste à interrupção da perda de energia na urina (glicosúria), devido à normalização da glicemia.

Apesar de não termos observado redução de ganho de peso, o resveratrol melhorou significantemente a sensibilidade à insulina e a homeostasia glicêmica. Esse efeito metabólico foi evidenciado pela redução da insulinemia, da glicemia e da frutosamina plasmática, assim como pelo aumento do decaimento da glicemia no teste de tolerância à insulina. Esses achados corroboram estudos da literatura que demonstraram que o tratamento com resveratrol aumenta a sensibilidade periférica à insulina e reduz a insulinemia em condições de resistência à insulina (JEON et al., 2012; KANG et al., 2012), incluindo estudos em humanos portadores de DM2 (BHATT; THOMAS; NANJAN, 2012; BRASNYÓ et al., 2011; CRANDALL et al., 2012). Destaca-se que esse efeito benéfico foi observado na ausência de emagrecimento, imputando diretamente ao resveratrol um importante efeito metabólico.

Em relação à participação do músculo esquelético na perda do controle glicêmico nos animais DM2 (tratamento neonatal com MSG), observamos redução importante na expressão do mRNA *Slc2a4* (33%) e da proteína GLUT4 (50%), essa última, certamente comprometendo o clareamento da glicose pelo músculo esquelético. Diminuição de GLUT4 já foi descrita em músculo de camundongos MSG (DE CARVALHO PAPA et al., 2002; MACHADO et al. 1993; PAPA et al., 1997), entretanto, diminuição da expressão do mRNA nunca foi claramente demonstrada. Além disso, a comparação entre a porcentagem de redução do mRNA (32%) e da

proteína (50%) sugere que alguma regulação pós-trancricional esteja ocorrendo, a qual exacerba a repressão da expressão gênica.

Quanto ao tratamento dos camundongos DM2 com resveratrol, observou-se um aumento significante (25%, P<0,01) no conteúdo do mRNA do *Slc2a4*, o qual, entretanto, não retornou aos valores de ND. Porém, essa recuperação parcial do mRNA do *Slc2a4* foi acompanhada por recuperação total da expressão de GLUT4, também sugerindo a presença de regulação pós-transcricional na expressão do *Slc2a4*. O efeito do resveratrol em camundongo DM2 somente foi investigado em camundongo db/db, nos quais foi descrito aumento de GLUT4 (MINAKAWA et al., 2011).

No músculo esquelético dos animais DM1 não houve efeito do resveratrol (aditivo ao da insulina) na expressão do *Slc2a4*, provavelmente pelo fato de que o tratamento com insulina já tenha recuperado a expressão desse mRNA a valores semelhantes aos de animais ND. Por conseguinte, não prosseguimos a investigação da regulação epigenética do *Slc2a4* em animais DM1 tratados com insulina + resveratrol. Já no músculo esquelético dos animais DM2, o resveratrol promoveu evidente aumento na expressão do mRNA do *Slc2a4*, e, portanto, mecanismos epigenéticos potencialmente envolvidos foram investigados nessa condição.

A investigação de mecanismos envolvidos nas alterações de expressão do gene *Slc2a4* tem sido objeto de estudo de diversos grupos de pesquisa (IM et al., 2007; KARNIELI, ARMONI, 2008; SANTALUCIA et al., 2001; ZORZANO, PALACÍN, GUMÀ, 2005); entretanto, regulações epigenéticas (metilação do DNA e modificações pós-traducionais das histonas) na região promotora do gene *Slc2a4* no DM nunca foram investigadas, o que deve ampliar muito o conhecimento sobre a expressão do gene *Slc2a4*.

A análise do grau de metilação da citosina de três sequências 5’ CCGG 3’ na região promotora do gene *Slc2a4* de ratos DM1, mostrou que apenas na sequência localizada na posição -781/-778, relativa a primeira base da região 5`UTR, alterou-se (reduziu), o que reverteu com o tratamento com insulina. Aumento da metilação na região promotora do gene *Slc2a4*, concomitante com redução da sua transcrição, já foi descrito em outras situações de alteração metabólica (RAJESH; BALASUBRAMANIAN, 2014; RÜEGG et al., 2011; YOKOMORI; TAWATA; ONAYA, 1999), mas nunca havia sido investigado em situação de DM. Todavia, devemos considerar a limitação do método utilizado no presente trabalho para avaliar o grau de metilação do DNA. A nossa análise é capaz de investigar o grau de metilação apenas das citosinas contidas nas sequências reconhecidas pelas enzimas de restrição *HpaII* e *MspI*, e, portanto, é possível que outras citosinas que não estejam localizadas nessas sequências

do promotor do *Slc2a4* estejam modificadas. Portanto, a avaliação do grau de metilação de outros sítios poderia aprimorar a avaliação da metilação na região promotora do *Slc2a4*.

Nossos dados estão de acordo com estudo recente (KIRCHNER et al., 2016), que demonstrou que genes relacionados ao metabolismo apresentam redução da expressão concomitante com redução da metilação. Dessa forma, podemos especular que a redução do grau de metilação na região promotora do gene *Slc2a4* nos animais DM1 poderia permitir um aumento da atividade de fatores transcricionais repressores ao DNA, enquanto o tratamento com insulina reduziria a ligação de tais fatores repressores, contribuindo para a recuperação dos níveis adequados de transcrição desse gene. Nesse sentido, destacamos que o Nuclear factor 1 B-type (NF-1) e o Transcription factor COE1 (O/E-1) são fatores transcricionais repressores da transcrição do gene *Slc2a4*, pelo menos em células 3T3-L1 (COOKE; LANE, 1999; MIURA et al., 2004), cujos sítios de ligação ao DNA estão localizados muito próximos da sequência (5`CCGG3`) que apresentou redução do grau de metilação nos animais DM1 não tratados, explicando uma maior atividade desses repressores no músculo sóleo dos ratos DM1. Os detalhes acerca da localização das sequências consenso desses fatores estão descritos na seção APÊNDICE E. Interessante que por meio de ensaios preliminares por PCR em tempo real detectou-se um aumento no conteúdo do mRNA dos genes *Nfib* e *Ebf-1* (que codificam as proteínas NF-1 e O/E-1, respectivamente) em músculo sóleo de animais DM1 e o tratamento com insulina reverteu essa alteração (dados apresentados na seção APÊNDICE G). Esse resultado é mais um indicativo de que esses fatores estejam participando das regulações de *Slc2a4*/GLUT4. Futuros experimentos de imunoprecipitação de cromatina utilizando anticorpos específicos que detectem esses fatores são necessários para comprovar essa hipótese.

A mesma abordagem experimental foi utilizada para avaliar o grau de metilação de citosinas (em sequências 5`CCGG3`) na região promotora do *Slc2a4* em músculo gastrocnêmio de camundongos DM2. Nas 1000 bases da sequência da região promotora do gene *Slc2a4* do camundongo, a montante da região 5`UTR, existem apenas duas sequências (5` CCGG 3) e os resultados mostraram que o grau de metilação das citosinas, em ambas as sequências, está significantemente aumentado nos animais DM2, e o tratamento com resveratrol reverteu essa alteração. Diferentemente dos resultados obtidos em amostras de animais DM1, o grau de metilação dessas duas citosinas da região promotora do gene *Slc2a4*, em modelo DM2, correlacionou-se negativamente com o conteúdo de mRNA de *Slc2a4*, de acordo com a definição clássica a respeito da repressão da transcrição mediada pelo aumento do grau de metilação de citosinas em regiões promotoras (RAZIN; CEDAR, 1991). Apesar disso, a confirmação da metilação do DNA na regulação da transcrição do gene *Slc2a4* em músculo

esquelético na condição DM não pode ser dada como definitiva com base nos dados apresentados aqui, devido às limitações metodológicas comentadas acima. Alternativamente, abordagens metodológicas mais sofisticadas como a conversão bisulfito seguida de sequenciamento do DNA poderia ser realizada para melhor caracterização do grau de metilação do DNA em músculo esquelético no estado DM, no entanto, essa abordagem possui custo econômico relativamente alto e variações nos resultados são frequentes (OAKES et al., 2006).

A conformação da cromatina pode também ser alterada por modificações pós-traducionais dos peptídeos localizados na extremidade N-terminal das histonas, o que pode afetar diretamente a acessibilidade de fatores transcricionais ao DNA (ZHANG; KRAUS, 2010). A acetilação de histonas classicamente reduz o grau de condensação dos nucleossomos (octâmero de histonas - H2A, H2B, H3 e H4 + dupla fita de DNA), facilitando o acesso e interação de fatores transcricionais ao DNA (SHAHBAZIAN; GRUNSTEIN, 2007). De fato, a hiperacetilação da cauda das histonas favorece a ligação de fatores transcricionais tanto ativadores quanto repressores, mas é interessante notar que, geralmente, são observadas regulações positivas na expressão gênica (VERDONE et al., 2006).

Os dados de imunoprecipitação da cromatina mostraram que nos músculos de ratos DM1, o conteúdo de H3 acetilada nos resíduos lisinas 9, 14, 18, 23 e 27 da cauda peptídica diminuiu na região -670 a -461 do promotor, relativa a primeira base da região 5`UTR (+1). Além disso, detectou-se uma recuperação parcial no grau de acetilação da H3 nessa região após o tratamento com insulina, reforçando a participação de regulação epigenética na expressão do gene *Slc2a4* no DM. Importante ressaltar que a sequência avaliada possui importantes sítios de reconhecimento de fatores transcricionais estimuladores da transcrição do gene *Slc2a4*, incluindo MEF2, TRa, HIF1a e MyoD, sendo que esses dois últimos se ligam na mesma região denominada E-box (LIMA et al., 2009; SILVA et al., 2005). A sequência do promotor do gene *Slc2a4*, indicando os sítios de ligação desses fatores, está apresentada na seção APÊNDICE D.

Analisamos também nesse mesmo fragmento da região promotora do gene *Slc2a4*, a trimetilação no resíduo lisina 9 da H3 (H3K9me3) que é um clássico marcador epigenético envolvido com a repressão da transcrição (GREER; SHI, 2012). A classe de proteínas Hp1 (Heterochromatin protein 1) reconhece a modificação H3K9me3 induzindo a condensação da cromatina (heterocromatina). Nessa condição ocorre menor ocupação da RNA polimerase impedindo a atuação da maquinaria de transcrição (CANZIO et al., 2011).

No DM, a hiperglicemia pode acarretar importantes alterações pós-traducionais na cauda das histonas incluindo a H3K9me3 em regiões promotoras de diversos genes relacionados à patogênese da doença (MIAO et al., 2012; STANKOV et al., 2013). Neste estudo,

descrevemos que o conteúdo de H3K9me3 na região promotora do gene *Slc2a4* aumentou em músculo de ratos DM1, e o tratamento com insulina reverteu essa alteração. Já foi demonstrado que alta concentração de glicose *per se* pode suprimir a interação de H3K9me2 e H3K9me3 na região promotora do gene *Rela* (MIAO et al., 2012), teoricamente aumentando a transcrição desse gene, que é um repressor do *Slc2a4* (FURUYA et al., 2013). Ainda, foi demonstrado, *in vitro*, que a insulina é capaz de agudamente induzir redução no conteúdo de H3K9me3 em vários outros genes (JEONG et al., 2015), o que reforça nosso resultado em animais DM1 tratados com insulina. Esses dados, juntamente com os dados de H3 acetilada, ilustram potenciais mecanismos epigenéticos que em sintonia participam da regulação da expressão do gene *Slc2a4* no músculo de animais diabéticos.

Corroborando essa hipótese, verificamos que, na mesma região em que foram detectadas as PTMs de histonas nos animais DM1, houve uma redução significante do grau de ligação de MEF2A/D, e o tratamento com insulina recuperou a ligação desse fator próximo ao nível dos animais não diabéticos. Com isso, temos a evidência de uma sintonia entre o comportamento de ligação de fatores transcricionais estimuladores da transcrição do *Slc2a4* com as PTMs das histonas, servindo esses dados de alicerce para futuras investigações visando intervenções terapêuticas que busquem recuperar o conteúdo de GLUT4. Na seção ANEXO segue o manuscrito em elaboração para publicação intitulado: **"Epigenetic regulation of *Slc2a4* gene in diabetes: a new target to improve glycemic control"**.

No músculo gastrocnêmio de camundongos DM2 verificamos um aumento do conteúdo de H3K9me3 na região -497/-288 do promotor do gene *Slc2a4* e o tratamento com resveratrol reverteu esses dados para níveis menores do que os observados nos animais não diabéticos. Interessante que o tratamento com resveratrol reduziu o conteúdo de H3K9me3 para níveis menores do que os observados nos animais não diabéticos, semelhantemente ao observado nos animais DM1 tratados com insulina; portanto, esse efeito do resveratrol pode envolver aumento na sensibilidade à insulina nos animais DM2. Por outro lado, os resultados de H3 acetilada não corresponderam ao esperado; o conteúdo de H3 acetilado na região -497/-288 do promotor do gene *Slc2a4* aumentou tanto nos animais DM2 quanto nos DM2 tratados com resveratrol, contrapondo-se ao observado nos animais DM1. Até o momento não temos explicação para essa regulação.

Os dados até aqui expostos permitem-nos ampliar o entendimento dos mecanismos epigenéticos regulatórios da expressão do gene *Slc2a4* induzido por DM1 e DM2, assim como pelo tratamento com insulina ou resveratrol, respectivamente. No entanto, para atender o objetivo de demonstrar o efeito do resveratrol, era importante investigar possíveis vias de

sinalização ou agentes efetores envolvidos nas regulações epigenéticas detectadas. Com isso, seria possível ampliar as estratégias de regulação da expressão do gene *Slc2a4*, com base no princípio de integração entre estado metabólico, regulação epigenética e transcrição gênica (LU; THOMPSON, 2012).

Aumento de atividade de sirtuína é apontado como importante mecanismo de ação do resveratrol (BORRA; SMITH; DENU, 2005). As sirtuínas são enzimas que pertencem a classe III das histonas desacetilases dependentes de NAD^+, e, deste modo, apontadas como moduladores de regulações epigenéticas. A SIRT1 é a isoforma mais estudada e possui como alvo a histona H3, desacetilando-a (VAQUERO et al., 2004). Desacetilação de histona H3 é, portanto, um mecanismo pelo qual as sirtuínas são reconhecidas silenciadoras da expressão gênica (ZHANG; KRAUS, 2010), o que poderia estar sendo acionado pelo resveratrol.

No rato DM1, observamos um aumento no conteúdo nuclear de SIRT1, o que está de acordo com a redução observada na acetilação de histona H3 no promotor do *Slc2a4*, e, consequentemente, na expressão do gene. Resultados semelhantes, em outros genes, têm sido atribuídos à uma defesa celular em condições de reduzida oferta metabólica como no DM (GUT; VERDIN, 2013; MURAYAMA et al., 2008). Por outro lado, há indícios de que a SIRT1 no núcleo controle a atividade da enzima SUV39H1, responsável pela trimetilação da cauda peptídica da H3 no resíduo lisina 9 (H3K9me3) (BOSCH-PRESEGUÉ et al., 2011; MURAYAMA et al., 2008), dado que indica que a SIRT1 possa estar também envolvida no aumento de H3K9me3 no gene *Slc2a4*, observado no músculo dos ratos DM1 não tratados com insulina. Interessante notar que o tratamento com insulina reduziu o conteúdo nuclear de SIRT1, situação que se acompanhou de aumento na expressão do *Slc2a4* e melhora da homeostasia glicêmica.

Essa regulação parece, a princípio, contraditória, considerando os estudos que apontam o aumento da SIRT1 como potencialmente benéfico no tratamento do diabetes (melhora na homeostasia glicêmica). Entretanto, tais assertivas geralmente estão associadas a aumento de SIRT1 no compartimento citosólico, local em que a SIRT1 possui diversos alvos como FoxO, PGC-1-alfa, NFKB, p53 (HORI et al., 2013), e, portanto, não devem ser relacionadas aos efeitos diretos da SIRT1 no compartimento nuclear. Com base nisso, também avaliamos o conteúdo de SIRT1 no compartimento citosólico, e nesse caso, a SIRT1 aumentou apenas nos animais DM1 que receberam insulina + resveratrol. Entretanto, ressaltamos que a variação de SIRT1 citosólica não deve ser, descuidadamente, relacionada a potenciais regulações epigenéticas de expressão gênica, o que frequentemente se encontra na literatura.

Diferentemente do observado no sóleo de animais DM1, no gastrocnêmio de animais DM2 a SIRT1 nuclear não aumentou, indicando que o aumento de H3 acetilada no *Slc2a4* não foi mediado por uma hipotética redução de SIRT1. Já o tratamento com resveratrol no DM2 aumentou o conteúdo de SIRT1 nuclear (efeito hipotético esperado), mas esse efeito não se acompanhou de desacetilação de H3 no *Slc2a4* nem reduziu a expressão do gene, pelo contrário, a expressão do *Slc2a4* até aumentou. Por outro lado, no músculo de animais DM2, o aumento de SIRT1 nuclear induzido pelo resveratrol acompanhou-se de redução H3K9me3 no gene *Slc2a4*, o que está dentro do esperado como efeito de SIRT1 (BOSCH-PRESEGUÉ et al., 2011), e que pode contribuir para o aumento de *Slc2a4* observado. Finalmente, também nos músculos de animais DM2 avaliamos a expressão de SIRT1 citosólica, e nenhuma alteração significante foi observada, mesmo em resposta ao resveratrol.

É importante destacar que já foi relatada discrepância entre o conteúdo proteico e a atividade enzimática de desacetilação da SIRT1 (GURD et al., 2011). Nós tentamos avaliar a atividade de SIRT1 (nuclear e citosólica) com kit comercial descrito na literatura, mas não obtivemos sucesso nessa avaliação. Entretanto, relembremos que a superexpressão de SIRT1 melhora a homeostasia glicêmica em modelos de resistência à insulina, sugerindo que nível proteico elevado correlacione-se positivamente com nível de atividade enzimática (BANKS et al., 2008).

Por fim, considerando que o resveratrol possa também ativar a AMPK, por meio de mecanismo interativo com SIRT1 ainda pouco esclarecido, investigamos a ativação dessa cinase, quantificando o conteúdo de AMPKα2 fosforilada. A interação entre AMPK/SIRT1 é sustentada pela observação que: 1) camundongos que superexpressam SIRT1 ($SIRT1^{+/+}$) apresentam aumento da atividade de AMPK (PRICE et al., 2012); 2) camundongos $SIRT1^{-/-}$, quando tratados com resveratrol, apresentam abolição do estímulo da AMPK (PRICE et al., 2012); e 3) a deleção de AMPK abole efeitos do resveratrol sobre a ativação da SIRT1 (UM et al., 2010).

No presente estudo, em músculo de ratos DM1 a ativação da AMPK estava reduzida, e a insulinoterapia restaurou essa alteração, dentro do esperado para essas condições (referência). Todavia, nenhuma alteração de ativação de AMPK foi observada em resposta ao resveratrol, o pode estar em consonância com a ausência de regulação de SIRT1 citosólica. Também nos músculos de animais DM2 a ativação da AMPK estava reduzida, mais uma vez de acordo com o esperado no DM (referência de DM2), e nesses animais o tratamento com resveratrol promoveu uma tendência de aumento da AMPK fosforilada, compatível com similar tendência de aumento na SIRT1 citosólica.

Uma vez que não foi detectada alteração na atividade da AMPK em músculo de animais DM1 e DM2 tratados com resveratrol, não aprofundaremos discussão sobre potenciais mecanismos pelos quais a AMPK poderia regular a expressão de *Slc2a4*/GLUT4, foco do presente estudo. Ainda, destacamos que participação da AMPK na translocação de vesículas de GLUT4 no estado diabético é uma seara bastante conhecida, que foge totalmente ao escopo do presente estudo, e que, por isso, também não será discutida. Aproveitamos o momento para ressaltar que as alterações de conteúdo de GLUT4, em condições crônicas, sobrepõe-se a possíveis alterações de migração de vesículas (CORRÊA-GIANNELLA; MACHADO, 2013).

Recentemente foi descrito que a AMPK pode associar-se a uma proteína chamada Snf-1 e regular a acetilação de histonas, o que aproxima as ações da AMPK do contexto das regulações epigenéticas (SALMINEN; KAUPPINEN; KAARNIRANTA, 2016). Essa assertiva ainda é muito recente e necessariamente precisa ser melhor investigada; mas, futuramente, pode servir de alicerce para enriquecer o conhecimento sobre as regulações epigenéticas induzidas pelo resveratrol sobre o gene *Slc2a4*.

Finalmente, apesar deste estudo focar em regulações epigenéticas induzidas pelo resveratrol no gene *Slc2a4* em estado diabético, não podemos deixar de comentar rapidamente a possibilidade de o resveratrol regular genes de proteínas que são reguladoras do *Slc2a4* (regulação indireta do resveratrol). Nesse sentido, destacamos a participação de mecanismos inflamatórios bastante conhecidos como moduladores da sensibilidade à insulina.

