

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM IMUNOLOGIA, GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Liliane Sena Pinheiro

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE ISOFORMAS DE PROTEÍNA
QUINASE C EM CÉLULAS CROMAFINS DA MEDULA ADRENAL DE
RATOS WISTAR DIABÉTICOS TRATADOS E NÃO TRATADOS COM
INSULINA**

Juiz de Fora, MG

2008

LILIANE SENA PINHEIRO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE ISOFORMAS DE PROTEÍNA
QUINASE C EM CÉLULAS CROMAFINS DA MEDULA ADRENAL DE
RATOS WISTAR DIABÉTICOS TRATADOS E NÃO TRATADOS COM
INSULINA**

**Dissertação de Mestrado do Curso de
Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Biológicas na área
de concentração em Imunologia.**

Orientador: Dr. Raúl Marcel González Garcia

Juiz de Fora, MG

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Pinheiro, Liliane Sena.

Análise da expressão de isoformas de proteína quinase C em células cromafins da medula adrenal de ratos Wistar diabéticos tratados e não tratados com insulina/ Liliane Sena Pinheiro. – 2008.

139 f. :il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2008

1. Diabetes Mellitus. 2. Insulina. 3. Catecolaminas. I.Título

CDU: 616.379-008.64

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE ISOFORMAS DE PROTEÍNA
QUINASE C EM CÉLULAS CROMAFINS DA MEDULA ADRENAL DE
RATOS WISTAR DIABÉTICOS TRATADOS E NÃO TRATADOS COM
INSULINA**

LILIANE SENA PINHEIRO

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Imunologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: ____/____/____.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Raúl Marcel González Garcia
Universidade Federal de Juiz de Fora
(Orientador)

Prof. Dra. Patrícia Cristina Lisboa
Universidade do Estado do Rio de Janeiro
(Membro externo)

Profa. Dra. Mônica Barros Costa
Universidade Federal de Juiz de Fora
(Membro interno)

“Quem é generoso ao aprender, é generoso ao ensinar; mas nunca haverá de exceder-se nessa generosidade, pretendendo ensinar antes de haver aprendido”.

Da Ciência Logosófica

**Aos meus pais, pela colaboração incondicional que mantém meus sonhos
possíveis.**

Ao Augusto César, minha fonte de inspiração e alegria . Eu te amo!

À professora Sandra Tibiriçá, pela amizade e estímulos preciosos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar discernimento, garra, perseverança, paciência e amor à vida;

Ao professor Raúl González Garcia, pelo entusiasmo e dedicação à pesquisa, por acreditar em meu trabalho e pela compreensão quando foi necessário. Muito obrigado pela oportunidade de trabalhar ao seu lado e por tudo que aprendi durante esse período;

À professora Mônica Barros Costa pela ajuda indispensável para estabelecimento do protocolo de insulinoaterapia para ratos diabéticos;

À professora Eveline Gomes Vasconcelos, pela atenção, pelo carinho e pelas inúmeras ajudas no desenvolvimento dos experimentos;

Aos professores Ana Paula Ferreira e Henrique Couto Teixeira pela contribuição para o desenvolvimento do trabalho;

Aos professores Lyderson Facio Viccini, Marcelo de Oliveira Santos e Fábio Roland e todos os graduando e pós-graduandos dos laboratórios de Genética e Ecologia pela colaboração;

Ao Dr. Ricardo Vilella Bastos e ao bioquímico João Renato Hipólito pela colaboração nas análises bioquímicas realizadas no soro dos ratos;

Aos funcionários e técnicos, Paulinho, D. Rosa, Cida e Gladson. Em especial gostaria de agradecer ao Silvoney Augusto pela colaboração diária na realização dos experimentos;

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular Fernanda, Paula, Marcelo e Maíra. Vocês foram indispensáveis para a realização desse trabalho. Em especial gostaria de agradecer ao Anderson, Ana Eliza e Luís pelo carinho e produtivas discussões científicas entre um experimento e outro;

Aos amigos da primeira turma do Mestrado em Ciências Biológicas, em especial à Fabrícia e Pâmela pela amizade;

À minha família, principalmente aos meus pais, José Roberto e Heliana, e minhas irmãs, Roberta e Márcia pelos incentivos e cumplicidade e também ao Augusto, meu futuro marido;

À minha segunda família, D. Angélica, Edson, Diego e Lara, pelo apoio em tudo que foi necessário;

À todos os meus amigos, em especial aos meus amigos estudantes de Logosofia que compartilham comigo o anelo de ser sempre uma pessoa melhor;

E a todos que de alguma forma contribuíram para concretização desse trabalho.