Verificamos que o tratamento com resveratrol dos animais DM2 reverteu parcialmente o aumento da expressão, no tecido adiposo branco, dos genes de marcadores pró-inflamatórios tais como o *Tnf* (tumor necrosis factor), *Il-6* (interleukin 6), *Nfkb1* (nuclear factor kappa B subunit 1) e *Rela* (RELA proto-oncogene, NF-kB subunit), evidenciando uma ação anti-inflamatória do resveratrol (APÊNDICE F). De fato, a literatura sugere que o resveratrol tenha efeitos anti-inflamatórios (INOUE; NAKATA, 2015). A inflamação no tecido adiposo é mecanismo bastante relacionado com resistência periférica à insulina (LEE; LEE 2014), e já foi mostrado em camundongos MSG que agentes sensibilizadores da insulina, como a atorvastatina, reduzem a atividade inflamatória no tecido adiposo (FURUYA et al., 2010). O TNF-alfa, produzido no tecido adiposo, pode ser liberado na corrente sanguínea, e atuar em outros territórios como o músculo esquelético (TISHINSKY et al., 2013), por mecanismos que envolvam a repressão do *Slc2a4*. Além disso, a atividade pró-inflamatória poderia ser desencadeada no próprio músculo dos animais DM2; e o tratamento com resveratrol poderia atenuar a atividade inflamatória tanto no músculo como nos outros territórios. É importante destacar que as subunidades p50 e p65 do complexo NFKB (codificadas pelos genes *Nfkb1* e

Rela, respectivamente), mediadores importantes da atividade pró-inflamatória, sobretudo do TNF-alfa, são fatores transcricionais repressores da transcrição do gene *Slc2a4* (FURUYA et al., 2013). Assim, a regulação da expressão de *Slc2a4*/GLUT4 e da própria homeostasia glicêmica, tanto no DM como no tratamento com resveratrol, deve ser modulada, em parte, pelo grau de atividade inflamatória ao organismo.

8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam que, tanto em modelo de DM1 como de DM2, a repressão do gene *Slc2a4* (codifica o GLUT4) em músculo esquelético associa-se a regulações epigenéticas, a saber: redução de acetilação de H3 no DM1 e aumento de trimetilação de H3 tanto no DM1 como no DM2.

No DM1, a insulinoterapia melhora o controle glicêmico e restaura a expressão de *Slc2a4*/GLUT4, com reversão das alterações epigenéticas do *Slc2a4*; o tratamento coadjuvante com resveratrol induz melhora adicional no controle glicêmico, porém sem alteração adicional na expressão de *Slc2a4*/GLUT4.

No DM2, o resveratrol, isoladamente, restaura o controle glicêmico e aumenta a expressão de *Slc2a4*/GLUT4, com reversão do aumento da trimetilação de H3.

As regulações epigenéticas do gene *Slc2a4* observadas são mediadas, pelo menos em parte, pelo conteúdo de SIRT1 nuclear.

Em suma, o presente estudo revela pela primeira vez a ocorrência de regulações epigenéticas no gene *Slc2a4* em músculo de animais diabéticos, com destaque para as modificações pós-traducionais de histona H3, e o tratamento com resveratrol modula algumas dessas alterações, melhorando o controle glicêmico. Esses resultados evidenciam o resveratrol como um sensibilizador da insulina, além de embasarem o desenvolvimento futuro de terapias epigenéticas que contribuam para o controle glicêmico dos portadores de DM.

REFERÊNCIAS*

ALCAÍN F. J.; VILLALBA J. M. Sirtuin activators. **Expert Opin. Ther. Pat.**, v. 19, n. 4, p. 403-414, 2009.

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

ARMBRUSTER D. A. Fructosamine: structure, analysis, and clinical usefulness. **Clin. Chem.**, v. 33, n. 12, p. 2153-2163, 1987.

AL-HADDAD R.; KARNIB N.; ASSAAD R. A.; BILEN Y.; EMMANUEL N.; GHANEM A.; YOUNES J.; ZIBARA V.; STEPHAN J. S.; SLEIMAN S. F. Epigenetic changes in diabetes. **Neuroscience Lett.**, v. 20, n. 625, p. 64-69, 2016.

BACHA F.; KLINEPETER BARTZ S. Insulin resistance, role of metformin and other non-insulin therapies in pediatric type 1 diabetes. **Pediatric Diabetes.**, v.17, n. 8, p. 545-558, 2016.

BAGUL P. K.; DEEPTHI N.; SULTANA R.; BANERJEE S.K. Resveratrol ameliorates cardiac oxidative stress in diabetes through deacetylation of NFkB-p65 and histone 3. **J. Nutr. Biochem.**, v. 26, n. 11, p. 1298-1307, 2015.

BANKS A. S.; KON N.; KNIGHT C.; MATSUMOTO M.; GUTIÉRREZ-JUÁREZ R; ROSSETTI L.; GU W.; ACCILI D. SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. **Cell Metab.**, v. 8, n. 4, p. 333-341, 2008.

BARRÈS R.; YAN J.; EGAN B.; TREEBAK J. T.; RASMUSSEN M.; FRITZ T.; CAIDAHL K.; KROOK A.; O'GORMAN D. J.; ZIERATH J. R. Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle. **Cell Metab.**, v. 15, n. 3, p. 405-411, 2012.

BAUR J. A.; PEARSON K. J.; PRICE N. L.; JAMIESON H. A.; LERIN C.; KALRA A.; PRABHU V. V.; ALLARD J. S.; LOPEZ-LLUCH G.; LEWIS K; PISTELL P. J.; POOSALA S.; BECKER K. G.; BOSS O.; GWINN D.; WANG M.; RAMASWAMY S.; FISHBEIN K. W.; SPENCER R. G; LAKATTA E. G.; LE COUTEUR D.; SHAW R. J.; NAVAS P.; PUIGSERVER P.; INGRAM D. K.; DE CABO R.; SINCLAIR D. A. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. **Nature.,** v. 444, n.7117, p. 337-342, 2006.

BERNSTEIN B. E.; HUMPHREY E. L.; ERLICH R. L.; SCHNEIDER R.; BOUMAN P.; LIU J. S.; KOUZARIDES T.; SCHREIBER S. L. Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. **Proc. Natl. Acad. Sci**., v. 99, n. 13, p.8695-8700, 2002.

BESTOR T.; LAUDANO A.; MATTALIANO R.; INGRAM V. Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. **J. Mol. Biol.**, v. 203, n. 4, p. 971-983, 1988.

*De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BHATT J. K.; THOMAS S.; NANJAN M. J. Resveratrol supplementation improves glycemic control in type 2 diabetes mellitus. **Nutr. Res.**, v. 32, n. 7, p. 537-541, 2012.

BIRD A. Perceptions of epigenetics. **Nature.**, v. 447, n. 7143, p. 396-398, 2007.

BIRD A. Putting the DNA back into DNA methylation. **Nat. Genet.**, v. 43, n. 11, p. 1050-1051, 2011.

BLACK J. C.; VAN RECHEM C.; WHETSTINE J. R. Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. **Mol. Cell.**, v. 48, n. 4, p. 491-507, 2012.

BRASNYÓ P.; MOLNÁR G. A.; MOHÁS M.; MARKÓ L.; LACZY B.; CSEH J.; MIKOLÁS E.; SZIJÁRTÓ I A.; MÉREI A.; HALMAI R.; MÉSZÁROS L. G.; SÜMEGI B.; WITTMANN I. Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. **Br. J. Nutr.,** v. 106 n. 3, p. 383-389, 2011.

BREEN D. M.; SANLI T.; GIACCA A.; TSIANI E. Stimulation of muscle cell glucose uptake by resveratrol through sirtuins and AMPK. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, n. 374, v. 1, p. 117–122, 2008.

BOOCOCK D. J.; FAUST G. E.; PATEL K. R.; SCHINAS A. M.; BROWN V. A.; DUCHARME M. P.; BOOTH T. D.; CROWELL J. A.; PERLOFF M.; GESCHER A. J.; STEWARD W. P.; BRENNER D. E. Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 16, n. 6, p. 1246-1252, 2007.

BORRA M. T.; SMITH B. C.; DENU J. M. Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 17, p. 17187-17195, 2005.

BOSCH-PRESEGUÉ L.; RAURELL-VILA H.; MARAZUELA-DUQUE A. KANE-GOLDSMITH N.; VALLE A.; OLIVER J.; SERRANO L.; VAQUERO A. Stabilization of Suv39H1 by SirT1 is part of oxidative stress response and ensures genome protection. **Mol Cell.**, v. 42, n. 2 p. 210-223, 2011.

BOWERS J. L.; TYULMENKOV V. V.; JERNIGAN S. C.; KLINGE C. M. Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. **Endocrinology.,** v. 141, n. 10, p.3657-3667, 2000.

BROZINICK J. T. JR.; MCCOID S. C.; REYNOLDS T. H.; NARDONE N. A.; HARGROVE D. M.; STEVENSON R. W.; CUSHMAN S. W.; GIBBS E. M. 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.

BUNYAN J.; MURRELL E. A.; SHAH P. P. The induction of obesity in rodents by means of monosodium glutamate. **Br. J. Nutr.,** v. 35, n. 1, p. 25-39, 1976.

CANTÓ C.; JIANG L. Q.; DESHMUKH A. S.; MATAKI C.; COSTE A.; LAGOUGE M.; ZIERATH J. R.; AUWERX J. Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. **Cell Metab.**, v. 11, n. 3, p. 213-219, 2010.

CANZIO D.; CHANG E. Y.; SHANKAR S.; KUCHENBECKER K. M.; SIMON M. D.; MADHANI H. D; NARLIKAR G. J; AL-SADY B. Chromodomain-mediated oligomerization of HP1 suggests a nucleosome-bridging mechanism for heterochromatin assembly. **Mol. Cell.,** v. 41, n. 1, p. 67-81, 2011.

CASPER R. F.; QUESNE M.; ROGERS I. M.; SHIROTA T.; JOLIVET A.; MILGROM E.; SAVOURET J. F. Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: implications for prevention of dioxin toxicity. **Mol. Pharmacol.**, v. 56, n. 4, p. 784-790, 1999.

CAVALLI G. From linear genes to epigenetic inheritance of three-dimensional epigenomes. **J. Mol. Biol**. v. 409, n. 1, p.54-61, 2011.

CHANG H. C.; GUARENTE L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. **Trends Endocrinol. Metab.** v. 25, n. 3, p. 138-145, 2014.

CHANG C. C.; LIN K. Y.; PENG K. Y.; DAY Y. J.; HUNG L. M. Resveratrol exerts anti-obesity effects in high-fat diet obese mice and displays differential dosage effects on cytotoxicity, differentiation, and lipolysis in 3T3-L1 cells. **Endocr. J.**, v. 63, n. 2, p.169-178, 2016.

CHEN K. H.; CHENG M. L.; JING Y. H.; CHIU D. T.; SHIAO M. S.; CHEN J. K. Resveratrol ameliorates metabolic disorders and muscle wasting in streptozotocin-induced diabetic rats. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.,** v. 301, n. 5, p.853-863, 2011.

CHEN S.; LI J.; ZHANG Z.; LI W.; SUN Y.; ZHANG Q.; FENG X.; ZHU W. Effects of resveratrol on the amelioration of insulin resistance in KKAy mice. **Can. J. Physiol. Pharmacol.,** v. 90, n. 2, p. 237-242, 2012.

CHI T. C.; CHEN W. P.; CHI T. L.; KUO T. F.; LEE S. S. CHENG J. T.; SU M. J. Phosphatidylinositol-3-kinase is involved in the antihyperglycemic effect induced by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sci.**, v. 80, n. 18, p. 1713-1720, 2007.

COLEMAN S. K.; REBALKA I. A.; D'SOUZA D. M.; HAWKE T. J. Skeletal muscle as a therapeutic target for delaying type 1 diabetic complications. **World J. Diabetes.**, v. 6, n. 17, p. 1323-1336, 2015.

COOKE D. W.; LANE M. D. Transcription factor NF1 mediates repression of the GLUT4 promoter by cyclic-AMP. **Biochem Biophys Res Commun.,** v. 260, n. 3, p.600-604, 1999.

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.

CRANDALL J. P. ORAM V.; TRANDAFIRESCU G.; REID M.; KISHORE P.; HAWKINS M.; COHEN H. W.; BARZILAI N. Pilot study of resveratrol in olderadults with impaired glucose tolerance. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci,** v. 67, p.1307–1312, 2012.

DE CARVALHO PAPA P.; VARGAS A. M.; DA SILVA J. L.; NUNES M. T.; MACHADO U. F. GLUT4 protein is differently modulated during development of obesity in monosodium glutamate-treated mice. **Life Sci.**, v. 71, n. 16, p.1917-1928, 2002.

DEATON A. M.; BIRD A. CpG islands and the regulation of transcription. **Genes Dev.,** v. 25, n. 10, p. 1010-1022, 2011.

DEGEETER M.; WILLIAMSON B. Alternative Agents in Type 1 Diabetes in Addition to Insulin Therapy: Metformin, Alpha-Glucosidase Inhibitors, Pioglitazone, GLP-1 Agonists, DPP-IV Inhibitors, and SGLT-2 Inhibitors. **J. Pharm. Pract.**, v. 29, p. 144-159, 2014.

DELMAS D.; AIRES V.; LIMAGNE E.; DUTARTRE P.; MAZUÉ F.; GHIRINGHELLI F.; LATRUFFE N. Transport, stability, and biological activity of resveratrol. **Ann. N. Y. Acad. Sci.,** v. 1215, p. 48-59, 2011.

DO G. M.; JUNG U. J.; PARK H. J.; KWON E. Y.; JEON S. M.; MCGREGOR R. A.; CHOI M. S. Resveratrol ameliorates diabetes-related metabolic changes via activation of AMP-activated protein kinase and its downstream targets in db/db mice. **Mol. Nutr. Food Res.,** v. 56, n. 8, p. 1282-1291, 2012.

DOWELL P.; COOKE D. W. Olf-1/early B cell factor is a regulator of glut4 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. **J. Biol. Chem.,** v. 277, n. 3, p. 1712-1718, 2002.

FANG M.; CHEN D.; YANG C. S. Dietary polyphenols may affect DNA methylation. **J. Nutr.**, v. 137, (1 Suppl):223S-228S, 2007.

FARGHALI H.; KUTINOVÁ CANOVÁ N.; LEKIĆ N. Resveratrol and related compounds as antioxidants with an allosteric mechanism of action in epigenetic drug targets. **Physiol. Res.,** v. 62, n. 1, p. 1-13, 2013.

FLICK F.; LÜSCHER B. Regulation of sirtuin function by posttranslational modifications. **Front Pharmacol.**, v.28, n.3, p. 29, 2012.

FRIEDRICHSEN M.; MORTENSEN B.; PEHMØLLER C.; BIRK J. B.; WOJTASZEWSKI J. F. P. Exercise-induced AMPK activity in skeletal muscle: role in glucose uptake and insulin sensitivity. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 366, n. 2, p. 204–214, 2013.

FERNÁNDEZ-QUINTELA A.; CARPÉNÉ C.; FERNÁNDEZ M.; AGUIRRE L.; MILTON-LASKIBAR I; CONTRERAS J; PORTILLO M. P. Anti-obesity effects of resveratrol: comparison between animal models and humans. **J. Physiol. Biochem.**, 2015.

FULLERTON M. D.; STEINBERG G. R. SIRT1 takes a backseat to AMPK in the regulation of insulin sensitivity by resveratrol. **Diabetes.** v. 59, n. 3, p. 551-553, 2010.

FURUYA D. T.; POLETTO A. C.; FAVARO R. R.; MARTINS J. O.; ZORN T. M.; MACHADO U. F. Anti-inflammatory effect of atorvastatin ameliorates insulin resistance in monosodium glutamate-treated obese mice. **Metabolism.**, v. 59, n. 3, p. 395-399, 2010.

FURUYA D. T.; NERI E. A.; POLETTO A. C.; ANHÊ G. F.; FREITAS H. S.; CAMPELLO R. S.; REBOUÇAS N. A.; MACHADO U. F. Identification of nuclear factor-κB sites in the Slc2a4 gene promoter. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 370, n. 1-2, p. 87-95, 2013.

GAMBINI J.; INGLÉS M.; OLASO G.; LOPEZ-GRUESO R.; BONET-COSTA V.; GIMENO-MALLENCH L.; MAS-BARGUES C.; ABDELAZIZ K. M.; GOMEZ-CABRERA M. C.; VINA J.; BORRAS C. Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. **Oxid. Med. Cell Longev.**,;2015:837042. 2015

GARDINER-GARDEN M.; FROMMER M. CpG islands in vertebrate genomes. **J. Mol. Biol.,** v. 196, n. 2, p. 261-282, 1987.

GARDNER K. E.; ALLIS C. D.; STRAHL B. D. Operating on chromatin, a colorful language where context matters. **J. Mol. Biol.,** v. 409, n.1, p. 36-46, 2011.

GARFIN D E. One-dimensional gel electrophoresis. **Methods Enzymol.**, v. 182, p. 425-441, 1990.

GEHM B. D.; MCANDREWS J. M.; CHIEN P. Y.; JAMESON J. L. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 94, n. 25, p. 14138-14143, 1997.

GENCOGLU H.; TUZCU M.; HAYIRLI A.; SAHIN K. Protective effects of resveratrol against streptozotocin-induced diabetes in rats by modulation of visfatin/sirtuin-1 pathway and glucose transporters. **Int. J. Food Sci. Nutr.,** v. 66, n. 3, p. 314-320, 2015.

GIBBS E. M.; STOCK J. L.; MCCOID S. C.; STUKENBROK H. A.; PESSIN J. E.; STEVENSON R. W.; MILICI A. J.; MCNEISH J. D. Glycemic improvement in diabetic db/db mice by overexpression of the human insulin-regulatable glucose transporter (GLUT4). **J. Clin. Invest.,** v. 95, n. 4, p. 1512-1518, 1995.

GOLDBERG D. M.; YAN J.; SOLEAS G. J. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. **Clin. Biochem.,** v. 36, n. 1, p. 79-87, 2003.

GREER E. L.; SHI Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. **Nat. Rev. Genet.**, v. 13, n. 5, p. 343-357, 2012.

GROH I. A.; CHEN C.; LÜSKE C.; CARTUS A. T.; ESSELEN M. Plant polyphenols and oxidative metabolites of the herbal alkenylbenzene methyleugenol suppress histone deacetylase activity in human colon carcinoma cells. **J. Nutr. Metab.**, v 2013;2013:821082.

GUARENTE L. Calorie restriction and sirtuins revisited. **Genes Dev.**, v. 27, n.19, p.2072-2085, 2013.

GURD B. J.; YOSHIDA Y.; MCFARLAN J. T.; HOLLOWAY G. P.; MOYES C. D.; HEIGENHAUSER G. J.; SPRIET L.; BONEN A. Nuclear SIRT1 activity, but not protein content, regulates mitochondrial biogenesis in rat and human skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.,** v. 301, n. 1, p. 67-75, 2011.

GUT P.; VERDIN E. The nexus of chromatin regulation and intermediary metabolism. **Nature.,** v. 502, n. 7472, p. 489-498, 2013.

HAMIDI T.; SINGH A. K.; CHEN T. Genetic alterations of DNA methylation machinery in human diseases. **Epigenomics.**, v. 7, n. 2, p. 247-265, 2015.

HAN L.; ZHAO Z. CpG islands or CpG clusters: how to identify functional GC-rich regions in a genome? **BMC Bioinformatics.,** v. 10, n. 65, 2009.

HORI Y. S.; KUNO A.; HOSODA R.; HORIO Y. Regulation of FOXOs and p53 by SIRT1 modulators under oxidative stress. **PLoS One.,** v. 8, n. 9, p.738-775, 2013.

ILLINGWORTH R. S.; BIRD A. P. CpG islands: 'a rough guide'. **FEBS Lett.,** v. 583, n. 11, p. 1713-1720, 2009.

IM S. S.; KWON S. K.; KIM T. H.; KIM H. I.; AHN Y. H. Regulation of glucose transporter type 4 isoform gene expression in muscle and adipocytes. **IUBMB Life.**, v. 59, n. 3, p. 134-145, 2007.

IMAI S.; ARMSTRONG C. M.; KAEBERLEIN M.; GUARENTE L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. **Nature.**, v. 403, n. 6771, p. 795-800, 2000.

INOUE H, NAKATA R. Resveratrol Targets in Inflammation. **Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets.**, v. 15, n. 3, p. 186-195, 2015.

ITO-NAGAHATA T.; KURIHARA C.; HASEBE M.; ISHII A.; YAMASHITA K.; IWABUCHI M.; SONODA M.; FUKUHARA K.; SAWADA R.; MATSUOKA A.; FUJIWARA Y. Stilbene analogs of resveratrol improve insulin resistance through activation of AMPK. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.77, n. 6, p. 1229-1235, 2013.

JAENISCH R.; BIRD A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nat. Genet.**, v. 33, p. 245-254, 2003.

JEON B. T.; JEONG E. A.; SHIN H. J.; LEE Y.; LEE D. H.; KIM H. J.; KANG S. S.; CHO G. J.; CHOI W. S.; ROH G. S. Resveratrol attenuates obesity-associated peripheral and central inflammation and improves memory deficit in mice fed a high-fat diet. **Diabetes.**, v. 61, n. 6, p. 1444-1454, 2012.

JEONG K.; KWON H.; LEE J.; JANG D.; PAK Y. Insulin-response epigenetic activation of Egr-1 and JunB genes at the nuclear periphery by A-type lamin-associated pY19-Caveolin-2 in the inner nuclear membrane. **Nucleic Acids Res.,** v. 43, n. 6, p. 3114-3127, 2015.

KAHN B. B.; ALQUIER T.; CARLING D.; HARDIE D. G. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. **Cell Metab.**, v. 1, n. 1, p. 15-25, 2005.

KAHN S. E.; HULL R. L.; UTZSCHNEIDER K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature.,** v. 444, n. 7121, p. 840-846, 2006.

KANG W.; HONG H. J.; GUAN J.; KIM D. G.; YANG E. J.; KOH G.; PARK D.; HAN C. H.; LEE Y. J.; LEE D. H. Resveratrol improves insulin signaling in a tissue-specific manner under

insulin-resistant conditions only: in vitro and in vivo experiments in rodents. **Metabolism.**, v. 61, n. 3, p. 424-433, 2012.

KARNIELI E.; ARMONI M. Transcriptional regulation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 gene: from physiology to pathology. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.,** v. 295, p. 1, p. 38-45, 2008.

KASIOTIS K. M.; PRATSINIS H.; KLETSAS D.; HAROUTOUNIAN S. A. Resveratrol and related stilbenes: their anti-aging and anti-angiogenic properties. **Food Chem Toxicol.**, v. 61, p. 112-120, 2013.

KIM E.; BISSON W. H.; LÖHR C. V.; WILLIAMS D. E.; HO E.; DASHWOOD R. H.; RAJENDRAN P. Histone and Non-Histone Targets of Dietary Deacetylase Inhibitors. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 16, n. 7, p. 714-731, 2016.

KIM S.; JIN Y.; CHOI Y.; PARK T. Resveratrol exerts anti-obesity effects via mechanisms involving down-regulation of adipogenic and inflammatory processes in mice. **Biochem. Pharmacol.**, v. 81, n. 11, p. 1343-1351, 2011

KIRCHNER H.; OSLER M. E.; KROOK A.; ZIERATH J. R. Epigenetic flexibility in metabolic regulation: disease cause and prevention? **Trends Cell. Biol.,** v.3, n. 5, p. 203-209, 2013.

KIRCHNER H.; SINHA I.; GAO H.; RUBY M. A.; SCHÖNKE M.; LINDVALL J. M.; BARRÈS R.; KROOK A.; NÄSLUND E.; DAHLMAN-WRIGHT K.; ZIERATH J. R. Altered DNA methylation of glycolytic and lipogenic genes in liver from obese and type 2 diabetic patients. **Mol. Metab.,** v. 5, n. 3, p. 171-183, 2016.

KLEIN D.; KERN R. M.; SOKOL R. Z. A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. **Biochem. Mol. Biol. Int.,** v. 36, n. 1, p. 59-66, 1995.

KOISTINEN H. A.; ZIERATH J. R. Regulation of glucose transport in human skeletal muscle. **Ann. Med.**; v. 34, n. 6, p.410-418, 2002.

KOUZARIDES T. Chromatin modifications and their function. **Cell.,** v. 128, n. 4, p. 693-705, 2007.

KUMAR A.; DHAR S.; RIMANDO A. M.; LAGE J. M.; LEWIN J. R.; ZHANG X.; LEVENSON A. S. Epigenetic potential of resveratrol and analogs in preclinical models of prostate cancer. **Ann. N. Y. Acad Sci.,** v. 1348, n. 1, p. 1-9, 2015.

KUME S.; UZU T.; KASHIWAGI A.; KOYA D. SIRT1, a calorie restriction mimetic, in a new therapeutic approach for type 2 diabetes mellitus and diabetic vascular complications. **Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets.,** v. 10, n. 1, p. 16-24, 2010.

KWAK S. H.; PARK K. S. Recent progress in genetic and epigenetic research on type 2 diabetes. **Exp. Mol. Med.**, v. 48, p. 220, 2016.

LAGOUGE M.; ARGMANN C.; GERHART-HINES Z.; MEZIANE H.; LERIN C.; DAUSSIN F.; MESSADEQ N.; MILNE J.; LAMBERT P.; ELLIOTT P.; GENY B.; LAAKSO M.; PUIGSERVER P.; AUWERX J. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. **Cell.**, v. 127, n. 6, p. 1109-1122, 2006.

LASA A.; CHURRUCA I.; ESEBERRI I.; ANDRÉS-LACUEVA C.; PORTILLO M. P. Delipidating effect of resveratrol metabolites in 3T3-L1 adipocytes. **Mol. Nutr. Food Res.,** v. 56, n. 10, p. 1559-1568, 2012.

LANDETE J. M. Dietary intake of natural antioxidants: vitamins and polyphenols. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 53, n. 7, p. 706-721, 2013.

LEBOVITZ H. E. Adjunct therapy for type 1 diabetes mellitus. **Nat. Rev. Endocrinol.,** v.6, n. 6, p. 326-334, 2010.

LEE B. C.; LEE J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. **Biochim. Biophys. Acta.,** v. 1842, n. 3, p. 446-462, 2014.

LENZEN S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia.,** v. 51, n. 2, p. 216-226, 2008.

LIMA G. A.; ANHÊ G. F.; GIANNOCCO G.; NUNES M. T.; CORREA-GIANNELLA M. L.; MACHADO U. F. Contractile activity per se induces transcriptional activation of SLC2A4 gene in soleus muscle: involvement of MEF2D, HIF-1a, and TRalpha transcriptional factors. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 296, n. 1, p. 132-138, 2009.

LIN H. Y.; LANSING L.; MERILLON J. M.; DAVIS F. B.; TANG H. Y.; SHIH A.; VITRAC X.; KRISA S.; KEATING T.; CAO H. J.; BERGH J.; QUACKENBUSH S.; DAVIS P. J. Integrin alphaVbeta3 contains a receptor site for resveratrol. **FASEB J.,** v. 20, n. 10, p. 1742-1744, 2006.

LIU H. W.; MAHMOOD S.; SRINIVASAN M.; SMIRAGLIA D. J.; PATEL M. S. Developmental programming in skeletal muscle in response to overnourishment in the immediate postnatal life in rats. **J. Nutr. Biochem.**, v. 24, n. 11, p. 1859-1869, 2013.

LIVAK K. J.; SCHMITTGEN T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods.,** v. 25, n.4, p. 402-408, 2001.

LU C.; THOMPSON C. B. Metabolic regulation of epigenetics. **Cell Metab.**, v. 16, n. 1, p. 9-17, 2012.

MACHADO U. F.; SHIMIZU Y.; SAITO M. Decreased glucose transporter (GLUT 4) content in insulin-sensitive tissues of obese aurothioglucose- and monosodium glutamate-treated mice. **Horm. Metab. Res.,** v. 25, n. 9p. 462-465, 1993.

MACHADO U. F.; SHIMIZU I.; SAITO M. Reduced content and preserved translocation of glucose transporter (GLUT 4) in white adipose tissue of obese mice. **Physiol. Behav.**, v. 55, n. 4, p. 621-625, 1994.

MAITER D.; UNDERWOOD L. E.; MARTIN J. B.; KOENIG J. I. Neonatal treatment with monosodium glutamate: effects of prolonged growth hormone (GH)-releasing hormone deficiency on pulsatile GH secretion and growth in female rats. **Endocrinology.,** v. 128, n. 2, p. 1100-1106, 1991.

MARIÑO-RAMÍREZ L.; KANN M. G.; SHOEMAKER B. A.; LANDSMAN D. Histone structure and nucleosome stability. **Expert Rev. Proteomics.**, v. 2, n. 5, p. 719-729, 2005.

MENDES K. L.; DE PINHO L.; ANDRADE J. M.; PARAÍSO A. F.; LULA J. F.; MACEDO S. M.; FELTENBERGER J. D.; GUIMARÃES A. L.; DE PAULA A. M.; SANTOS S. H. Distinct metabolic effects of resveratrol on lipogenesis markers in mice adipose tissue treated with high-polyunsaturated fat and high-protein diets. **Life Sci.**, v. 15, n. 153, p. 66-73, 2016.

MIAO F.; CHEN Z.; ZHANG L.; LIU Z.; WU X.; YUAN Y. C.; NATARAJAN R. Profiles of epigenetic histone post-translational modifications at type 1 diabetes susceptible genes. **J Biol Chem.,** v. 287, n.20, p. 16335-16345, 2012.

MINAKAWA M.; KAWANO A.; MIURA Y.; YAGASAKI K. Hypoglycemic effect of resveratrol in type 2 diabetic model db/db mice and its actions in cultured L6 myotubes and RIN-5F pancreatic β-cells. **J. Clin. Biochem. Nutr.**, v. 48, n. 3, p. 237-244, 2011.

MIURA S.; TSUNODA N.; IKEDA S.; KAI Y.; COOKE D. W.; LANE M. D.; EZAKI O. Nuclear factor 1 regulates adipose tissue-specific expression in the mouse GLUT4 gene. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 325, n. 3, p. 812-818, 2004.

MOMKEN I.; STEVENS L.; BERGOUIGNAN A.; DESPLANCHES D.; RUDWILL F.; CHERY I.; ZAHARIEV A; ZAHN S.; STEIN T. P.; SEBEDIO J. L.; PUJOS-GUILLOT E.; FALEMPIN M.; SIMON C.; COXAM V.; ANDRIANJAFINIONY T.; GAUQUELIN-KOCH G.; PICQUET F.; BLANC S. Resveratrol prevents the wasting disorders of mechanical unloading by acting as a physical exercise mimetic in the rat. **FASEB J.**, v. 25, n. 10, p. 3646-3660, 2011.

MORAES P. A.; YONAMINE C. Y.; PINTO JUNIOR D. C.; ESTEVES J. V.; MACHADO U. F.; MORI R. C. Insulin acutely triggers transcription of Slc2a4 gene: participation of the AT-rich, E-box and NFKB-binding sites. **Life Sci.**, v. 114, n. 1, p. 36-44, 2014.

MORRIS M. J.; TORTELLI C. F.; FILIPPIS A.; PROIETTO J. Reduced BAT function as a mechanism for obesity in the hypophagic, neuropeptide Y deficient monosodium glutamate-treated rat. **Regul. Pept.**, v. 75-76, p. 441-447, 1998.

MUKWEVHO E.; KOHN T. A.; LANG D.; NYATIA E.; SMITH J.; OJUKA E. O. Caffeine induces hyperacetylation of histones at the MEF2 site on the Glut4 promoter and increases MEF2A binding to the site via a CaMK-dependent mechanism. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 294, n. 3, p. 582-588, 2008.

MURATA M.; TAKAHASHI A.; SAITO I.; KAWANISHI S. Site-specific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin. **Biochem. Pharmacol.,** v. 57, n. 8, p. 881-887, 1999.

MURAYAMA A.; OHMORI K.; FUJIMURA A.; MINAMI H.; YASUZAWA-TANAKA K.; KURODA T.; OIE S.; DAITOKU H.; OKUWAKI M.; NAGATA K.; FUKAMIZU A.; KIMURA K.; SHIMIZU T.; YANAGISAWA J. Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status. **Cell.**, v. 133, n. 4, p. 627-639, 2008.

OAKES C. C.; LA SALLE S.; ROBAIRE B.; TRASLER J. M. Evaluation of a quantitative DNA methylation analysis technique using methylation-sensitive/dependent restriction enzymes and real-time PCR. **Epigenetics.**, v. 1, n. 3, p. 146-152, 2006.

OLNEY J. W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science.,** v.164, n. 3880, p.719-721, 1969.

OLSON A. L.; KNIGHT J. B. Regulation of GLUT4 expression in vivo and in vitro. **Front. Biosci.**, v. 8, p. 401-409, 2003.

OUDET P.; GROSS-BELLARD M.; CHAMBON P. Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. **Cell.**, v. 4, n. 4, p. 281-300, 1975.

OKAMOTO M. M.; ANHÊ G. F.; SABINO-SILVA R.; MARQUES M. F.; FREITAS H. S.; MORI R. C.; MELO K. F.; MACHADO U. F. Intensive insulin treatment induces insulin resistance in diabetic rats by impairing glucose metabolism-related mechanisms in muscle and liver. **J. Endocrinol.**, v. 211, n. 1, p. 55-64, 2011.

PAPA P. C.; SERAPHIM P. M.; MACHADO U. F. Loss of weight restores GLUT 4 content in insulin-sensitive tissues of monosodium glutamate-treated obese mice. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 21, n. 11, p. 1065-1070, 1997.

PATIL V.; WARD R. L.; HESSON L. B. The evidence for functional non-CpG methylation in mammalian cells. **Epigenetics.,** v. 9, n. 6, p. 823-828, 2014.

PDRAW Versão 1.0 Revisão 1.1.122. ACACLONE. Software.

PENUMATHSA S. V.; THIRUNAVUKKARASU M.; ZHAN L.; MAULIK G.; MENON V. P.; BAGCHI D.; MAULIK N. Resveratrol enhances GLUT-4 translocation to the caveolar lipid raft fractions through AMPK/Akt/eNOS signalling pathway in diabetic myocardium. **J. Cell Mol. Med.**, v. 12, n. 6A, p. 2350-2361, 2008.

PRASAD, K. Resveratrol, wine, and atherosclerosis. **Int J Angiol**., v. 21, n. 1, p. 7-18, 2012.

PRIMER 3. Versão: 0.4.0 Howard Hughes Medical Institute and by the National Institutes of Health, National Human Genome Research Institute.

QUANTE T.; BIRD A. Do short, frequent DNA sequence motifs mould the epigenome? **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 17, n. 4, p. 257-262, 2016.

QIAO Y; SUN J.; XIA S.; TANG X.; SHI Y.; LE G. Effects of resveratrol on gut microbiota and fat storage in a mouse model with high-fat-induced obesity. **Food Funct.,** v. 5, n. 6, p. 1241-1249, 2014.

PRICE N. L.; GOMES A. P.; LING A. J.; DUARTE F. V.; MARTIN-MONTALVO A.; NORTH B. J.; AGARWAL B.; YE L.; RAMADORI G.; TEODORO J. S.; HUBBARD B. P.; VARELA A. T.; DAVIS J. G.; VARAMINI B.; HAFNER A.; MOADDEL R.; ROLO A. P.; COPPARI R.; PALMEIRA C. M.; DE CABO R.; BAUR J. A.; SINCLAIR D. A. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. **Cell Metab.,** v. 15, n. 5, p. 675-690, 2012.

RAJESH P.; BALASUBRAMANIAN K. Phthalate exposure in utero causes epigenetic changes and impairs insulin signalling. **J. Endocrinol.**, v. 223, n. 1, p. 47-66, 2014.

RASMUSSEN K. D.; HELIN K. Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. **Genes Dev.,** v. 30, n. 7, p. 733-750, 2016.

RAZIN A.; CEDAR H. DNA methylation and gene expression. **Microbiol. Rev.**, v. 55, n. 3, p. 451-458, 1991.

RAYCHAUDHURI N.; THAMOTHARAN S.; SRINIVASAN M.; MAHMOOD S.; PATEL M. S.; DEVASKAR S. U. Postnatal exposure to a high-carbohydrate diet interferes epigenetically with thyroid hormone receptor induction of the adult male rat skeletal muscle glucose transporter isoform 4 expression. **J. Nutr. Biochem.**, v. 25, n. 10, p. 1066-1076, 2014.

REFFINDER. c2014. Disponível em: <http://www.leonxie.com/referencegene.php?type=reference>. Acesso: 20 de agosto de 2014.

RENAUD S.; DE LORGERIL M. The French paradox: dietary factors and cigarette smoking-related health risks. **Ann. N. Y. Acad. Sci.,** v. 686, p. 299-309, 1993.

RICHARDSON J. M.; PESSIN J. E. Identification of a skeletal muscle-specific regulatory domain in the rat GLUT4/muscle-fat gene. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 28, p. 21021-21027, 1993.

ROBERTSON K. D. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. **Oncogene.**, v. 20, n. 24, p. 3139-3155, 2001.

ROTHBART S. B.; STRAHL B. D. Interpreting the language of histone and DNA modifications. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1839, n. 8, p. 627-643, 2014.

ROMERO-CALVO I.; OCÓN B.; MARTÍNEZ-MOYA P.; SUÁREZ M. D.; ZARZUELO A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN O.; DE MEDINA F. S. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. **Anal. Biochem.**, v. 401, n. 2, p. 318-320, 2010.

RÜEGG J.; CAI W.; KARIMI M.; KISS N. B.; SWEDENBORG E.; LARSSON C.; EKSTRÖM T. J, PONGRATZ I. Epigenetic regulation of glucose transporter 4 by estrogen receptor β. **Mol. Endocrinol.**, v. 25, n. 12, p. 2017-2028, 2011.

RUSSO G. L.; VASTOLO V.; CICCARELLI M.; ALBANO L.; MACCHIA P. E.; UNGARO P. Dietary Polyphenols and Chromatin Remodelling. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, 2015 Sep 10:0.

SALMINEN A.; KAUPPINEN A.; KAARNIRANTA K. AMPK/Snf1 signaling regulates histone acetylation: Impact on gene expression and epigenetic functions. **Cell Signal.,** v. 28, n. 8, p. 887-895, 2016.

SANTALUCÍA T.; MORENO H.; PALACÍN M.; YACOUB M. H.; BRAND N. J.; ZORZANO A. A novel functional co-operation between MyoD, MEF2 and TRalpha1 is sufficient for the induction of GLUT4 gene transcription. **J. Mol. Biol.,** v. 314, n. 2, p. 195-204, 2001.

SCALBERT A.; MANACH C.; MORAND C.; RÉMÉSY C.; JIMÉNEZ L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.,** v. 45, n. 4, p. 287-306, 2005.

SCALBERT A.; WILLIAMSON G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **J. Nutr.**, v. 130, p. 2073S-2085S, 2000 (Suplemento 8S).

SCHMATZ R.; SCHETINGER M. R.; SPANEVELLO R. M.; MAZZANTI C. M.; STEFANELLO N.; MALDONADO P. A.; GUTIERRES J.; CORRÊA M. DE C.; GIROTTO E.; MORETTO M. B.; MORSCH V. M. Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sci.,** v. 84, n. 11-12, p. 345-50, 2009.

SHAHBAZIAN M. D.; GRUNSTEIN M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 76, p. 75-100, 2007.

SILAN C. The effects of chronic resveratrol treatment on vascular responsiveness of streptozotocin-induced diabetic rats. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 31, n. 5, p. 897-902, 2008.

SILVA J. L.; GIANNOCCO G.; FURUYA D. T.; LIMA G. A.; MORAES P. A.; NACHEF S.; BORDIN S.; BRITTO L. R.; NUNES M. T.; MACHADO U. F. NF-kappaB, MEF2A, MEF2D and HIF1-a involvement on insulin- and contraction-induced regulation of GLUT4 gene expression in soleus muscle. **Mol. Cell Endocrinol.,** v. 240, n. 1-2, p. 82-93, 2005.

SMITH J. A.; KOHN T. A.; CHETTY A. K.; OJUKA E. O. CaMK activation during exercise is required for histone hyperacetylation and MEF2A binding at the MEF2 site on the Glut4 gene. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 295, n. 3, p. E698-704, 2008.

SMOLIGA J. M.; BAUR J. A.; HAUSENBLAS H. A. Resveratrol and health—a comprehensive review of human clinical trials. **Mol. Nutr. Food Res.,** v. 55, n. 8, p. 1129-1141, 2011.

STANKOV K.; BENC D.; DRASKOVIC D. Genetic and epigenetic factors in etiology of diabetes mellitus type 1. **Pediatrics.**, v. 132, n. 6, p. 1112-1122, 2013.

STEFAN M.; ZHANG W.; CONCEPCION E.; YI Z.; TOMER Y. DNA methylation profiles in type 1 diabetes twins point to strong epigenetic effects on etiology. **J. Autoimmun.**, v. 50, p. 33-37, 2014.

STRAHL B. D.; ALLIS C. D. The language of covalent histone modifications. **Nature.**, v. 403, n. 6765, p. 41-45, 2000.

SZKUDELSKI T.; SZKUDELSKA K. Anti-diabetic effects of resveratrol. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1215, p. 34-39, 2011.

SZKUDELSKI T.; SZKUDELSKA K. Resveratrol and diabetes: from animal to human studies. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1852, n. 6, p. 1145-1154, 2015.

TAHILIANI M.; KOH K. P.; SHEN Y.; PASTOR W. A.; BANDUKWALA H.; BRUDNO Y.; AGARWAL S.; IYER L. M.; LIU D. R.; ARAVIND L.; RAO A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. **Science.,** v. 324, n. 5929, p. 930-935, 2009.

TAKAI D.; JONES P. A. Comprehensive analysis of CpG islands inhuman chromosomes 21 and 22. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 99, p. 3740–3745, 2002.

TAKAOKA M. J. Of the phenolic substances of white hellebore (Veratrum grandiflorum Loes. fil.). **J. Faculty Sci. Hokkaido Imperial University**, v. 3, p. 1-16, 1940.