Muito obrigada a todos, valeu!

RESUMO

O diabetes mellitus (DM) reduz a secreção de catecolaminas (CAs) das células cromafins adrenais, sendo esse um evento patofisiológico crítico por favorecer a ocorrência de episódios de hipoglicemia grave decorrentes do próprio tratamento da doença. Vários trabalhos relatam a participação de proteínas quinase C (PKCs) nas vias de síntese e secreção de CAs nas células cromafins. Os objetivos desse trabalho foram analisar o efeito do DM sobre a expressão das isoformas α , ϵ e ζ de PKC em células cromafins de ratos e avaliar se o controle glicêmico reverte os efeitos da doença. Foram utilizados ratos Wistar com DM induzido por estreptozotocina. Foram estabelecidos três grupos experimentais, ratos controles (C), diabéticos tratados com salina (DTS) ou com insulina (DTI). As análises foram feitas 15 dias após a indução. Utilizamos as técnicas de imunohistoquímica e Western Blot. A insulino terapia foi estabelecida após estudos do comportamento alimentar e da variação dos níveis glicêmicos de ratos controles e doentes durante 24h consecutivas. Foi testada a eficácia de diferentes esquemas de tratamento com insulina. O tratamento estabelecido consistiu em injeções de insulina NPH, sendo 1U aplicada às 13h e 4U às 19h. Após os 15 dias de tratamento, o ganho médio de massa corporal dos ratos C ($+37\pm 3g$) e DTI ($+43\pm 3g$) foram similares enquanto os DTS emagreceram ($-9\pm 6g$). A média da glicemia de jejum dos ratos C ($74\pm 1mg/dl$) e dos DTI ($93\pm 6mg/dl$) foram similares e dentro dos níveis normais, enquanto que a dos ratos DTS foi elevada ($471\pm 23mg/dl$). A insulino terapia restabeleceu os níveis plasmáticos do colesterol total, c-LDL e c-VLDL nos ratos DTI. O DM não alterou os níveis de c-HDL, triglicerídeos e frutosemina. As análises da expressão de PKCs mostraram que a PKC α é a mais expressada seguida de ζ e depois de ϵ . O DM reduziu em 39,5% a expressão da PKC α , enquanto a de ζ foi aumentada em 74,2%. A expressão da PKC ϵ não foi afetada pelo DM. O tratamento com insulina reverteu o efeito do DM sobre a expressão de PKC α , a expressão da PKC ϵ continuou inalterada e a expressão da PKC ζ permaneceu elevada (+32,6%) quando comparada aos ratos C. Concluímos que em células cromafins adrenais, o diabetes afeta a expressão de isoformas de PKCs de maneira diferenciada. Trabalhos realizados em nosso laboratório mostraram que o DM reduz o conteúdo total (-21,1%), a secreção basal (-24,3%) e a estimulada por carbacol (-28,9%) e K $^{+}$ (-42,2%) de CAs. Como observado para PKC α , a insulino terapia reverteu o efeito do DM sobre o conteúdo total. Já foi demonstrado que PKC α participa de uma via de sinalização que estimula a atividade de tirosina hidroxilase. Por outro lado, o tratamento não restabeleceu os processos secretórios, sugerindo que PKC ζ possa estar envolvida nessa alteração. Há fortes evidências de que PKC ζ regula canais de K $^{+}$ retificadores, o que pode explicar o efeito da doença sobre o processo de secreção via despolarização da membrana.

Palavras-chave: diabetes mellitus, células cromafins adrenais, insulina, proteína quinase C, ratos, sinalização, síntese e secreção de catecolaminas, tirosina hidroxilase.