TANNO M.; SAKAMOTO J.; MIURA T.; SHIMAMOTO K.; HORIO Y. Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD+-dependent histone deacetylase SIRT1. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 9, p. 6823-6832, 2007.

THAI M. V.; GURUSWAMY S.; CAO K. T.; PESSIN J. E.; OLSON A. L. Myocyte enhancer factor 2 (MEF2)-binding site is required for GLUT4 gene expression in transgenic mice. Regulation of MEF2 DNA binding activity in insulin-deficient diabetes. **J Biol Chem.,** v. 73, n. 23, p. 14285-14292, 1998.

TISHINSKY J. M.; DE BOER A. A.; DYCK D. J.; ROBINSON L. E. Modulation of visceral fat adipokine secretion by dietary fatty acids and ensuing changes in skeletal muscle inflammation. **Appl Physiol Nutr Metab.**, v. 39, n. 1, p. 28-37, 2014.

TSAO T. S.; STENBIT A. E.; FACTOR S. M.; CHEN W.; ROSSETTI L.; CHARRON M. J. Prevention of insulin resistance and diabetes in mice heterozygous for GLUT4 ablation by transgenic complementation of GLUT4 in skeletal muscle. **Diabetes.**, v. 48, n. 4, p. 775-782, 1999.

TUNG B. T.; RODRIGUEZ-BIES E.; THANH H. N.; LE-THI-THU H.; NAVAS P.; SANCHEZ V. M.; LÓPEZ-LLUCH G. Organ and tissue-dependent effect of resveratrol and exercise on antioxidant defenses of old mice. **Aging Clin. Exp. Res.**, v. 27, n. 6, p. 775-783, 2015.

UM J. H.; PARK S. J.; KANG H.; YANG S.; FORETZ M.; MCBURNEY M. W.; KIM M. K.; VIOLLET B.; CHUNG J. H. AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol. **Diabetes.**, v. 59, n. 3, p. 554-563, 2010.

VAQUERO A.; SCHER M.; LEE D.; ERDJUMENT-BROMAGE H.; TEMPST P.; REINBERG D. Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. **Mol Cell.,** v. 16, n. 1, p. 93-105, 2004.

VANDEN BERGHE W. Epigenetic impact of dietary polyphenols in cancer chemoprevention: lifelong remodeling of our epigenomes. **Pharmacol. Res.**, v. 65, n. 6, p. 565-576, 2012.

VERDONE L.; CASERTA M.; DI MAURO E. Role of histone acetylation in the control of gene expression. **Biochem. Cell Biol.,** v. 83, n. 3, p. 344-353, 2005.

VERDONE L.; AGRICOLA E.; CASERTA M.; DI MAURO E. Histone acetylation in gene regulation. **Brief Funct. Genomic Proteomic.**, v. 5, n. 3, p. 209-221, 2006.

VETTERLI L.; BRUN T.; GIOVANNONI L.; BOSCO D.; MAECHLER P. Resveratrol potentiates glucose-stimulated insulin secretion in INS-1E beta-cells and human islets through a SIRT1-dependent mechanism. **J. Biol. Chem.**, v. 286, n. 8, p. 6049-6060, 2011.

VORA J.; HEISE T. Variability of glucose-lowering effect as a limiting factor in optimizing basal insulin therapy: a review. **Diabetes Obes. Metab.,** v. 15, n. 8, p. 701-712, 2013.

YOKOMORI N.; TAWATA M.; ONAYA T. DNA demethylation during the differentiation of 3T3-L1 cells affects the expression of the mouse GLUT4 gene. **Diabetes.,** v. 48, n. 4, p. 685-690, 1999.

YONAMINE C Y.; PINHEIRO-MACHADO E.; MICHALANI M. L.; FREITAS H. S.; OKAMOTO M. M.; CORRÊA-GIANNELLA M. L.; MACHADO U. F. Resveratrol improves glycemic control in insulin-treated diabetic rats: participation of the hepatic territory. **Nutr Metab (Lond).,** v.13, n.44, 2016.

YOUSSEF D.; EL ABBASSI A.; JORDAN R. M.; PEIRIS A. N. Fructosamine—an underutilized tool in diabetes management: case report and literature review. **Tenn. Med.**, v. 101, n. 11, p. 31-33, 2008.

WEBER M.; HELLMANN I.; STADLER M. B.; RAMOS L.; PÄÄBO S.; REBHAN M.; SCHÜBELER D. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. **Nat. Genet.**, v. 39, n. 4, p. 457-466, 2007.

WEYER C.; BOGARDUS C.; MOTT D. M.; PRATLEY R. E. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **J. Clin. Invest.**, v. 104, n. 6, p. 787-794, 1999.

WU J. M.; WANG Z. R.; HSIEH T. C.; BRUDER J. L.; ZOU J. G.; HUANG Y. Z. Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine. **Int J Mol Med.**, v. 8, n. 1, p. 3-17, 2001.

ZHANG T.; KRAUS W. L. SIRT1-dependent regulation of chromatin and transcription: linking NAD(+) metabolism and signaling to the control of cellular functions. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1804, n. 8, p. 1666-1675, 2010.

ZHANG J.; CHEN L.; ZHENG J.; ZENG T.; LI H.; XIAO H.; DENG X.; HU X. The protective effect of resveratrol on islet insulin secretion and morphology in mice on a high-fat diet. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 97, n. 3, p. 474-482, 2012.

ZHAO Z.; HAN L. CpG islands: algorithms and applications in methylation studies. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 382, n. 4, p. 643-645, 2009.

ZHENG J.; CHEN L. L.; ZHANG H. H.; HU X.; KONG W.; HU D. Resveratrol improves insulin resistance of catch-up growth by increasing mitochondrial complexes and antioxidant function in skeletal muscle. **Metabolism.**, v. 61, n. 7, p. 954-965, 2012.

ZHU W.; QIN W.; ZHANG K.; ROTTINGHAUS G. E.; CHEN Y. C.; KLIETHERMES B.; SAUTER E. R. Trans-resveratrol alters mammary promoter hypermethylation in women at increased risk for breast cancer. **Nutr Cancer.**, v. 64, n. 3, p. 393-400, 2012.

ZIERATH J. R.; KROOK A.; WALLBERG-HENRIKSSON H. Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle. **Diabetologia.**, v. 43, n. 7, p. 821-835, 2000.

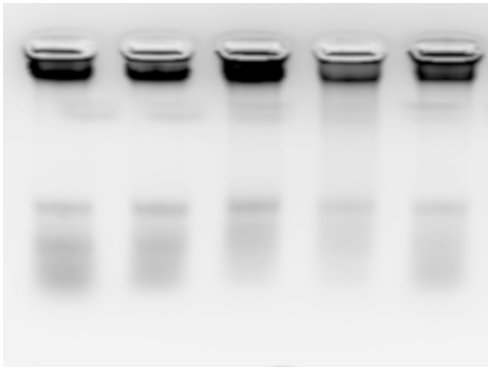
ZORZANO A.; PALACÍN M.; GUMÀ A. Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. **Acta Physiol. Scand.**, v. 183, n. 1, p. 43-58, 2005.

APÊNDICE

A – Gel de verificação de integridade do DNA e eficiência de digestão enzimática

Abaixo seguem as imagens do gel de agarose (1%) para verificação da integridade do DNA genômico extraído de músculo sóleo de rato e gastrocnêmio de camundongos.

A



B

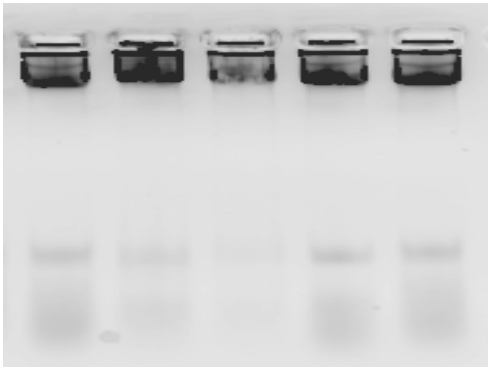
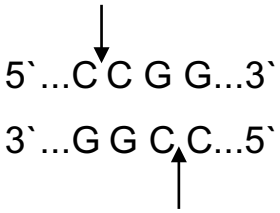


Figura 23 - Em A, DNA genômico obtido de músculo sóleo de rato. Em B, DNA genômico obtido de músculo gastrocnêmio de camundongo.

A figura abaixo mostra a eficiência da digestão pelas enzimas *HpaII* e *MspI*, utilizando amostras de plasmídeo pUC 19 metilada e não metilada. Junto, segue uma ilustração da disposição da clivagem.



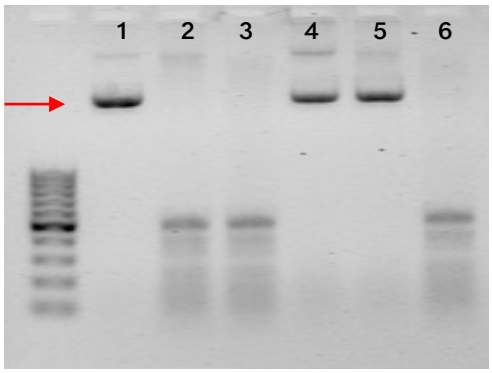


Figura 24 - Imagem de gel de agarose representando a eficiência da digestão das enzimas HpaII e MspI. Faixa 1: pUC 19 não metilada sem enzima; Faixa 2: pUC 19 não metilada + HpaII; Faixa 3: pUC 19 não metilada + MspI; Faixa 4: pUC 19 metilada sem enzima; Faixa 5: pUC 19 metilada + HpaII; Faixa 6: pUC 19 metilada + MspI.

B - Esquematização da localização das sequências CCGG e dos iniciadores para reação da PCR.

Abaixo segue a sequência da região promotora do gene *Slc2a4* de rato mostrando as 1000 bases situadas a montante da primeira base da região 5`UTR, identificada em vermelho. A sequência foi retirada da plataforma Ensembl.org e o código de identificação (ID) é ENSRNOT00000023256.5.

-1000

TCTCCCTCTAGGTGGCACTAGAAGCCTTGCACTTCTCTTGCGCTTTTTCTGAATTGAGCT

Sense (A)
CTCTCCACATTCTCTGCCAGTGCTCTCTCCCTGGACGTGCTTAGGTCGTGCCCTCTCAAC

TGGAGACCCAAAACAGGAGCTGACTCTGAAAAGCTTGTCGCCCACGCGGCCAGCACATGC

CTGGAGGCTCAGGGACTTCAGAGAGGGTGATGTGA**CCGG**CGTGAGCACCTGTCCCTTGGG

TTCCCTCCAGGAACCAATGTAGAGAAATGTGTGGAGGGGATGGGCCAGTAGACTGTGCAC
Anti-sense (A)
Sense (B)
CGCCCAGAAGTGCGTGGAAAGATAGGACGACCAGACACGGTTCTCAGACACACGGGGAGC

GGAAGTTATTGGTCCCTTGGGTCATCTCCTTGTGGGAAGCGAGTCGCGGACCCTTTAAGG

CTCCATCTCCCTTGCCCTCCCCCGCCTGGGACAGGCTGGGACAC**CCGG**GACCTGACATTT

Sense (C)
GGCGGAGCCTAACGTGGGAGCTAAAAATAGCCATT**CCGG**GTTACTTCGGGGCATTGTTTC
Anti-sense (B)

TGACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACAC

CCGCAGGCTCTGTGTCACCCTGCTGGAGTTACCCCGTACCCTGGCAAGTACACCTAGCCC
Anti-sense (C)

ATACCCTCCTCTTCCACCTCTCAGGGGGACCAGTTGCACTAACTCTTTAAGAAATTTCGC

AGTCCAGGATTTTGGGTGGCGGGAAGAGCCTTTTGTTCCAAGGACCCCACTTTGAAATCC

CAGAGGCAGGCGGGAACCTTAGGGGCGTGTCTCCCCAGCTGGCATTAATCTTAGGGTTGG

GGGCGTGGCCTTTTGGGGTGTGCGGGCTCCTGGCCAATGGGTGTTGTGAAGGGCGTGGCC

CATGGCGGGGCGGGAGTGAGGAGGTGGCTTCAGCTCTCCGCATCTTTCCCCCTCAAGCCC

ATCTCATTAGATCCCGGAGAGCCTTGGTGCTCTCCGGTT **-1/+1** CTTGGGTTGTGGCAG

TGAGTCCCACCAGACCCGCCCTTTGCACACCACTTCCGAAGGCCGGGGTCTTCTGCCCGC

CAGGCCGGGACACTATACCCTATTCATTTTTTTATTGCAGTGCCTGAGTCTTCTTTTAAA

ACAAG**ATG**

Figura 25 - Em negrito estão destacadas as sequências 5`CCGG 3` analisadas, sublinhado estão destacadas as posições de alinhamento dos pares de iniciadores da reação de PCR em tempo real. Em letra vermelha está representada a região 5`UTR e o ATG (primeiro códon).

Abaixo segue a sequência da região promotora do gene *Slc2a4* de camundongo mostrando as 1000 bases situadas a montante da primeira base da região 5`UTR, identificada em vermelho. A sequência foi retirada da plataforma Ensembl.org e o código de identificação (ID) é ENSMUST00000018710.12.

-1000

TTGTAGGTTATTGAGCTCTCAGGGGAAGGGTTAATAGAAGAGAGCCACCCCAGAAGTTAG

CTACCCTGGTGCAATCCACTAAGGTTCCTCGCTCTCCCTCTAGGTGGCGCCAGAAGCCTT

GCACTTCTCTTGGGCCTTTTTCTGAATTGAGCTCTCTCTCCACATTCTTCGCCAGCTCTC

TCCCTGGACGTGCTTAGGTCGTGCCCTCTCAGCTGTAGACCCAAAACAGTAGCTGACTCT

GGAAAGCTTGTCGCCCACGCGGCCAGCACATGCCTGGAGGCTCAGGGACTTCAGGGAGGG

TGGTGTGACTGGCGTGAGCACCTGTCCCTTGGGTCCCCTCCAAGAACCAGTGTAGAGACT

ATGTGGAGGGGATGGGCCAGTAGGCAGCGCGCCGCCCAGAGATGCGTGGAAAGAAAGGAC

GATCAGGCATGGTCTCCAGATACACTAGGAACGGAAGTTATTGGTCCCTTGGATCATCTC

Sense

CTCGTGGGAAGCGTGTCGCGGACCCTTTAAGGCTCCATCTCCTTTGCCCTCCCCCGCCTG

GGACAGGCTGGGACAC**CCGG**GACCTGACATTTGGCGGAGCCTAACGTGGGAACTAAAAAT

AGCCACT**CCGG**GTTACTTCGGGGCATACACACATACACACACACACACACACACACAC

GCGGGCTCTATGTCATCCTGCTGGAGTTACCCCGTACCCTGGCAAGTACATGTAGCCCAT

Anti-sense

ACCCTCCTCTTCGACCTTTCAGGGGGACCAGCTGCACTCAATTCTTTCAGAAATTTCGCA

GTCCAAGATTTTGGATGGCGGGAAGAGCCTTTTGTTCCAAGGACCCTACTTTGAAAACTC

AGAAGCAGGCGGGAACCTTAGGGGCGTGTCTCCCCAGCCAGCACTAGGGCTAGGGGTGGG

GGCGTGGCCTTTTGGGGTGTGCGGGCTCCTGGCCAATGGGTGTTGTGAAGGGCGTGTCCT

ATGGCGGGGCGGGAGTGGGGAGGTGGCTTCAGCTCTCCGC **-1/+1** GCCTTGGTGCTCTC

CGGTTCCGTGGGTTGTGGCAGTGAGTCCCACCAGACCCGCCCTTTGCACACGGCTTCCGA

ACGCCGGGGTCTCGTGCCGGCCAGGCCCGGACCCTATACCCTATTCATTTTTTTCTTATT

GCAGCGCCTGAGTCTTTTCTTCTTTTAAAACAAG**ATG**

Figura 26 - Em negrito estão destacadas as sequências 5`CCGG 3` analisadas, sublinhado estão destacadas as posições de alinhamento dos pares de iniciadores da reação de PCR em tempo real. Em letra vermelha está representada a região 5`UTR e o ATG (primeiro códon).

C - Gel de verificação da sonicação da cromatina

A imagem abaixo representa um gel de agarose com amostra de cromatina sonicada em curso que varia de zero a doze pulsos, sendo cada pulso possui duração de 10 segundos e amplitude 35 %.

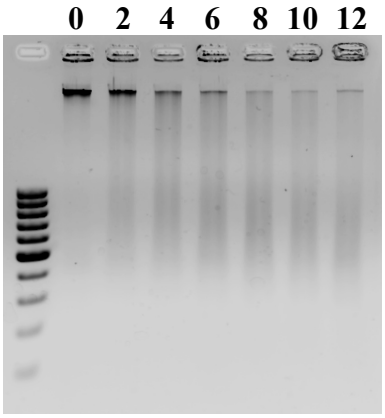


Figura 27 - Cromatina sonicada em diferentes quantidades de pulso.

D - Esquematização da localização dos iniciadores para reação da PCR após ensaio de imunoprecipitação da cromatina

Abaixo segue a sequência da região promotora do gene *Slc2a4* de rato mostrando as 700 bases situadas a montante da primeira base da região 5`UTR, identificada em vermelho. A sequência foi retirada da plataforma Ensembl.org e o código de identificação (ID) é ENSRNOT00000023256.5.

-700

Sense

CGCCCAGAAGTGCGTGGAAAGATAGGACGACCAGACACGGTTCTCAGACACACGGGGAGC

GGAAGTTATTGGTCCCTTGGGTCATCTCCTTGTGGGAAGCGAGTCGCGGACCCTTTAAGG

E-box

CTCCATCTCCCTTGCCCTCCCCCGCCTGGGACAGGCTGGGACACCCGGGACCTGA**CATTT**

MEF2 **TR**

GGCGGAGCCTAACGTGGGAG**CTAAAAATA**GCCATTCCGGGTTACTTCGGGGCATTGTTTC

Anti-sense

TGACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACAC

CCGCAGGCTCTGTGTCACCCTGCTGGAGTTACCCCGTACCCTGGCAAGTACACCTAGCCC

ATACCCTCCTCTTCCACCTCTCAGGGGGACCAGTTGCACTAACTCTTTAAGAAATTTCGC

AGTCCAGGATTTTGGGTGGCGGGAAGAGCCTTTTGTTCCAAGGACCCCACTTTGAAATCC

CAGAGGCAGGCGGGAACCTTAGGGGCGTGTCTCCCCAGCTGGCATTAATCTTAGGGTTGG

GGGCGTGGCCTTTTGGGGTGTGCGGGCTCCTGGCCAATGGGTGTTGTGAAGGGCGTGGCC

CATGGCGGGGCGGGAGTGAGGAGGTGGCTTCAGCTCTCCGCATCTTTCCCCCTCAAGCCC

ATCTCATTAGATCCCGGAGAGCCTTGGTGCTCTCCGGTTC **-1/+1** CTTGGGTTGTGGCA

GTGAGTCCCACCAGACCCGCCCTTTGCACACCACTTCCGAAGGCCGGGGTCTTCTGCCCG

CCAGGCCGGGACACTATACCCTATTCATTTTTTTATTGCAGTGCCTGAGTCTTCTTTTAA

AACAAG**ATG**

Figura 28 - Em negrito está destacada as posições de alinhamento dos pares de iniciadores da reação de PCR em tempo real após ensaio de imunoprecipitação da cromatina com os anticorpos H3K9me3, H3 Ac e MEF2. Em letra vermelha está representada a região 5`UTR e o ATG (primeiro códon).

Abaixo segue a sequência da região promotora do gene *Slc2a4* de camundongo mostrando as 1000 bases situadas a montante da primeira base da região 5`UTR, identificada em vermelho. A sequência foi retirada da plataforma Ensembl.org e o código de identificação (ID) é ENSMUST00000018710.12.

-1000

TTGTAGGTTATTGAGCTCTCAGGGGAAGGGTTAATAGAAGAGAGCCACCCCAGAAGTTAG

CTACCCTGGTGCAATCCACTAAGGTTCCTCGCTCTCCCTCTAGGTGGCGCCAGAAGCCTT

GCACTTCTCTTGGGCCTTTTTCTGAATTGAGCTCTCTCTCCACATTCTTCGCCAGCTCTC

TCCCTGGACGTGCTTAGGTCGTGCCCTCTCAGCTGTAGACCCAAAACAGTAGCTGACTCT

GGAAAGCTTGTCGCCCACGCGGCCAGCACATGCCTGGAGGCTCAGGGACTTCAGGGAGGG

TGGTGTGACTGGCGTGAGCACCTGTCCCTTGGGTCCCCTCCAAGAACCAGTGTAGAGACT

ATGTGGAGGGGATGGGCCAGTAGGCAGCGCGCCGCCCAGAGATGCGTGGAAAGAAAGGAC

GATCAGGCATGGTCTCCAGATACACTAGGAACGGAAGTTATTGGTCCCTTGGATCATCTC

Sense

CTCGTGGGAAGCGTGTCGCGGACCCTTTAAGGCTCCATCTCCTTTGCCCTCCCCCGCCTG

E-box **MEF2**

GGACAGGCTGGGACACCCGGGACCTGA**CATTTG**GCGGAGCCTAACGTGGGAA**CTAAAAAT**

TR

AGCCACTCC**GGGTTACTTCGGGGCA**TACACACATACACACACACACACACACACAC

GCGGGCTCTATGTCATCCTGCTGGAGTTACCCCGTACCCTGGCAAGTACATGTAGCCCAT

Anti-sense

ACCCTCCTCTTCGACCTTTCAGGGGGACCAGCTGCACTCAATTCTTTCAGAAATTTCGCA

GTCCAAGATTTTGGATGGCGGGAAGAGCCTTTTGTTCCAAGGACCCTACTTTGAAAACTC

AGAAGCAGGCGGGAACCTTAGGGGCGTGTCTCCCCAGCCAGCACTAGGGCTAGGGGTGGG

GGCGTGGCCTTTTGGGGTGTGCGGGCTCCTGGCCAATGGGTGTTGTGAAGGGCGTGTCCT

ATGGCGGGGCGGGAGTGGGGAGGTGGCTTCAGCTCTCCGC **-1/+1** GCCTTGGTGCTCTC

CGGTTCCGTGGGTTGTGGCAGTGAGTCCCACCAGACCCGCCCTTTGCACACGGCTTCCGA

ACGCCGGGGTCTCGTGCCGGCCAGGCCCGGACCCTATACCCTATTCATTTTTTTCTTATT

GCAGCGCCTGAGTCTTTTCTTCTTTTAAAACAAG**ATG**

Figura 29 - Em negrito está destacada as posições de alinhamento dos pares de iniciadores da reação de PCR em tempo real após ensaio de imunoprecipitação da cromatina com os anticorpos H3K9me3, H3 Ac e MEF2. Em letra vermelha está representada a região 5`UTR e o ATG (primeiro códon).

E - Esquematização de um fragmento da região promotora do gene *Slc2a4* destacando sítios de ligação dos fatores NF-1 e O/E-1.

Abaixo segue um fragmento da região promotora do gene *Slc2a4* entre as bases -880 e -720 situadas a montante da primeiro base da região 5`UTR. Na figura estão destacadas as posições da sequência CCGG e dos sítios de reconhecimento dos fatores NF-1 e O/E-1 descritos na literatura.

-800

CTGGAGGCTCAGGGACTTCAGAGAGGGTGATGTGA**CCGG**CGTGAGCACCT

NF-1 NF-1
GTCCCTTGGGTTCCCTCCAGGAACCAATGTAGAGAAATGTGTGGAGGGGA
O/E-1 O/E-1

TGGGCCAGTAGACTGTGCAC **-720**

Figura 30 - Em negrito está destacada a sequência 5`CCGG 3`, sublinhado estão destacadas as posições dos sítios de ligação dos fatores NF-1 e O/E-1 descritos na literatura.

Avaliação do conteúdo de mRNA dos genes *Nfib* e *Ebf-1* por PCR em tempo real (SYBR Green)

A figura 30 A e B mostra que o conteúdo de mRNA dos genes *Nfib* e *Ebf*-1 aumentaram em músculo sóleo de animais DM1 e o tratamento com insulina restaurou esses valores

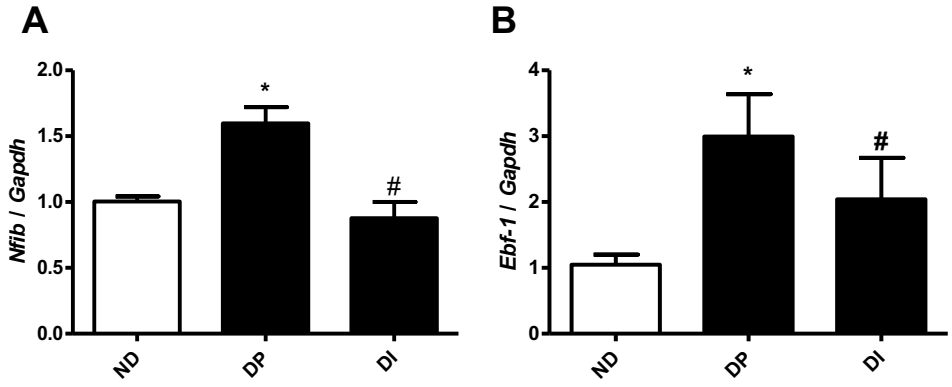


Figura 31 - Conteúdo de mRNA de genes Nfib (A) e Ebf-1 (B) de ratos não diabéticos (ND), diabéticos tipo 1 (DM1) e diabéticos tipo 1 tratados com insulina (DM1 I). Valores expressos porcentagem relativa ao input ± erro padrão médio (n=5). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. *P<0.05 vs. ND e #P<0.05 vs. DM1.

A tabela abaixo mostra as sequências dos iniciadores para avaliar o conteúdo de mRNA dos genes *Nfib* e *Ebf*-1 em músculo sóleo de ratos.

Tabela 12 - Sequências dos iniciadores utilizados no qPCR e tamanho do amplicon.

Gene	Sense	Anti-sense	Amplicon
Nfib	GTGCGTTTTAAGGCGAAGTC	ACATCCGCTTCTCATGCTTT	168
Ebf-1	GGGCTCACTTTGAGAAGCAG	GTCTTTTCGCTGTTGGCTTC	160

F - Avaliação do conteúdo de mRNA dos genes *Il-6, Tnf, Rela e Nfkb1* no tecido adiposo periepididimal por PCR em tempo real (SYBR Green)

A figura abaixo mostra que no tecido adiposo periepididimal dos animais DM2 o conteúdo de mRNA dos genes *Il-6*, *Tnf*, *Rela* e *Nfkb1* aumentaram e o tratamento com resveratrol reverteu parcialmente essas alterações.

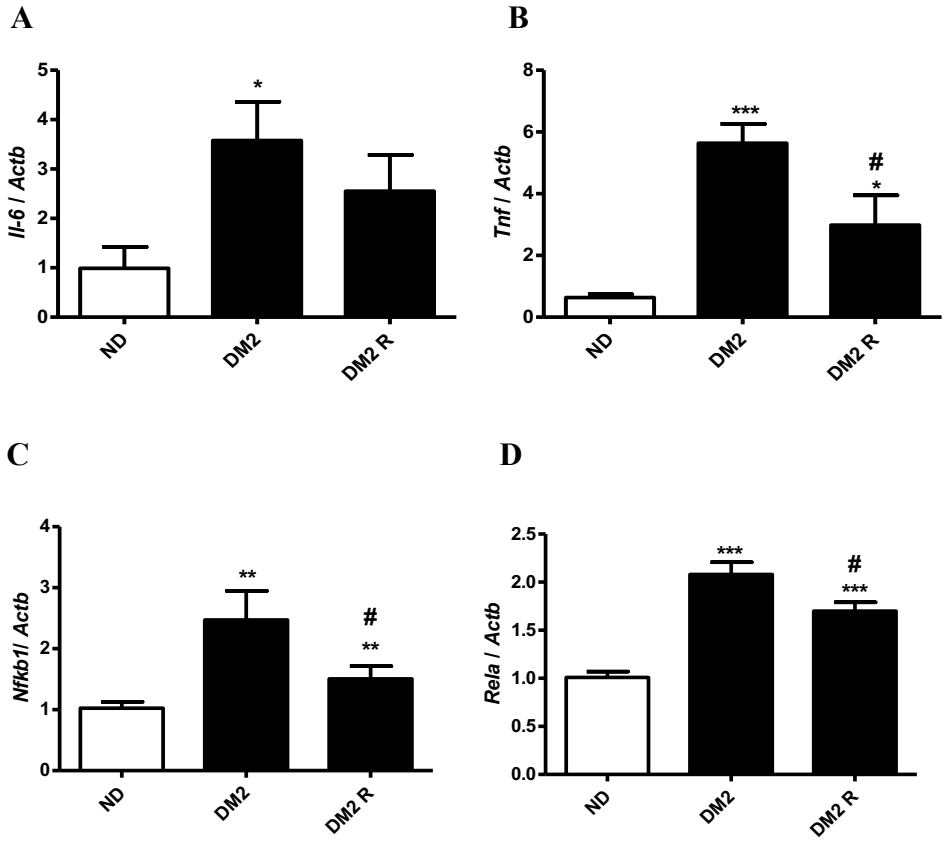


Figura 32 - Conteúdo de mRNA de genes associados à resposta pró-inflamatória. Em (A) Il-6, (B) Tnf, (C) Rela e (D) Nfkb1, de tecido adiposo periepididimal de camundongos não diabéticos (ND), diabéticos tipo 2 (DM2) e diabéticos tipo 2 tratados com resveratrol (DM2 R). Valores expressos porcentagem relativa ao input ± erro padrão médio (n=5). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls. *P<0.05, **P<0.01 e ***P<0.001 vs. ND e #P<0.05 vs. DM2.

A tabela abaixo mostra as sequências dos iniciadores para avaliar o conteúdo de mRNA dos genes em tecido adiposo periepididimal dos camundongos.

Tabela 13 - Sequências dos iniciadores utilizados no qPCR.

Gene	Sense	Anti-sense
Tnf	GAACTGGCAGAAGAGGCACT	GGTCTGGGCCATAGAACTGA
Il6	CCGGAGAGGAGACTTCACAG	TCCAGTTTGGTAGCATCCATC
Actb	ACTGGGACGACATGGAGAAG	GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA
Rela	GCAAGGGCATTATCGACTCT	CATAACGTTGCAGGAAGCTG
Nfkb1	CTGACCTGAGCCTTCTGGAC	GCAGGCTATTGCTCATCACA

ANEXO

Epigenetic regulation of *Slc2a4* gene in diabetes: a new target to improve glycemic control

Caio Y. Yonamine [1]; Ana B. Alves-Wagner [1]; João V. Esteves [1]; Maristela M. Okamoto [1]; Maria L. Correa-Giannella [2]; Daniel Giannella-Neto [3]; Ubiratan F. Machado [1]

[1] Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

[2] Laboratory of Carbohydrates and Radioimmunoassay (LIM 18), Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

[3] University Nove de Julho, São Paulo, Brazil.

Corresponding author: Ubiratan Fabres Machado (ubiratan@icb.usp.br)

Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Av. Prof. Lineu Prestes 1524, 05508-900

São Paulo (SP), Brazil

Abstract:

It is well recognized that there is therapeutic advantage for glycemic control by increasing glucose transporter isoform 4 (GLUT4) concentrations in skeletal muscle, which can be reached by enhancing the *Slc2a4* gene expression. Epigenetic alterations at gene promoter region lead to alterations in gene expression effectiveness. Histone post-translational modifications (PTMs) such as lysine (K) acetylation of histone 3 (H3KAc) and tri-methylation of H3K9 (H3K9me3) are some of the most studied regulations. We investigated these histone PTMs at *Slc2a4* gene in skeletal muscle of uncontrolled or insulin-treated diabetic rats. PTMs were investigated at the inhibitory -889/-719 and the stimulatory -670/-461 segments of the promoter region. The results reveal that diabetes decreased *Slc2a4*/GLUT4 expression, which was accompanied by reduced H3KAc and increased H3K9me3 content at -670/-461 segment. Besides, we observed a decreasing binding activity of the myocyte enhancer factors 2A and 2D, potent enhancers of *Slc2a4* transcription that bind inside the -670/-461 segment. These data reveal a mechanism by which the epigenetic regulation can reduce *Slc2a4*/GLUT4 expression in uncontrolled diabetic states, thus contributing to impair plasma glucose clearance. In sum, this study points out the fact that *Slc2a4* epigenetic modification may work as therapeutic target to improve glycemic control.

Key words: GLUT4, histone ptm, h3k9 methylation, histone acetylation, MEF2A, MEF2D

Introduction

The glucose transporter isoform 4 (GLUT4) protein, which is encoded by the solute carrier family 2 member 4 gene (*Slc2a4*) is the main glucose transporter found in adipose tissue, heart and skeletal muscle. In those territories, insulin stimulates glucose uptake through the regulation of a dynamic traffic of intracellular vesicles containing GLUT4 from cytoplasm to the plasma membrane, as well as the transcription of *Slc2a4* gene.[1] Decreased *Slc2a4* expression has been described in both type 1 and type 2 diabetes mellitus[1,2] and transgenic animals have revealed the fundamental role of *Slc2a4* expression upon glycemic homeostasis. The heterozigotic deletion of *Slc2a4* gene in skeletal muscle leads to whole-body insulin resistance and glucose intolerance;[3,4] while, on the other hand, the overexpression of *Slc2a4* gene in skeletal muscle recovers insulin sensitivity and improves glycemic homeostasis in diabetic *db/db* mice.[5,6] These evidences support the idea that up-regulation of *Slc2a4* gene is an important strategy to improve blood glucose clearance.[1]

Recently, studies have been demonstrating an interesting connection between epigenetic mechanisms and development/progression of diabetes.[7-9] The epigenetic concept consists of chemical alterations that regulate the DNA functions including replication, repair and gene expression, despite unchanged nucleotide sequence.[10]

In this context, histone post-translational modification (PTM) is one of the most studied epigenetic modifications, given its ability to modify gene expression either by directly affecting chromatin structure or by interfering with the binding of proteins to chromatin.[11] Histone PTMs include methylation, acetylation and ubiquitination of lysines (K), methylation of arginines (R) and phosphorylation of serines and threonines; the majority of them localized in regulatory gene regions. Among the PTMs associated with active transcription are lysine (K) acetylation of histone 3 (H3KAc) and histone 4 (H4KAc) and di- or tri-methylation (me) of H3K4 (H3K4me2 or H3K4me3) while high contents of methylated sites at H3K9, H3K27 and H4K20 are

associated with transcriptional repression.[12,13] Among these regulations, H3KAc and H3K9me3 are the most studied.

Some studies have suggested that epigenetic mechanisms participate in the regulation of *Slc2a4* gene expression in response to acute exercise or nutritional status;[14,15] however, regarding diabetes, nothing is known about these regulations.

Considering the epigenetic mechanisms as a potential therapeutic powerful tool, the improvement of knowledge in this area can amplify the targets for preventive and treatment strategies to control gene expression in metabolic disturbed diseases, such as diabetes. Taking into account this issue, the aim of the present study was to investigate two types of histone PTMs, the H3KAc and H3K9me3, at the *Slc2a4* promoter in the skeletal muscle of insulinopenic diabetic rats, seeking to associate these modifications to the diabetes-induced alterations of *Slc2a4* gene expression.

Material and Methods

Animals and experimental design

Male 60-day old Wistar rats were obtained from the Animal Center of the Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo. At 75 days of life, the rats were rendered diabetic by intravenous injection of streptozotocin (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA), at a dose of 50 mg/Kg body weight, solubilized in citrate buffer; non-diabetic control rats (ND) were injected with citrate buffer. The procedure was performed in halothane (Tanohalo®, Cristália, Itapira, SP, Brazil) anaesthetized animals. Twenty days later (95-day old rats), the diabetic rats were treated with 0.9% NaCl as placebo (DM) or 5 U/day NPH insulin (Humulin®, Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA) (DMI). Treatments were conducted during thirty days, totalizing 50 days of diabetes. Age-matched ND rats received no treatment.

One day before the end of the treatment period, animals were placed in metabolic cages for 24-hour urine collection (starting at 10:00 AM). At the day-after (preceded by 4 hours of food deprivation), the animals were anaesthetized with 60 mg/Kg sodium thiopental (Cristália®, Itapira, São Paulo, Brazil), and tail blood and soleus muscle were sampled for further analyses. Plasma and urinary glucose concentrations were measured as previously described[2].

The experimental protocol was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (#194/2013).

Total RNA extraction and qRT-PCR for quantification of Slc2a4 mRNA expression

Total RNA from soleus muscle was extracted by TRIzol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Following the reverse transcriptase (RT) reaction, the qPCR amplification was performed using Taqman® PCR master mix kit (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA), and carried out in a StepOne Plus Instrument (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA). The method of $2^{-\Delta\Delta Ct}$ was adopted for analysis. Beta-2 microglobulin (*B2m*) was chosen as a reference gene, after comparison of the gene stability with *Gapdh* and *Hprt1* genes. Details of Taqman® PCR are presented in Table 1.

Total protein extraction and Western blotting for quantification of GLUT4 protein

The soleus muscle was processed and GLUT4 was quantified as previously described[16], using the anti-GLUT4 antibody 07-1404 (EMD Millipore, Billerica, MA, USA,). Results were normalized by optical densitiy of the respective lanes, stained by Ponceau.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay for histone PTMs analysis

The chromatin immunoprecipitation[17] was performed using 500 μg of nuclear protein plus anti-histone H3K9me3, anti-histone H3KAc (K9, 14, 18, 23,27) or anti-MEF2D antibodies

(Table 1). Unspecific rabbit IgG was used as mock. After immunoprecipitation, DNA/protein complexes were eluted, DNA was purified. The purified DNA and input genomic DNA were analyzed by quantitative (q) PCR (Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) using a StepOne Plus Instrument (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA). Two regions of the *Slc2a4* promoter gene, characterized by repressor or enhancer activities, were separately analyzed (detail in Table 1). Results were calculated using the formula: $2^{\wedge-(Ct\ Input - Ct\ IP)}$ x 100, related to the respective input value, and thus normalized considering the mean of ND values as 1.0.

Slc2a4 promoter gene positions of amplified segments and binding sites of transcription factors.

Positions of the segments and binding sites presented here are in accordance with the transcriptional start site of the rat promoter sequence described in www.ensembl.org. Althogh these positions do not match to some other described elsewere, the alignhement of the sequences shows 100% of identity.

Statistical Analysis

All data were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). The means were compared by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Newman-Keuls post-test, after checking the variances by Bartlett's test. Twenty four-hour urinary glucose was analyzed by the Kruskal-Wallis nonparametric test, followed by Dunn post-test. Differences were considered statistically significant at $P<0.05$.

Results

Diabetes represses Slc2a4/GLUT4 expression in skeletal muscle

As expected, diabetic animals developed metabolic changes compatible with an insulinopenic condition (Figure 1A to D), such as reduced body weight and increased plasma glucose and frutosamine and 24-hour glycosuria. Additionally, diabetes induced a significant reduction of *Slc2a4* mRNA and GLUT4 protein expression (Figure 1E and F). Insulin treatment restored all these variables.

Diabetes induces histone PTMs in Slc2a4 gene promoter

Two segments of *Slc2a4* promoter gene were separately analyzed: the -889/-719 and -670/-461 sequences, which are currently associated with repression and enhancing of transcriptional activity, respectively.

In the *Slc2a4* -889/-719, diabetes reduced the H3KAc and increased the H3K9me3 bound, and insulin treatment reversed the H3K9me3 regulation only (Figure 2 A and B). Considering that: 1) these regulations contribute to the impairment of the binding activity of transcriptional factors; 2) this segment contains binding sites for *Slc2a4* repressors; and 3) the *Slc2a4*/GLUT4 expression decreased; we conclude that the histone H3 PTMs at the *Slc2a4* -889/-719 segment do not contribute to the regulation of *Slc2a4* gene expression in diabetes.

Similarly, in the *Slc2a4* -670/-461 segment, diabetes reduced the H3KAc and increased the H3K9me3 bound, and insulin treatment reversed the H3K9me3 regulation only (Figure 2 C and D). Considering that: 1) these regulations contribute to the impairment of the binding activity of transcriptional factors; 2) this segment contains binding sites for *Slc2a4* enhancers; and 3) the *Slc2a4*GLUT4 expression decreased; we conclude that the histone H3 PTMs at the *Slc2a4* -670/-461 segment plays an important role in the regulation of *Slc2a4* gene expression in diabetes.

In order to confirm the participation of the *Slc2a4* -670/-461 segment in the *Slc2a4* transcriptional regulation, we investigated the binding activity of MEF2 binding site;

highlighting that this binding site is located in the center of a cluster of *Slc2a4* enhancer transcription factors' binding sites, and that MEF2A/D have been proposed as the most powerful enhancers of *Slc2a4* transcription in oxidative muscles[18]. The ChIP assay revealed (Figure 2E) that diabetes reduced (by 40%) the MEF2A/D binding into the -670/-461 segment of *Slc2a4*, and that was reversed by insulin treatment.

Discussion

The present study reveals for the first time that diabetes triggers epigenetic modifications in the *Slc2a4* gene in skeletal muscle of rats, which could participate in the decreasing of GLUT4 expression, thus representing a promising target for development of new adjunctive therapeutic approaches for diabetes mellitus.

We observed a diabetes-induced reduction in acetylated H3K9,14,18,23,27 content (H3Ac) in the *Slc2a4* promoter, which could induce a closed chromatin state in the promoter segments, thus reducing the binding of transcriptional factors. This effect at the -670/-461 segment, in which powerful enhancers are known to bind, could contribute to reduced *Slc2a4*/GLUT4 expression. However, this effect at the -889/-719 segment, which contains binding sites for repressor transcription factors, could exert an opposite effect, increasing *Slc2a4*/GLUT4 expression, which did not occur. Thus, we conclude that the regulation at the -670/-461 segment prevailed over the effect at the -889/-719 segment.