ABSTRACT

The diabetes mellitus (DM) reduces the catecholamine (CAs) secretion of adrenal chromaffin cells, a critical pathophysiologic event that promotes the occurrence of serious hypoglycemia episodes, consequence of the disease treatment. Several papers report the participation of protein kinase C (PKC) on catecholamine synthesis signal pathways of adrenal chromaffin cells. The objectives of this work were to study the effect of DM on expression of PKC isoforms α , ϵ and ζ in rat chromaffin cells and to evaluate if the glycemetic control revert the effect of the illness. Male Wistar rats with diabetes induced by streptozotocin were used. Three experimental groups were determined: Control (C), diabetic rats receiving saline solution (DS) and diabetic rats receiving insulin (DI). The analyses were made after 15 days of DM induction. Immunohistochemistry and western blotting techniques were done. The insulin therapy protocol was established after studying the feeding behavior and glycemetic level variations during the whole 24h. The information made possible to establish the time of insulin applications. Several schemes of insulin treatments were tested to keep the diabetic rat as close as possible to normoglycemia path. The best results were found by using 1U at 1:00 PM and 4U at 7:00 PM of NPH insulin. After 15 days of treatment the acquired body weight was similar between C and DI rats, 37 ± 3 g and 43 ± 3 g, respectively. The DS rats emaciated 9 ± 6 g. The fasting glycemetic levels were 74 ± 1 mg/dl, 93 ± 6 mg/dl and 471 ± 23 mg/dl to C, DI and DS rats, respectively. The insulin therapy reestablishes the plasmic levels of total cholesterol, c-LDL and c-VLDL on DI rats. The DM did not change the levels of c-HDL, triglycerides and fructosamine. The PKC α is the more expressed isoform in adrenal chromaffin cells, followed by ζ and ϵ . The DM reduced 39,5% the PKC α expression and, unlike, increased 74,2% the expression of PKC ζ . The expression of PKC ϵ was not affected by DM. The insulin treatment reverted the effect of DM on PKC α , the expression of PKC ϵ remained unchanged and the expression of PKC ζ remained higher than the control group (+32,6%). Studies of our laboratory show that the DM causes reduction on adrenal catecholamine content (-21,1%), basal secretion (-24,3%) and catecholamine secretion stimulated by carbachol (-28,9%) and high K $^{+}$ (-42,2%). The insulin therapy, in like manner as observed on PKC α , reverted the DM effect on adrenal catecholamine content. It was shown that PKC α participates on signal transduction pathway that stimulates the activity of tyrosine hydroxylase. Otherwise, the insulin treatment did not restore the secretory processes, suggesting that PKC ζ could be involved in this process. There are strong evidences showing that PKC ζ regulates the voltage-dependent delayed rectifier K (Kv) and its expression was not normalized by insulin therapy.

Key word: Diabetes mellitus, adrenal chromaffin cells, insulin, protein kinase C, rats, signaling, catecholamine synthesis and secretion, tyrosine hydroxylase.

Lista de Figuras

- Figura 1 - Representação esquemática da estrutura primária de proteínas membros da família PKC. No lado direito da figura estão representados os cofatores requeridos para a ativação por cada grupo de PKC, fosfatidilserina (PS), diacilglicerol (DG) e Ca^{2+} (Newton, 2001). 34
- Figura 2 - Regulação da atividade enzimática de PKC por (1) fosforilação, (2) ligação de cofatores e (3) interação com proteínas de ancoragem (Newton, 2001). 35
- Figura 3 - Cascata de sinalização MAPK com participação de PKC (adaptado de Seguer e Krebs, 1995). 52
- Figura 4 - Organização cronológica entre a indução do diabetes e sacrifício dos animais. 59
- Figura 5 - Cronograma do tratamento de ratos diabéticos com insulina e procedimentos ao final do tratamento para verificar eficácia da insulinoaterapia. 61
- Figura 6 - Cronograma do experimentos realizados para estudo da expressão de PKC por imunohistoquímica 63
- Figura 7 - Organização cronológica do tratamento de ratos diabéticos com insulina. 65
- Figura 8 - Efeito do tratamento de ratos Wistar com estreptozotocina (50mg/Kg de massa corporal do animal) sobre os níveis glicêmicos de jejum dois dias após a injeção da citotoxina. As barras verticais representam o EPM. * $p < 0,05$ em comparação aos animais controles. 69
- Figura 9 - Variação glicêmica e alimentar de ratos Wistar controles e diabéticos durante 24 horas. Em (A) estão representados a variação glicêmica e alimentar ($n = 9$) dos ratos controles. Em (B) estão representados a variação glicêmica ($n = 10$) e alimentar ($n = 12$) dos ratos diabéticos. No topo da figura está indicado o fotoperíodo: a barra branca representa a fase clara e a barra preta representa a fase escura. A linha vertical tracejada indica a mudança de fotoperíodo, de claro para escuro. As linhas verticais representam o EPM. 72

- Figura 10 - Ingestão de ração durante 24 horas consecutivas por ratos Wistar normais e diabéticos. A linha vertical representa o EPM. 73
- Figura 11 - Variação da ingestão de ração por ratos Wistar controles e diabéticos durante o período de 24 horas consecutivas. Os dados foram agrupados em intervalos de 3 em 3 horas. No topo da figura está indicado o fotoperíodo: a barra branca representa a fase clara e a barra preta representa a fase escura. A linha vertical tracejada indica a mudança de fotoperíodo, de claro para escuro. As linhas verticais representam o EPM. * $<0,05$ em comparação aos animais controles. 76
- Figura 12 - Variação glicêmica de ratos Wistar controles (círculos pretos, $n = 9$) e diabéticos (círculos brancos, $n = 12$) durante o período de 24 horas consecutivas. No topo da figura está indicado o fotoperíodo: a barra branca representa a fase clara e a barra preta representa a fase escura. A linha vertical tracejada indica a mudança de fotoperíodo, de claro para escuro. As linhas verticais representam o EPM. 77
- Figura 13 - Efeito do tratamento de ratos diabéticos por STZ utilizando 5U de insulina NPH exógena ao dia, sendo 1U injetada às 13h e 4U às 19h. As linhas verticais representam o EPM. * $p<0,05$ ao comparar com os ratos controles e DTI. 79
- Figura 14 - Efeito do tratamento de ratos diabéticos por STZ com insulina NPH humana sob a variação da massa corporal. As barras verticais representam o EPM. * $p<0,05$ em comparação aos ratos normais. 82
- Figura 15 - Efeito do tratamento de ratos Wistar diabéticos com insulina NPH humana. A glicemia foi medida no 15º dias após a indução do diabetes e os animais foram submetidos a jejum prévio de 10 horas. As linhas verticais representam o EPM. * $P<0,05$ em comparação aos animais saudáveis. 83
- Figura 16 Diferenciação entre os tecidos cortical e medular da glândula supra-renal de ratos Wistar. Em A e B coloração com hematoxilina-eosina em C e D tratamento com anticorpos associados a rodamina para análise imunohistoquímica. 91