Similarly, diabetes increased H3K9me3 content in both studied segments of the *Slc2a4* promoter. This histone PTM at the -670/-461 segment can also contribute to impair the binding of factors that enhance *Slc2a4* transcriptional activity, decreasing *Slc2a4*/GLUT4 expression. In turn, increased H3K9me3 content at the -889/-719 segment could result in impaired binding of factors that repress *Slc2a4* transcriptional activity, increasing *Slc2a4*/GLUT4 expression,

which did not occur. We hypothesized that the effect of increased H3K9me3 at the -670/-461 segment prevailed over the effect of increased H3K9me3 at the -889/-719 segment.

The analyzed -670/-461 enhancer segment of the *Slc2a4* promoter contains binding sites for MyoD (E-box, -525/-520), MEF2A/D (-500/-492) and TR-alpha (-483/-468) transcriptional factors, which display a tripartite positive cooperation in the *Slc2a4* transcriptional activity[19]. Furthermore, the greater phosphorylation of MEF2A/D in oxidative muscles, such as soleus, highlights the fundamental role of MEF2A/D in this enhancing activity[20]. Besides, the Krüppel-like factor 15 (KLF15) binds to a site (-539/-535) that is also near to the MEF2 binding site, and the KLF15 has already been reported to synergize with MEF2A and enhance *Slc2a4* transcriptional activity[21]. Thus, to evaluate a functional repercussion of the observed histone PTMs, MEF2 binding activity in its responsive element contained in the -670/-461 segment was assessed, and the results were as expected: the MEF2A/D binding activity was reduced in diabetes and insulin treatment reversed this decreased binding to near control level. Thus, it is reasonable to propose that diabetes-induced epigenetic modifications at *Slc2a4* promoter contribute to reduce *Slc2a4*/GLUT4 protein expression.

Interestingly, diabetes-induced H3KAc at -670/-461 segment did not reverse with insulin treatment, as H3K9me3 did. Thus, considering that only the H3K9me3 regulation at -670/-461 segment is fully in line with the regulation of *Slc2a4*/GLUT4 expression, we suppose that the effect of H3K9me3 is superimposed on the effect of H3KAc.

Histone PTMs have been recognized as complex phenomena whose specific combinations determine the transcriptional status of a given DNA sequence[11-13]. Moreover, the occurrence of cross-talk between histone PTMs has been described, such as competitive antagonism and cooperation between modifications, which renders the control of gene expression even more complex[12]. Although further studies are necessary to clarify how the different histone PTMs at *Slc2a4* promoter interact to modulate *Slc2a4*/GLUT4 expression in

skeletal muscle, the present study supports the hypothesis that epigenetic mechanisms interfere with the accessibility of transcription factors to the enhancer segment of the *Slc2a4* promoter in the diabetic setting.

In sum, this study reveals an additional mechanism by which chronic hyperglycemia worsens skeletal muscle glucose disposal, and points out the fact that *Slc2a4* epigenetic modification may work as therapeutic target to improve glycemic control.

Conflicts of interest: The authors have nothing to disclose.

Aknowledgments: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2012/04831-1). C.Y.Y. was recipient of CNPq fellowship #142187/2013-5.

Author Contributions: C.Y. Y., A.B.A., J.V.E and M.M.O researched data; C.Y.Y., M.L.C. and D.G contributed to discussion; M.L.C. and D.G reviewed/edited manuscript; U.F.M. researched/analyzed data and wrote/reviewed/edited the manuscript. **Guarantor:** Ubiratan Fabres Machado.

References

1. Corrêa-Giannella ML, Machado UF. SLC2A4gene: a promising target for pharmacogenomics of insulin resistance. Pharmacogenomics. 2013;14(8):847-50. doi: 10.2217/pgs.13.45.
2. Okamoto MM, Anhê GF, Sabino-Silva R, Marques MF, Freitas HS, Mori RC, Melo KF, Machado UF. Intensive insulin treatment induces insulin resistance in diabetic rats by impairing glucose metabolism-related mechanisms in muscle and liver. J Endocrinol. 2011;211(1):55-64. doi: 10.1530/JOE-11-0105.
3. Tsao TS, Burcelin R, Katz EB, Huang L, Charron MJ. Enhanced insulin action due to targeted GLUT4 overexpression exclusively in muscle. Diabetes. 1996;45(1):28-36. doi:10.2337/diab.45.1.28.
4. Zisman A, Peroni OD, Abel ED, Michael MD, Mauvais-Jarvis F, Lowell BB, Wojtaszewski JF, Hirshman MF, Virkamaki A, Goodyear LJ et al. Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. Nat Med. 2000;6(8):924-8. doi: 10.1038/78693

5. Gibbs EM, Stock JL, McCoid SC, Stukenbrok HA, Pessin JE, Stevenson RW, Milici AJ, McNeish JD. Glycemic improvement in diabetic db/db mice by overexpression of the human insulin-regulatable glucose transporter (GLUT4). J Clin Invest. 1995;95(4):1512-8. doi: 10.1172/JCI117823.
6. Brozinick JT Jr, McCoid SC, Reynolds TH, Nardone NA, Hargrove DM, Stevenson RW, Cushman SW, Gibbs EM. GLUT4 overexpression in db/db mice dose-dependently ameliorates diabetes but is not a lifelong cure. Diabetes. 2001;50(3):593-600. doi: 10.2337/diabetes.50.3.593.
7. Gut P, Verdin E. The nexus of chromatin regulation and intermediary metabolism. Nature. 2013;502(7472):489-98. doi: 10.1038/nature12752.
8. Kirchner H, Osler ME, Krook A, Zierath JR. Epigenetic flexibility in metabolic regulation: disease cause and prevention? Trends Cell Biol. 2013;23(5):203-9. doi: 10.1016/j.tcb.2012.11.008.
9. Howlett KF, McGee SL. Epigenetic regulation of skeletal muscle metabolism. Clin Sci (Lond). 2016;130(13):1051-63. doi: 10.1042/CS20160115.
10. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. Nat Genet. 2003;33 Suppl:245-54. doi:10.1038/ng1089.
11. Gibney ER, Nolan CM. Epigenetics and gene expression. Heredity (Edinb). 2010;105(1):4-13. doi: 10.1038/hdy.2010.54.
12. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. Cell Res. 2011;21(3):381-95. doi: 10.1038/cr.2011.22.
13. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. Cell. 2007 23;128(4):693-705. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.005.
14. Smith JA, Kohn TA, Chetty AK, Ojuka EO. CaMK activation during exercise is required for histone hyperacetylation and MEF2A binding at the MEF2 site on the Glut4 gene. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2008;295(3):E698-704. doi: 10.1152/ajpendo.00747.2007.
15. Wang J, Cao M, Yang M, Lin Y, Che L, Fang Z, Xu S, Feng B, Li J, Wu D. Intra-uterine undernutrition amplifies age-associated glucose intolerance in pigs via altered DNA methylation at muscle GLUT4 promoter. Br J Nutr. 2016;116(3):390-401. doi: 10.1017/S0007114516002166.
16. Moraes PA, Yonamine CY, Pinto Junior DC, Esteves JV, Machado UF, Mori RC. Insulin acutely triggers transcription of Slc2a4 gene: participation of the AT-rich, E-box and NFKB-binding sites. Life Sci. 2014;114(1):36-44. doi: 10.1016/j.lfs.2014.07.040.
17. Kuo MH, Allis CD. In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment. Methods. 1999;19(3):425-33. doi: 10.1006/meth.1999.0879.
18. Santalucía T, Moreno H, Palacín M, Yacoub MH, Brand NJ, Zorzano A. A novel functional co-operation between MyoD, MEF2 and TRalpha1 is sufficient for the induction of GLUT4 gene transcription. J Mol Biol. 2001;314(2):195-204. doi: 10.1006/jmbi.2001.5091.
19. Zorzano A, Palacín M, Gumà A. Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. Acta Physiol Scand. 2005;183(1):43-58. doi: 10.1111/j.1365-201X.2004.01380.x.
20. Dunn SE, Simard AR, Bassel-Duby R, Williams RS, Michel RN. Nerve activity-dependent modulation of calcineurin signaling in adult fast and slow skeletal muscle fibers. J Biol Chem. 2001;276(48):45243-54. doi: 10.1074/jbc.M105445200.
21. Gray S, Feinberg MW, Hull S, Kuo CT, Watanabe M, Sen-Banerjee S, DePina A, Haspel R, Jain MK. The Krüppel-like factor KLF15 regulates the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4. J Biol Chem. 2002;277(37):34322-8. doi: 10.1074/jbc.M201304200.

Table 1. Taqman® RNA assays (Applied Biosystems Inc, USA) for gene expression analysis, primers for Sybr PCR analysis of *Slc2a4* segments, and antibodies used for chromatin immunoprecipitation assay.

Targets	Dye	Taqman® Assay ID
Slc2a4	FAM	AI5IQJM 186914021_1
B2m	FAM	Rn00560865_m1
Targets	Primers (5' to 3')	
Slc2a4 repressor region	Forward	TAGGTCGTGCCCTCTCAACT
(-889 to -719 segment)	Reverse	CATCCCCTCCACACATTTCT
Slc2a4 enhancer region	Forward	CCAGACACGGTTCTCAGACA
(-670 to -461 segment)	Reverse	GAAACAATGCCCCGAAGTAA
Antibodies (anti-)	Amount	Reference
MEF2D (H11)	10 µg/reaction	sc-271153, Santa Cruz Biotec, USA
Histone H3(acetyl K9, 14, 18, 23, 27)	8 µg/reaction	ab47915, ABCAM, UK
Histone H3(trimethyl K9)	6 µg/reaction	ab8898, ABCAM, UK
Normal rabbit IgG	*	12-370, Millipore, USA

Positions of the segments are in accordance with the transcriptional start site of the rat promoter sequence described in www.ensembl.org.
* The same amount of the target antibody.

Legends

Figure 1. Metabolic characteristics and skeletal muscle *Slc2a4*/GLUT4 expression of nondiabetic and insulin treated or not diabetic rats. Body weight (A), glycemia (B), 24-hour urinary glucose (C), plasma fructosamine (D), *Slc2a4* mRNA (E) and GLUT4 protein (F) were evaluated in nondiabetic (open bars) and streptozotocin diabetic rats treated with saline (black bars) or insulin (dashed bars). *Slc2a4* mRNA was normalized by *B2m* mRNA, and GLUT4 protein was normalized by the densitometry of the respective Ponceau-stained lane. In F, representative blots of GLUT4 and their respective Ponceau-stained lanes were shown in the same sequence of the bars. Data are mean ± SEM of 10 (A to D) and 6 (E and F) animals, and were compared by one-way analysis of variance, followed by Newman-Keuls post-test, except in C where Kruskal-Wallis test, followed by Dunn post-test, was employed.

Figure 2. Histone post-translational modifications at the promoter of *Slc2a4* gene in skeletal muscle of nondiabetic and insulin treated or not diabetic rats. The inhibitory -889/-719 (A and C) and the stimulatory -670/-461 (B, D and E) segments of the *Slc2a4* promoter were analyzed in nondiabetic (open bars) and streptozotocin diabetic rats treated with saline (black bars) or insulin (dashed bar). Lysine acetylation of histone 3 (H3KAc) (A and B) and tri-methylation of H3K9 (H3K9me3) (C and D) were analyzed by chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay. In panel F, nuclear protein binding activity at the myocyte enhancer factor (MEF2) binding site in the -670/-461 segment was also analyzed by ChIP assay. Data are mean ± SEM of 3 (A to D) and 5 (E) animals, and were compared by one-way analysis of variance, followed by Newman-Keuls post-test.

Yonamine et al. Nutrition & Metabolism (2016) 13:44
DOI 10.1186/s12986-016-0103-0

Nutrition & Metabolism

RESEARCH Open Access

Resveratrol improves glycemic control in insulin-treated diabetic rats: participation of the hepatic territory

Caio Yogi Yonamine[1†], Erika Pinheiro-Machado[1†], Maria Luiza Michalani[1], Helayne Soares Freitas[1], Maristela Mitiko Okamoto[1], Maria Lucia Corrêa-Giannella[2] and Ubiratan Fabres Machado[1*]

Abstract

Background: Resveratrol is a natural polyphenol that has been proposed to improve glycemic control in diabetes, by mechanisms that involve improvement in insulin secretion and activity. In type 1 diabetes (T1D), in which insulin therapy is obligatory, resveratrol treatment has never been investigated. The present study aimed to evaluate resveratrol as an adjunctive agent to insulin therapy in a T1D-like experimental model.

Methods: Rats were rendered diabetic by streptozotocin (STZ) treatment. Twenty days later, four groups of animals were studied: non-diabetic (ND); diabetic treated with placebo (DP); diabetic treated with insulin (DI) and diabetic treated with insulin plus resveratrol (DIR). After 30 days of treatment, 24-hour urine was collected; then, blood, soleus muscle, proximal small intestine, renal cortex and liver were sampled. Specific glucose transporter proteins were analyzed (Western blotting) in each territory of interest. Solute carrier family 2 member 2 (*Slc2a2*), phosphoenolpyruvate carboxykinase (*Pck1*) and glucose-6-phosphatase catalytic subunit (*G6pc*) mRNAs (qPCR), glycogen storage and sirtuin 1 (SIRT1) activity were analyzed in liver.

Results: Diabetes induction increased blood glucose, plasma fructosamine concentrations, and glycosuria. Insulin therapy partially recovered the glycemic control; however, resveratrol as adjunctive therapy additionally improved glycemic control and restored plasma fructosamine concentration to values of non-diabetic rats. Resveratrol did not alter the expression of the glucose transporters GLUT2 and SGLT1 in the intestine, GLUT2 and SGLT2 in kidney and GLUT4 in soleus, suggesting that fluxes of glucose in these territories were unaltered. Differently, in liver, resveratrol promoted a reduction in *Slc2a2*, *Pck1*, and *G6pc* mRNAs, as well as in GLUT2 protein ($P < 0.05$, DIR vs. DI); besides, it increased ($P < 0.01$, DIR vs. DI) the hepatic glycogen content, and SIRT1 protein.

Conclusions: Resveratrol is able to improve glycemic control in insulin-treated T1D-like rats. This effect seems not to involve changes in glucose fluxes in the small intestine, renal proximal tubule, and soleus skeletal muscle; but to be related to several changes in the liver, where downregulation of *Slc2a2*/GLUT2, *Pck1*, and *G6pc* expression was observed, favoring reduction of glucose production and efflux. Besides, resveratrol increased SIRT1 nuclear protein content in liver, which may be related to the observed gene expression regulations.

Keywords: Type 1 diabetes, Glucose transporters, Glycogen, Gluconeogenic enzymes, Liver metabolism, SIRT1, GLUT2

* Correspondence: ubiratan@icb.usp.br
†Equal contributors
[1]Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, 05508-000 São Paulo, SP, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2016 The Author(s). **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Diabetes mellitus (DM) is an epidemic metabolic disease growing at exponential rate. Type 2 DM (T2D) accounts for around 90 % of all diabetes subjects, but type 1 DM (T1D) incidence is also increasing worldwide [1]. The failure of pancreatic beta cells to produce insulin, and the impairment of insulin action, play a central role in the disruption of glycemic homeostasis, leading to hyperglycemia, a hallmark of DM [2]. DM shows a complex scenario, including complications derived from the macro and microangiopathy development [3]. At present, optimized glucose control is recognized as the best approach to reduce the risk of diabetes chronic complications [4].

Insulin sensitizer agents, which could improve glycemic control, have been extensively investigated for treatment of T2D. However, the recent finding of insulin resistance in T1D patients [5, 6] has driven attention to their use as adjunctive agents to insulin therapy [7–10]. Beyond several compounds tested to treat DM, resveratrol gained much attention in recent years [11]. Resveratrol is a natural polyphenol that belongs to stilbene class, widely found in several plant species, especially in grapes and blueberries [12]. It is capable of activating NAD^+ -dependent histone deacetylase sirtuin 1 (SIRT1), the main mechanism related to its effects [11]. Numerous studies report a wide diversity of healthy-related properties of resveratrol, including management of diseases such as cancer, Alzheimer, obesity and DM [13].

Regarding the potential effects of resveratrol in DM treatment, a glycemia-lowering effect was described in normal rats and mice [14, 15], high-fat fed mice [16], T2D *db/db* mice [17], and T2D humans as well [11]. In these conditions, a reduction in insulin resistance has been described, and in some of the experimental models, a concomitant increase in insulin secretion was also observed [15, 17]. However, it remains unknown whether improved glycemic control was cause or consequence of improved beta-cell function. Curiously, there are some reports suggesting that resveratrol could also decrease hyperglycemia in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats [14, 18–20], an insulinopenic model of DM considered a T1D-like condition, in which amelioration of pancreatic insulin secretion would be unexpected.

Glycemic homeostasis results from an orchestrated regulation of territorial glucose fluxes, which includes flows into and out of the extracellular/blood compartments [21, 22]. Some of these fluxes of glucose are highly variable, even being tightly regulated, and they can alter blood glucose quite rapidly. These include glucose fluxes to blood from the intestine (postprandial absorption), liver (glucose production) and kidney (glucose reabsorption); and also glucose fluxes from blood to liver, skeletal muscle and adipose tissue, highlighting these fluxes as the most variable and regulatable [21–23]. All these fluxes involve several distinct and complex mechanisms, and, in each territory, one or more glucose transporter isoforms play a key role [24, 25]. In epithelial cells of proximal intestine and in renal proximal tubule, sodium glucose cotransporter 1 and 2 (SGLT1 and SGLT2), respectively, uptake glucose at the luminal membrane; whereas the facilitative glucose transporter 2 (GLUT2) effluxes glucose into the interstitium/blood side [24, 25]. In hepatocytes, GLUT2 performs a bidirectional flux of glucose, accordingly to the substrate concentration gradient, which is critical for cellular glucose production [23]. Finally, the glucose uptake by muscle and adipose tissue occurs through the GLUT4, which can be acutely translocated to the plasma membrane in response to insulin [24, 26].

Most of these glucose fluxes have been proposed to be altered in DM, and that would involve changes in the expression of specific glucose transporters. On the other hand, regulation of some glucose transporters has been proposed as important targets for the development of preventive and therapeutic approaches for DM [23, 26, 27]. In this context, resveratrol could modulate the expression of some GLUTs/SGLTs spread in many peripheral territories, and that might participate in its effect on glycemic homeostasis.

So far, the beneficial effects of resveratrol have been shown in rodent models of T2D, in T2D patients, and in untreated T1D-like rats. This latter condition does not contribute to the investigation of the potential benefits of resveratrol for T1D patients, because it does not reflect their real life situation, since they necessarily require insulin therapy. Thus, the present study aimed to investigate if resveratrol could act as an adjunctive agent to insulin therapy in a T1D-like experimental model. For that, insulin-treated STZ-rats were additionally treated with resveratrol; glycemic control and expression of glucose transporters in distinct territories involved on glycemic homeostasis were evaluated. Besides, because the hepatic GLUT2 expression was highly altered, glucose metabolism markers involved in the regulation of glucose fluxes and SIRT1 activity were also investigated in this territory.

Methods

Animals and treatments

Forty 60-day old male Wistar rats weighing 250 g were obtained from the Animal Center of the Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo. The animals were housed in a room kept at constant temperature (23 ± 2 °C), in light/dark cycle (12/12 h), receiving standard rat chow (Nuvilab CR1; Nuvital Nutrients S/A, Colombo, Paraná, Brazil) and tap water *ad libitum*.

At 75 days of life, animals were rendered diabetic by intravenous injection of STZ (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA) at a dose of 50 mg/Kg of body weight, solubilized in citrate buffer (pH 4.5); and control rats were injected with citrate buffer. The procedure was performed in halothane (Tanohalo®, Cristália, Itapira, SP, Brazil) anaesthetized animals.

Twenty days later (95-day old rats), a trial was performed to evaluate the efficiency of diabetes induction, and animals with a blood glucose concentration above 300 mg/dL (measured at 10:00 AM, after 4-hour food deprivation) were included in the study. Immediately, the animals were separated into four groups: non-diabetic control (ND); diabetic treated with 0.9 % NaCl as placebo (DP); diabetic treated with 5 U/day NPH insulin (Humulin®, Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA) (DI) and diabetic treated with 5 U/day NPH insulin plus 10 mg/Kg body weight resveratrol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) (DIR). Insulin and resveratrol were subcutaneously and intraperitoneally injected, respectively. The treatments were conducted during thirty days, totalizing 50 days of diabetes duration. The experimental protocol was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (#194/2013).

Sampling collection

At the end of the treatments, 24-hour urine was collected. Then, at 10:00 AM (after 4-hour food deprivation), the animals were anaesthetized with 60 mg/Kg sodium thiopental (Cristália®, Itapira, São Paulo, Brazil), and tail blood samples were collected for glucose concentration analysis. After, soleus muscle, liver, kidney and proximal small intestine were sampled and storage at −70 °C for further analysis. Additionally, immediately after liver sampling, blood was collected from the inferior vena cava, for fructosamine concentration analyzes in plasma. Kidneys were removed, and outside cortex slices were excised, as previously described [28].