Figura 17	Efeito do diabetes sobre a expressão da isoforma alfa da PKC, após 15 dias da indução da doença. Em A- controle negativo; B- animais controles; C- animais diabéticos.	92
Figura 18	Efeito do diabetes sobre a expressão da isoforma épsilon da PKC, após 15 dias da indução da doença. Em A- controle negativo; B- animais controles; C- animais diabéticos.	93
Figura 19	Efeito do diabetes sobre a expressão da isoforma zeta da PKC, após 15 dias da indução da doença. Em A- controle negativo; B- animais controles; C- animais diabéticos.	94
Figura 20	Efeito do diabetes e do tratamento com insulina NPH humana sobre a expressão de PKC alfa em células cromafins da medula adrenal de ratos Wistar. As colunas representam as medidas de densidade ótica vezes área. Acima de cada coluna há um Western Blot representativo dos resultados obtidos. A barra vertical representa o EPM. * $p < 0,05$ em comparação aos ratos controles. .	96
Figura 21	Efeito do diabetes e do tratamento com insulina NPH humana sobre a expressão de PKC épsilon em células cromafins da medula adrenal de ratos Wistar. As colunas representam as medidas de densidade ótica vezes área. Acima de cada coluna há um Western Blot representativo dos resultados obtidos. A barra vertical representa o EPM.	97
Figura 22	Efeito do diabetes e do tratamento com insulina NPH humana sobre a expressão de PKC zeta em células cromafins da medula adrenal de ratos Wistar. As colunas representam as medidas de densidade ótica vezes área. Acima de cada coluna há um Western Blot representativo dos resultados obtidos. A barra vertical representa o EPM. * $p < 0,05$ em comparação aos ratos controles. .	98
Figura 23	Modelo de regulação de canais de K^+ retificadores controlados por voltagem pelo complexo $Kv\beta$ -p62-PKC ζ (KIM et al., 2003).	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito do tratamento de ratos diabéticos por insulina exógena NPH humana sobre os níveis plasmáticos de frutossamina, triglicerídios, colesterol total e c-HDL, c-LDL e c-VLDL.	84
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	acetilcolina
ACTH	hormônio adrenocortecotrófico
AGEs	produtos finais avançados de glicação
AMPc	monofosfato de adenosina cíclico
CCDV	canais de cálcio dependentes de voltagem
c-HDL	“c- high density lipoprotein” colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidade
c-LDL	“c- low density lipoprotein” colesterol ligado a lipoproteínas de baixa densidade
c-VLDL	“ c- very low density lipoprotein” colesterol ligado a lipoproteínas de muito baixa densidade
DBH	dopamina beta-hidroxilase
DAG	diacilglicerol
DM	diabetes mellitus
DOPA	di-hidroxifenilalanina
DTI	ratos diabéticos tratados com insulina
DTS	ratos diabéticos tratados com salina
ERK	“extracelular signal-regulates kinase” quinase regulada por sinal extracelular
GLUT	transportador de glicose
HVA	canais de cálcio do tipo “high voltage-activated” ativados por alta voltagem
HPA	eixo hipófise-pituitária-adrenal
IP ₃	inositol trifosfato
KDa	kilodaltons
LVA	canais de cálcio do tipo “low voltage-activated” (ativados por baixa voltagem)
mAChR	receptor muscarínico de acetilcolina
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
MEK	“mitogen extracelular signalling regulated kinase” quinase regulada por sinal mitógeno extracelular
nAChR	receptor nicotínico de acetilcolina

NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
Na ⁺ - K ⁺ ATPase	Bomba de sódio e potássio
PBS	“phosphato buffered saline” solução tampão fosfato”
PC-12	célula cromafim tumoral de rato
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDK-1	quinase dependente de fosfoinositídeo 1
PKA	proteína quinase A
PKC	proteína quinase C
PLC	fosfolipase C
PMA	forbol 12-miristato 13 acetato
PNMT	feniletanolamina-N-metil-transferase
PS	fosfatidilserina
Ser	serina
STZ	estreptozotocina
TH	tirosina hidroxilase
TBS	“solution TRIS buffer”, solução tampão TRIS
TPA	12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol 13-acetato
TRIS	tris(hidroximetil)-amino-metano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Estatística, definição e classificação do diabetes mellitus	19
1.2 Hipoglicemia iatrogênica e a importância das catecolaminas para o metabolismo	23
1.3 A síntese e secreção de catecolaminas pelas células cromafins adrenais	26
1.4 Fatores que podem afetar a secreção de catecolaminas no diabetes mellitus	31
1.5 Proteína quinase C: estrutura, classificação e mecanismo de ativação	33
1.6 A contribuição de isoformas de proteínas quinase C para as complicações diabéticas	38
1.7 O papel de proteínas quinase C nos processos de síntese e secreção de catecolaminas por células cromafins da medula adrenal	43
1.8 Proteínas quinase C e a cascata de sinalização MAPK em células cromafins adrenais	50
2 OBJETIVOS	57
2.1 Objetivo geral	57
2.2 Objetivo específicos	57
3 MATERIAIS E MÉTODOS	58
3.1 Obtenção dos animais	58
3.2 Indução do diabetes mellitus e sacrifício dos animais	58
3.3 Estabelecimento do protocolo de tratamento de ratos diabéticos por administração de insulina NPH humana	59
3.3.1 O comportamento alimentar e variação dos níveis glicêmicos de ratos durante 24 horas consecutivas ..	59
3.3.2 Tratamento de ratos diabéticos por insulina NPH humana	60

3.3.3 Avaliação da eficácia do tratamento do diabetes mellitus	60
3.4 Análise da expressão das isoformas de proteína quinase C por imunohistoquímica	62
3.4.1 Grupos experimentais	62
3.4.2 Técnica de imunohistoquímica para análise da expressão das isoformas α , ϵ e ζ de proteína quinase C . . .	63
3.5 Análise da expressão das isoformas α , ϵ e ζ