Plasma fructosamine, blood glucose, and 24-hour urinary glucose excretion

Plasma fructosamine concentration was measured by a kinetic-colorimetric assay (Frutosamina, Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil) and blood glucose concentration by a glucometer (Accu-Check Active Basel, Switzerland). The 24-hour urine volume was measured, a sample was centrifuged at 1,000 g (10 min), and the supernatant was used to measure glucose concentrations by an enzymatic-colorimetric assay (Glicose Liquiform Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil); the results were expressed as 24-hour glucose excretion, taking into account the total urinary volume.

Hepatic glycogen content

Hepatic glycogen content was measured as previously described [29]. Briefly, 250 mg of liver tissue were treated for glycogen breakdown, and thus, glycogen was pelleted by ethanol/Na_2SO_4 treatment. After hydrolysis, glycogen content was calculated based on the glucose concentrations in the samples, measured by an enzymatic-colorimetric assay (Glicose Liquiform, Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil).

mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction (qPCR)

Total RNA was isolated from approximately 100 mg of soleus skeletal muscle, and liver. The samples were processed accordingly to TRIzol® Reagent manufacturer specifications (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The amount of total RNA in each sample was determined using a spectrophotometer (Gene Quant, PHARMACIA BIOTECH - Biochrom, Cambridge, UK). The integrity of RNA was verified by the presence of 18S and 28S bands and confirmed by a 1.5 % denaturant agarose gel electrophoresis exposed to ultra-violet light (Epi Chemi II Darkroom, UVP BioImaging Systems, Upland, California, CA, USA). The reverse transcriptase (RT) reaction was performed from 2 μg of total RNA, adding to the reaction: oligo dT (100 μg/mL), 10 mM of each dNTP, 5X First-Strand buffer and 2 μl (200 U/μl) of M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI). The conditions of RT reaction were 65 °C for 10 min, followed by 37 °C for 60 min, and 95 °C for 10 min. The qPCR amplification was performed using Taqman® PCR master mix kit (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) and carried out with StepOne Plus Instrument (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA). The PCR conditions were 1 cycle of 10 min at 95 °C and 40 cycles of 30 s at 95 °C, 60 s at 60 °C and 60 s at 72 °C. The method of $2^{-\Delta\Delta Ct}$ was adopted for analysis. The genes analyzed were: solute carrier family 2 member 4 (*Slc2a4*), solute carrier family 2 member 2 (*Slc2a2*), phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (*Pck1*), glucose-6-phosphatase catalytic subunit (*G6pc*). The reference gene used was beta-2-microglobulin (*B2m*), accordingly to RefFinder software analysis. The used primers are depicted in Table 1.

Evaluation of protein expression by Western blotting

Membrane fractions were prepared as previously described [28, 30, 31]. Liver and kidney samples were processed in the same way. The samples were homogenized in buffer solution (100 mM Tris pH 7.5, 10 mM EDTA, 10 % SDS, 10 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate and 10 mM sodium orthovanadate); the homogenate was centrifuged at 1,200 g (15 min), the resulting supernatant was centrifuged at 12,000 g (20 min), and the final pellet was suspended in the same buffer as an enriched plasma membrane fraction. Soleus

Table 1 Details for the primers and identification (ID) codes of the Taqman Gene Expression Assays used for real-time polymerase chain reaction (qPCR)

Gene	Primers sequence	Dye	Assay ID
Slc2a4	Sense: 5'-GGC TGT GCC ATC TTG ATG AC-3'	FAM	AI5IQJM 186914021_1
	Anti-sense: 5'-CAC GAT GGA CAC ATA ACT CAT GGA T-3'		
Slc2a2	Inventoried	FAM	Rn00563565_m1
Pck1	Inventoried	FAM	Rn01529014_m1
G6pc	Inventoried	FAM	Rn00689876_m1
B2m	Inventoried	FAM	Rn00560865_m1

Slc2a4 solute carrier family 2 member 4, *Slc2a2* solute carrier family 2 member 2, *Pck1* phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, *G6pc* glucose-6-phosphatase catalytic subunit, *B2m* beta-2-microglobulin

muscle samples were homogenized in the same buffer, centrifuged at 760 g (10 min), and the supernatant was directly used as a total membrane fraction (plasma membrane and microsomes). Proximal small intestine samples were homogenized in the same buffer, centrifuged at 3,000 g (10 min), the supernatant was centrifuged at 12,000 g (30 min); and the pellet was used as an enriched plasma membrane fraction.

Total protein content in the samples was determined by Bradford method (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Equal amounts of protein (40 to 60 μg, accordingly to the tissue) were electrophoresed, transferred to nitrocellulose membrane and immunoblotted, accordingly to the tissue, with anti-GLUT4 (EMD Millipore, Billerica, MA, USA, #07-1404), anti-GLUT2 (EMD Millipore, #07-1402), anti-SGLT1 (Millipore, #07-1417) and anti-SGLT2 (Santa Cruz, Dallas, TX, USA, #98975) antibodies. The appropriate secondary conjugated antibody was used accordingly to manufacturer specifications, followed by enhanced chemiluminescence (ECL) procedure. The optical density of the blots was analyzed using Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), and the densities of the respective lanes, stained by Ponceau, were used for normalization. The results were expressed as arbitrary units, related to mean of the controls, which was set as 1.0.

Nuclear content of SIRT1

Nuclear proteins were extracted from liver samples as previously described [5, 32]. Briefly, 0.3 g of liver tissue was pulverized in nitrogen, and suspended in ice-cold phosphate buffer saline with 0.2 mM dithiothreitol and 0.2 mM phenylmethylsulphonyl fluoride. After 1,000 g centrifugation (10 min), the pellet was incubated in a hypotonic buffer (10 min), followed by 12,000 g centrifugation (1 min). The pellet was resuspended in a high salt concentration buffer, incubated for 20 min, and centrifuged again at 12,000 g (2 min). The final supernatant was recovered as the nuclear protein fraction. All procedure was performed at 4 °C, and the total protein concentration of the samples was determined by the Bradford method (Bio-Rad Laboratories). Samples were stored at -80 °C for further analysis. Equal amounts of nuclear proteins were subjected to immunodetection as described above, using anti-SIRT1 antibody (Cell Signaling Technology, MA, USA mAB#8469).

Statistical analysis

All data were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). The results of four groups were matched by one-way analysis of variance (ANOVA), with Student-Newman-keuls as a post-test. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

Results

Resveratrol improved glycemic control

Table 2 shows data related to the metabolic control. As expected, blood glucose and plasma fructosamine concentrations, as well as 24-hour urinary glucose content were significantly higher in diabetic rats (DP vs. ND, $P < 0.001$). In both DI and DIR groups, there was a reduction in blood glucose ($P < 0.001$) to levels similar to those observed in non-diabetic rats. Glycosuria also decreased after insulin treatment (DI vs. DP, $P < 0.01$), and resveratrol induced an additional reduction (DIR vs. DI, $P < 0.001$), although glycosuria still remained higher in comparison to non-diabetic rats. Fructosamine concentration decreased in the DI group, and a further reduction was observed with resveratrol (DIR vs. DI, $P < 0.001$), achieving mean value similar to that observed in non-diabetic rats.

Slc2a4 and GLUT4 expression in soleus

To investigate the skeletal muscle regulation of glucose disposal, and its participation in glycemic regulation, the *Slc2a4* mRNA and its GLUT4 protein were measured in soleus muscle (Fig. 1). Both mRNA, and protein reduced by ~55 % in muscles from diabetic rats ($P < 0.01$ vs. ND). Insulin treatment restored both mRNA and protein expression, and resveratrol did not alter the effect of insulin.

Table 2 Characteristics of the non-diabetic (ND), diabetic rats treated with placebo (DP), with insulin (DI) and with insulin plus resveratrol (DIR)

	ND	DP	DI	DIR
Body Weight (g)	416 ± 10.8	294 ± 15.7***	354 ± 7.4**$^{\#\#\#}$	363 ± 9.5**$^{\#\#\#}$
Blood glucose (mg/dL)	125.2 ± 2.5	502.1 ± 18.7***	140 ± 27.5$^{\#\#\#}$	153 ± 31.0$^{\#\#\#}$
Glycosuria (mg/24 h)	2.7 ± 0.9	234 ± 20.9***	162 ± 23.7***$^{\#\#}$	59.2 ± 5.4*$^{\#\#\#\S\S\S}$
Fructosamine (μMol/L)	98.7 ± 4.3	205 ± 11.0***	138 ± 4.6**$^{\#\#\#}$	84.6 ± 11.3$^{\#\#\#\S\S\S}$

Data are mean ± SEM of nine to ten animals, and were compared by one-way ANOVA, Student Newman-Keuls post test. *$P < 0.05$, **$P < 0.01$ and ***$P < 0.001$ vs ND; $^{\#\#}P < 0.01$ and $^{\#\#\#}P < 0.001$ vs DP; $^{\S\S\S}P < 0.001$ vs DI

Resveratrol decreased GLUT2 expression in liver, but not in intestine and kidney

To investigate other territorial fluxes of glucose which could be involved in the resveratrol-induced whole-body improvement of glycemic control, expression of glucose transporters was evaluated in the proximal small intestine (Fig. 2a and b), renal proximal tubule (Fig. 2c and d), and liver (Fig. 2e). The GLUT2 expression did not change in the proximal small intestine in any experimental condition, as well as its correspondent luminal sodium-glucose coupled transporter SGLT1. In renal proximal tubule, DM increased GLUT2 (DP vs. ND, $P < 0.05$), an effect that was not significantly reversed by insulin with or without resveratrol. Differently, the expression of the luminal SGLT2 in proximal tubule was reduced by DM (DP vs. ND, $P < 0.01$), which also was not altered by insulin with and without resveratrol. Finally, in liver, GLUT2 protein increased in response to DM (DP vs. ND, $P < 0.05$), insulin treatment tended to reduced it, but a significant reduction was observed only with the administration of resveratrol to insulin therapy ($P < 0.01$ vs. DP and $P < 0.05$ vs. DI).

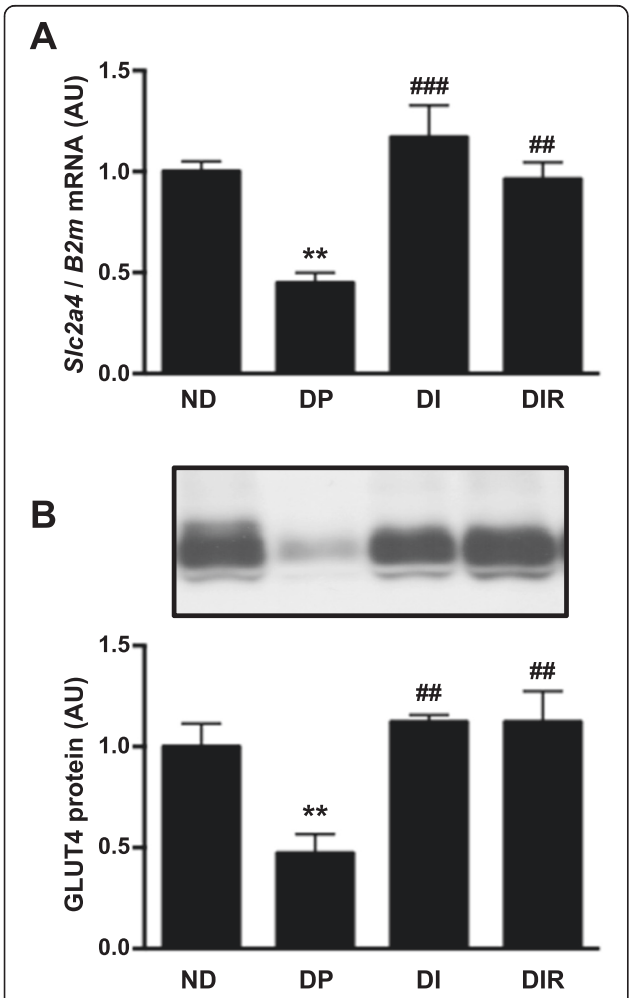


Fig. 1 *Slc2a4* mRNA (**a**) and GLUT4 protein (**b**) in soleus skeletal muscle of non-diabetic (ND) and diabetic placebo- (DP), insulin- (DI) and insulin plus resveratrol- (DIR) treated rats. AU, arbitrary units. Data are mean ± SEM of four to six animals. **$P < 0.01$ vs ND; $^{\#\#}P < 0.01$ and $^{\#\#\#}P < 0.001$ vs DP. One-way analysis of variance (ANOVA), Student-Newman-Keuls post-test

Resveratrol regulates glucose metabolism markers in liver

Slc2a2 mRNA (Fig. 3a) was modulated exactly as the GLUT2 protein in the liver. DM increased *Slc2a2* mRNA, insulin treatment partially reduced it, but only the adjunctive treatment with resveratrol restored it to non-diabetic levels (DIR vs. DP, $P < 0.001$; DIR vs. DI $P < 0.05$I).

The expression of *Pck1* mRNA (Fig. 3b) was similarly regulated. DM increased *Pck1* mRNA (~3.2-fold, $P < 0.001$ vs. ND), insulin treatment partially reduced it ($P < 0.001$ vs. DP), and that was exacerbated with resveratrol ($P < 0.001$ vs. DP; $P < 0.05$ vs. DI), which brought mean expression to the level observed in non-diabetic animals.

G6pc mRNA (Fig. 3d) tended to increase in diabetic rats, and insulin therapy made that significant (DI vs. ND, $P < 0.05$). Importantly, the resveratrol treatment reversed the insulin-induced increase in *G6pc* mRNA (DIR vs. DI, $P < 0.05$), restoring its expression to the level observed in non-diabetic rats.

Finally, the hepatic glycogen content (Fig. 3d) was not altered by insulin therapy, but was recovered by the adjunctive treatment with resveratrol ($P < 0.001$ vs. DP; $P < 0.01$ vs. DI), becoming higher than in non-diabetic rats ($P < 0.01$ vs. ND).

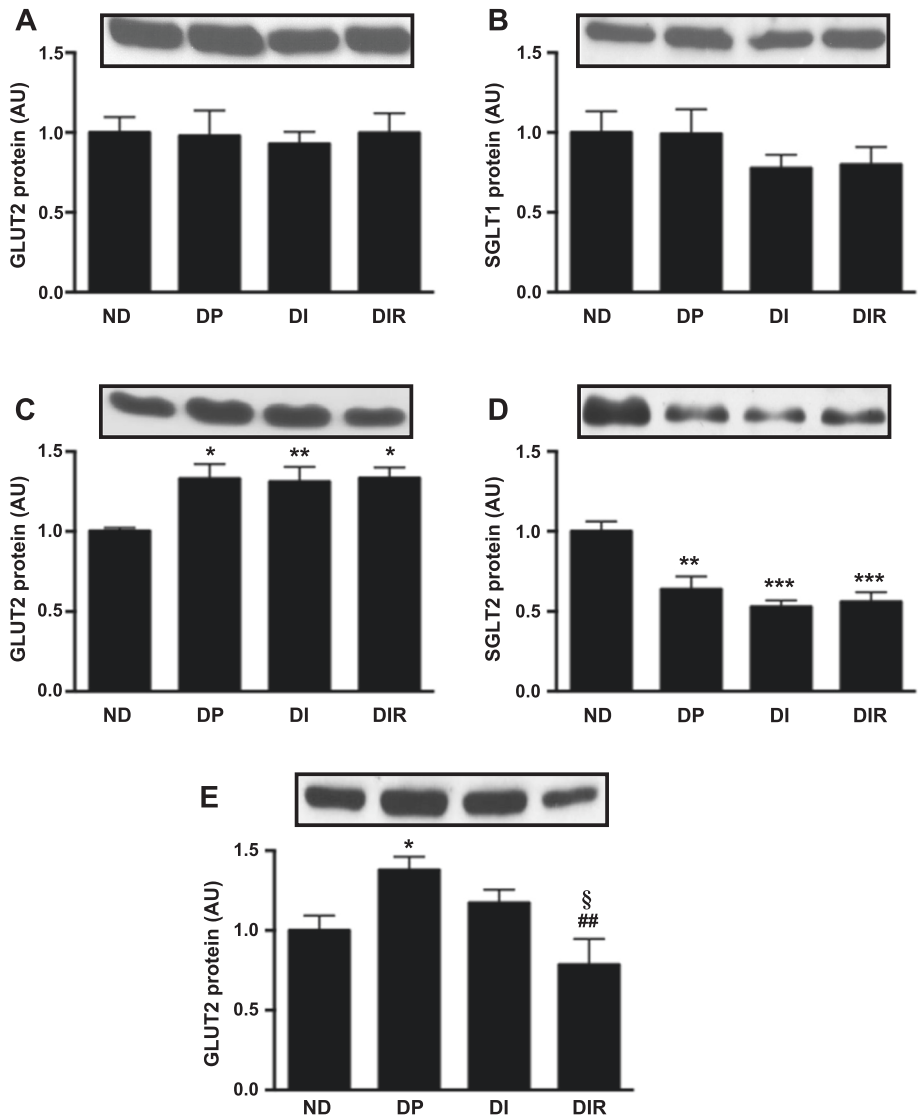


Fig. 2 GLUT2 protein in proximal small intestine (**a**), renal proximal tubule (**c**) and in liver (**e**); SGLT1 protein in proximal intestine (**b**) and SGLT2 protein in renal proximal tubule (**d**) of non-diabetic (ND) and diabetic placebo- (DP), insulin- (DI) and insulin plus resveratrol- (DIR) treated rats. AU, arbitrary units Data are mean ± SEM of five to nine animals. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$ vs ND; $^{\#\#}P < 0.01$ vs DP; $^{\S}P < 0.05$ vs DI. One-way analysis of variance (ANOVA), Student-Newman-Keuls post-test

Resveratrol increased nuclear SIRT1 content in liver

Resveratrol effects have been proposed to be mediated by SIRT1, which, once activated in the nucleus, may impair transcriptional activity. The nuclear content of SIRT1 in the liver was unaltered in diabetic rats insulin-treated or not (Fig. 4). However, the adjunctive treatment with resveratrol induced a 3-fold increase in the nuclear content of SIRT1 (DIR vs. all groups, $P < 0.01$).

Discussion

The present study was carried out to investigate if resveratrol would improve glycemic control in T1D-like rats under insulin therapy. As expected, insulin treatment did not completely restore glycemic control, because it is difficult to mimic endogenous insulin secretion [5], which is also observed in T1D patients [33]. Resveratrol revealed a powerful adjunctive effect, being able to induce a strong additional reduction in glycosuria and to bring fructosamine concentrations to values similar to those observed in non-diabetic rats. This improvement in glycemic homeostasis seems to be related to increased insulin sensitivity in the liver, with a consequent reduction in glucose efflux.

Streptozotocin (STZ) treatment of rats is known to induce a specific pancreatic beta cell necrosis, leading to an insulinopenia syndrome [34], similar to the immunologic induced beta cell necrosis in T1D human, except

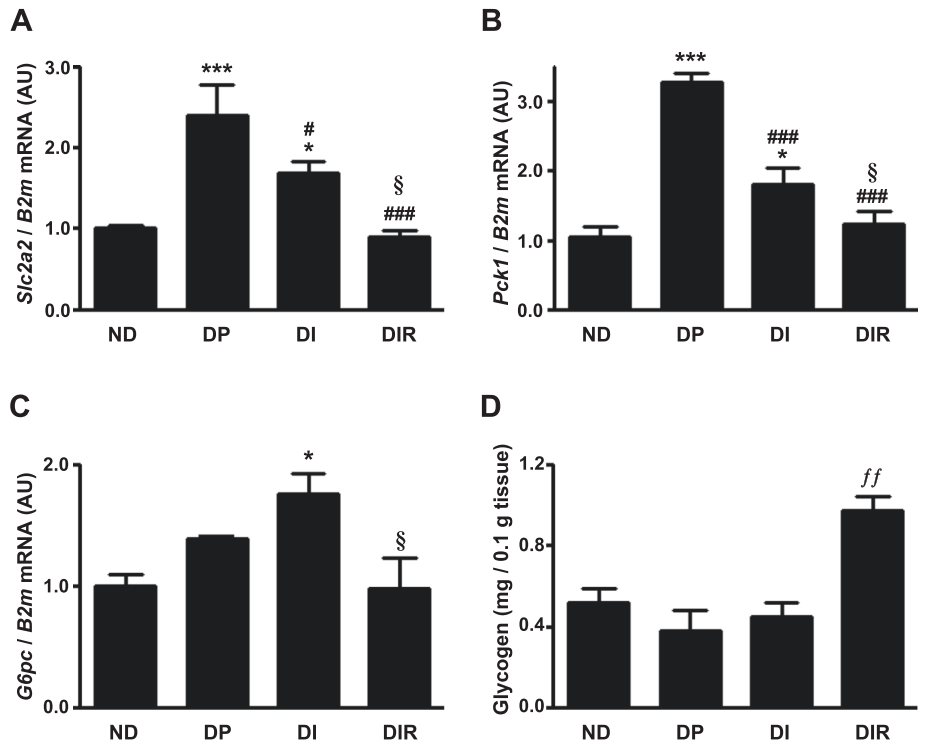


Fig. 3 *Slc2a2* (**a**) *Pck1* (**b**) and *G6pc* (**c**) mRNA expression and glycogen content (**d**) in liver of non-diabetic (ND) and diabetic placebo- (DP), insulin- (DI) and insulin plus resveratrol- (DIR) treated rats. AU, arbitrary units. Data are mean ± SEM of five to seven animals. $^{*}P < 0.05$ and $^{***}P < 0.001$ vs ND; $^{\#\#\#}P < 0.001$ vs DP; $^{\S}P < 0.05$ vs DI; $^{ff}P < 0.01$ vs all groups. One-way analysis of variance (ANOVA), Student-Newman-Keuls post-test

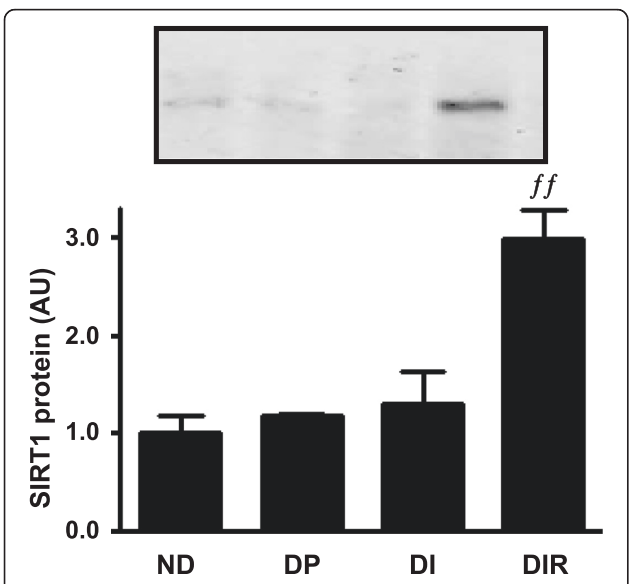


Fig. 4 Nuclear SIRT1 protein in liver of non-diabetic (ND) and diabetic placebo- (DP), insulin- (DI) and insulin plus resveratrol- (DIR) treated rats. AU, arbitrary units. Data are mean ± SEM of 3 animals. $^{ff}P < 0.01$ vs all groups. One-way analysis of variance (ANOVA), Student-Newman-Keuls post-test

by the extension of the beta cell lack, which is more pronounced in humans.

Several reports have proposed that resveratrol improves glycemic control in animals and humans with DM [11], most of them conducted in T2D [11, 15, 17, 35]. Besides improvement in insulin sensitivity, an improvement in insulin secretion has also been reported to participate in resveratrol effects [15, 16]. Thus, potential benefits of resveratrol in T1D should be limited. However, some studies were performed in T1D-like STZ rats not treated with insulin, and a resveratrol-induced effect was clearly detected, such as reduction in blood glucose from 525 to 450 mg/dL [18] and from 469 to 373 mg/dL [19]. These data highlight the insulin sensitizer effect of resveratrol, but its use in T1D without concomitant insulin therapy would be proscribed. Considering that, we evaluated resveratrol as adjunct to insulin therapy in T1D, which has never been investigated.

The present results revealed the impressive effect of resveratrol as adjunct to insulin therapy in T1D-like rats based on fructosamine decay. The serum fructosamine includes all glycated plasmatic proteins produced over the last 2-3 weeks, reflecting recent changes in glycemic control. Since peripheral insulin concentration is unchangeable in this T1D model, the glucose-lowering effect must have been achieved due to changes in one or

more peripheral flux of glucose, which invariably is accompanied by changes in the glucose transporters expression.

Participation of improved skeletal muscle glucose uptake by resveratrol has already been proposed. Piceatannol, a metabolite of resveratrol, was shown to increase AMPK phosphorylation, GLUT4 translocation, and glucose uptake in L6 myocytes [12]. Besides, in muscle from 2-week STZ-diabetic rats not receiving insulin, 7-day resveratrol treatment increased soleus GLUT4 content to a value similar to that observed in insulin-treated animals [14]. We observed a decreased *Slc2a4*/GLUT4 expression in diabetic rats, and that was completely recovered by insulin treatment, as reported elsewhere [5, 36]. Resveratrol administration did not modify muscle *Slc2a4*/GLUT4 expression in comparison to insulin alone, showing that, as adjunctive therapy in T1D, this compound does not improve glucose clearance by skeletal muscle.

SGLT1- and GLUT2-related increase in intestinal glucose absorption has been proposed in T2D patients [37] and 2-week STZ-diabetic rats [38]. However, modulation in SGLT1 and/or GLUT2 in T1D-like long-term models has never been clearly reported. In the present study, we did not observe alterations in either SGLT1 or GLUT2 proteins in diabetic rats, regardless of the treatment employed, suggesting that modifications in the intestinal glucose absorption rate do not contribute to the observed changes in glycemic homeostasis induced by resveratrol. We did not find previous studies which evaluated the effects of resveratrol in intestinal SGLT1 and GLUT2 expression.

It has been extensively reported that inhibition of renal glucose reabsorption by SGLT2 inhibitors contributes to blood glucose reduction, and that is a recent therapeutic approach to DM treatment [27]. STZ-diabetic rats revealed increased *Slc5a2* mRNA expression [39]; however, SGLT2 protein expression was not investigated. On the other hand, in mice, DM-induced regulation of SGLT2 is controversial, being reduced in STZ-diabetic mice, but increased in *db/db* and Akita mice [40], pointing out to the complexity of this regulation. In the present study, 7 weeks of DM duration in STZ-diabetic rats decreased SGLT2, and neither insulin nor insulin plus resveratrol altered this pattern of expression. Differently, GLUT2 has been clearly described to increase after 4 weeks of DM [28, 31], as observed here; and insulin reversed this effect. Overall, since resveratrol altered neither SGLT2 nor GLUT2 expression, there is no data to support a resveratrol-induced reduction in renal glucose reabsorption, which could contribute to improving glycemic control.

Relevant results were obtained in the liver. GLUT2 protein increased in diabetic rats and was partially reduced by insulin therapy, in agreement with previous work [31]. Remarkably, the adjunctive treatment with resveratrol promoted a further decrease in GLUT2 content, restoring the protein levels to those of non-diabetic rats. Besides, parallel regulations were detected in *Slc2a2* mRNA expression, indicating a transcriptional modulation. Since a reduction in GLUT2 expression has been related to reduced hepatic glucose efflux in several conditions, such as the Fanconi-Bickel syndrome [41] and the Foxa3$^{-/-}$ mice [42], this result points out the hepatic territory as responsible for the beneficial effects of resveratrol.

To deepen the investigation of liver participation, some markers of glucose metabolism, which have been related to impaired glycemic homeostasis in DM [43], were analyzed. The expression of the pivotal gluconeogenic enzyme *Pck1*, which increased in DM, was only restored to non-diabetic levels by treatment with insulin plus resveratrol. *G6pc* expression tended to increase in DM, and insulin therapy did not reverse this effect, as it was expected, considering the repressor effect of insulin on *G6pc* gene [44]. However, the resveratrol treatment restored the *G6pc* expression to the non-diabetic levels. These findings reveal the resveratrol-induced increase in the local insulin sensitivity, and anticipate a reduction in hepatic glucose production and efflux [45, 46]. Indeed, in the liver of diabetic rats not treated with insulin, resveratrol was reported to increase the insulin signaling pathway activity [47], and restored PEPCK expression [14] and G6Pase activity [48]. However, resveratrol effect upon hepatic glucose metabolism, as adjunctive therapy to insulin in T1D had never been previously investigated.

Increased deacetylase activity of SIRT1 was extensively proposed as the major mechanism by which resveratrol induces beneficial effects in several tissues [11]. However, in the liver, this effect was far from being demonstrated. Indeed, in the liver of STZ-diabetic rats not receiving insulin, resveratrol increased *Sirt1* mRNA [18], but had no significant effect on the cytosolic protein [49]; besides, in the liver of insulin resistant KKAy mice, an increase in SIRT1 protein, supposedly measured in a homogenate, was reported to be increased in only one mouse [50]. We are showing for the first time a resveratrol-induced robust increase in nuclear SIRT1 protein, which might be involved in the regulation of the hepatic glucose metabolism-related genes investigated.

Interestingly, despite proposals that resveratrol-induced improvement in glycemic homeostasis could involve suppression of gluconeogenic enzymes expression [11, 48], and that this effect could be mediated by increased SIRT1 activity [11, 18, 49, 50], previous studies suggested the opposite. Activation of SIRT1 in isolated hepatocytes was reported to increase [51], whereas SIRT1 knockdown in mice was reported to decrease [52] the expression of key gluconeogenic enzymes. Thus, it remains to be further

investigated whether there is a cause-effect relationship between increased nuclear SIRT1 and decreased *Pck1*/*G6pc* expression in the liver of T1D-like rats receiving resveratrol plus insulin.

SIRT1-mediated decrease of insulin resistance has been proposed, mainly based on resveratrol treatment [11, 50], although the participation of SIRT1 as a nuclear deacetylase is far from being clearly demonstrated in these studies. In the present study, the resveratrol-induced amelioration of glycemic control depicts improvement of insulin sensitivity, since the T1D animals were submitted to the same insulin regimen. Besides, the improvement in insulin sensitivity was observed in liver, where regulation of genes related to glucose metabolism was observed, together with increased nuclear content of SIRT1. Thus, for the first time, the insulin sensitizer effect of SIRT1 deacetylase can be rationally proposed.

Conclusion

In conclusion, resveratrol was able to improve glycemic control in insulin-treated T1D-like rats. This effect seems not to involve changes in glucose fluxes in the small intestine, renal proximal tubule, and soleus skeletal muscle; but to be related to several changes in the liver, where downregulation of *Slc2a2*/GLUT2, *Pck1* and *G6pc* expression was observed, favoring reduction of glucose production and efflux. Besides, resveratrol increased SIRT1 nuclear protein content in liver, which may be related to the observed gene expression regulations.

Abbreviations

AMPK, AMP-activated protein kinase; ANOVA, analysis of variance; AU, arbitrary units; *B2m*, beta-2-microglobulin gene; DI, insulin-treated diabetic rat; DIR, insulin + resveratrol-treated diabetic rat; DM, diabetes mellitus; DP, placebo-treated diabetic rats; G6Pase, glucose-6-phosphatase protein; *G6pc*, glucose-6-phosphate catalytic subunit gene; GLUT2, glucose transporter 2 protein; GLUT4, glucose transporter 4; ND, non-diabetic rat; *Pck1*, phosphoenolpyruvate carboxykinase gene; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase protein; qPCR, real-time polymerase chain reaction; RT, reverse transcriptase reaction; SEM, standard error of the mean; SGLT1, sodium-glucose cotransporter 1; SGLT2, sodium-glucose cotransporter 2; SIRT1, sirtuin 1; *Slc2a2*, solute carrier family 2 member 2 gene; *Slc2a4*, solute carrier family 2 member 4 gene; STZ, streptozotocin; T1D, type 1 diabetes mellitus; T2D, type 2 diabetes mellitus

Acknowledgements

This research was supported by the Nacional Council for Scientific and Technological Development (CNPq) #142187/2013-5 and by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) #2012/04831-1.

Authors' contributions

CYY, EPM, MLM, HSF performed animal treatments and took care the animals; CYY performed soleus analysis, EPM liver analysis, MLM intestine analysis and HDF kidney analysis; MMO contributed for the different subcellular fractionations and Western analysis; CYY and EPM developed the nuclear analysis of SIRT1; MLC and UFM formulated the hypothesis, designed the study, and wrote the manuscript. All authors critically revised the article and approved the final version.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

[1]Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, 05508-000 São Paulo, SP, Brazil. [2]Laboratory of Medical Investigation 18 (LIM-18) and Cell and Molecular Therapy Center (NUCEL), Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Received: 23 May 2016 Accepted: 22 June 2016
Published online: 29 June 2016

References

1. Laron Z, Hampe CS, Shulman LM. The urgent need to prevent type 1 autoimmune childhood diabetes. Pediatr Endocrinol Rev. 2015;12:266–82.
2. Thomas CC, Philipson LH. Update on diabetes classification. Med Clin North Am. 2015;99:1–16.
3. Coleman SK, Rebalka IA, D'Souza DM, Hawke TJ. Skeletal muscle as a therapeutic target for delaying type 1 diabetic complications. World J Diabetes. 2015;6:1323–36.
4. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes – 2016. Diabetes Care. 2016;39:S1–112.
5. Okamoto MM, Anhê GF, Sabino-Silva R, Marques MF, Freitas HS, Mori RC, Melo KF, Machado UF. Intensive insulin treatment induces insulin resistance in diabetic rats by impairing glucose metabolism-related mechanisms in muscle and liver.
J Endocrinol. 2011;211:55–64.
6. Bacha F, Klinepeter Bartz S. Insulin resistance, role of metformin and other non-insulin therapies in pediatric type 1 diabetes. Pediatr Diabetes. 2015; Nov 23 [Epub ahead of print].
7. Lebovitz HE. Adjunct therapy for type 1 diabetes mellitus. Nat Rev Endocrinol. 2010;6:326–34.
8. DeGeeter M, Williamson B. Alternative agents in type 1 diabetes in addition to insulin therapy: metformin, alpha-glucosidase inhibitors, pioglitazone, GLP-1 agonists, DPP-IV inhibitors, and SGLT-2 inhibitors. J Pharm Pract. 2014; 29:144–59.
9. Munir KM, Davis SN. The treatment of type 1 diabetes mellitus with agents approved for type 2 diabetes mellitus. Expert Opin Pharmacother. 2015;6: 2331–41.
10. Vinayagam R, Xu B. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. Nutr Metab (Lond). 2015;12:60.
11. Szkudelski T, Szkudelska K. Resveratrol and diabetes: from animal to human studies. Biochim Biophys Acta. 1852;2015:1145–54.
12. Kasiotis KM, Pratsinis H, Kletsas D, Haroutounian SA. Resveratrol and related stilbenes: their anti-aging and anti-angiogenic properties. Food Chem Toxicol. 2013;61:112–20.
13. Aguirre L, Fernández-Quintela A, Arias N, Portillo MP. Resveratrol:anti-obesity mechanisms of action. Molecules. 2014;19:18632–55.
14. Chi TC, Chen WP, Chi TL, Kuo TF, Lee SS, Cheng JT, Su MJ. Phosphatidylinositol-3-kinase is involved in the antihyperglycemic effect induced by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. Life Sci. 2007;80:1713–20.
15. Do GM, Jung UJ, Park HJ, Kwon EY, Jeon SM, McGregor RA, Choi MS. Resveratrol ameliorates diabetes-related metabolic changes via activation of AMP-activated protein kinase and its downstream targets in db/db mice. Mol Nutr Food Res. 2012;56:1282–91.
16. Zhang J, Chen L, Zheng J, Zeng T, Li H, Xiao H, Deng X, Hu X. The protective effect of resveratrol on islet insulin secretion and morphology in mice on a high-fat diet. Diabetes Res Clin Pract. 2012;97:474–82.
17. Minakawa M, Miura Y, Yagasaki K. Piceatannol, a resveratrol derivative, promotes glucose uptake through glucose transporter 4 translocation to plasma membrane in L6 myocytes and suppresses blood glucose levels in type 2 diabetic model db/db mice. Biochem Biophys Res Commun. 2012;422:469–75.
18. Chen KH, Cheng ML, Jing YH, Chiu DT, Shiao MS, Chen JK. Resveratrol ameliorates metabolic disorders and muscle wasting in streptozotocin induced diabetic rats. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2011;301:E853–63.
19. Gencoglu H, Tuzcu M, Hayirli A, Sahin K. Protective effects of resveratrol against streptozotocin-induced diabetes in rats by modulation of visfatin/ sirtuin-1 pathway and glucose transporters. Int J Food Sci Nutr. 2015;66:314–20.
20. Silan C. The effects of chronic resveratrol treatment on vascular responsiveness of streptozotocin-induced diabetic rats. Biol Pharm Bull. 2008;31:897–902.

21. DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. Med Clin N Am. 2004;88:787–835.
22. Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. Lancet. 2014;383:1068–83.
23. Thorens B. GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. Diabetologia. 2015;58:221–32.
24. Thorens B, Mueckler M. Glucose transporters in the 21st Century. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2010;298:E141–5.
25. Wright EM. Glucose transport families SLC5 and SLC50. Mol Aspects Med. 2013;34:183–96.
26. Corrêa-Giannella ML, Machado UF. SLC2A4gene: a promising target for pharmacogenomics of insulin resistance. Pharmacogenomics. 2013;14:847–50.
27. Machado UF, Corrêa-Giannella ML. Sodium-glucose transporter 2 inhibitors in type 2 diabetes mellitus: navigating between Scylla and Charybdis. Expert Opin Emerg Drugs. 2014;19:5–9.
28. 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;237:49–57.
29. Campello RS, Alves-Wagner AB, Abdulkader F, Mori RC, Machado UF. Carbohydrate- and lipid-enriched meals acutely disrupt glycemic homeostasis by inducing transient insulin resistance in rats. Can J Physiol Pharmacol. 2012;90:537–45.
30. Machado UF, Shimizu Y, Saito M. Decreased glucose transporter (GLUT 4) content in insulin-sensitive tissues of obese aurothioglucose- and monosodium glutamate-treated mice. Horm Metab Res. 1993;25:462–5.
31. David-Silva A, Freitas HS, Okamoto MM, Sabino-Silva R, Schaan BD, Machado UF. Hepatocyte nuclear factors 1α/4α and forkhead box A2 regulate the solute carrier 2A2 (Slc2a2) gene expression in the liver and kidney of diabetic rats. Life Sci. 2013;93:805–13.
32. Furuya DT, Neri EA, Poletto AC, Anhê GF, Freitas HS, Campello RS, Rebouças NA, Machado UF. Identification of nuclear factor-kB sites in the *Slc2a4* gene promoter. Mol Cell Endocrinol. 2013;370:87–95.
33. Vora J, Heise T. Variability of glucose-lowering effect as a limiting factor in optimizing basal insulin therapy: a review. Diabetes Obes Metab. 2013;15:701–12.
34. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia. 2008;51:216–26.
35. Zheng X, Zhu S, Chang S, Cao Y, Dong J, Li J, Long R, Zhou Y. Protective effects of chronic resveratrol treatment on vascular inflammatory injury in streptozotocin-induced type 2 diabetic rats: Role of NF-kappa B signaling. Eur J Pharmacol. 2013;720:147–57.
36. Alves-Wagner AB, Sabino-Silva R, Campello RS, Mori RC, Machado UF. Decreased diabetes-induced glycemic impairment in WKY and SHR involves enhanced skeletal muscle Slc2a4/GLUT4 expression. Diabetol Metab Syndr. 2014;6:97.
37. Dyer J, Wood IS, Palejwala A, Ellis A, Shirazi-Beechey SP. Expression of monosaccharide transporters in intestine of diabetic humans. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2002;282:G241–8.
38. Kurokawa T, Hashida F, Kawabata S, Ishibashi S. Evidence for the regulation of small intestinal Na+/glucose cotransporter by insulin. Biochem Mol Biol Int. 1995;37:33–8.
39. Freitas HS, Anhê GF, Melo KF, Okamoto MM, Oliveira-Souza M, Bordin S, Machado UF. Na(+) -glucose transporter-2 messenger ribonucleic acid expression in kidney of diabetic rats correlates with glycemic levels: involvement of hepatocyte nuclear factor-1alpha expression and activity. Endocrinology. 2008;149:717–24.
40. Vallon V, Gerasimova M, Rose MA, Masuda T, Satriano J, Mayoux E, Koepsell H, Thomson SC, Rieg T. SGLT2 inhibitor empagliflozin reduces renal growth and albuminuria in proportion to hyperglycemia and prevents glomerular hyperfiltration in diabetic Akita mice. Am J Physiol Renal Physiol. 2014;306:F194–204.
41. 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;157:783–97.
42. 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;276:42812–7.
43. Shepherd PR, Kahn BB. Glucose transporters and insulin action—implications for insulin resistance and diabetes mellitus. N Engl J Med. 1999;341:248–57.
44. Barthel A, Schmoll D. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2003;285:E685–92.
45. Roden M, Bernroider E. Hepatic glucose metabolism in humans - its role in health and disease. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2003;17:365–83.
46. Sharabi K, Tavares CD, Rines AK, Puigserver P. Molecular pathophysiology of hepatic glucose production. Mol Aspects Med. 2015;46:21–33.
47. Sadi G, Pektaş MB, Koca HB, Tosun M, Koca T. Resveratrol improves hepatic insulin signaling and reduces the inflammatory response in streptozotocin-induced diabetes. Gene. 2015;570:213–20.
48. Palsamy P, Subramanian S. Modulatory effects of resveratrol on attenuating the key enzymes activities of carbohydrate metabolism in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. Chem Biol Interact. 2009;179:356–62.
49. Sadi G, Bozan D, Yildiz HB. Redox regulation of antioxidant enzymes: post-translational modulation of catalase and glutathione peroxidase activity by resveratrol in diabetic rat liver. Mol Cell Biochem. 2014;393:111–22.
50. Chen S, Li J, Zhang Z, Li W, Sun Y, Zhang Q, Feng X, Zhu W. Effects of resveratrol on the amelioration of insulin resistance in KKAy mice. Can J Physiol Pharmacol. 2012;90:237–42.
51. Frescas D, Valenti L, Accili D. Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. J Biol Chem. 2005;280:20589–95.
52. Rodgers JT, Puigserver P. Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104:12861–6.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit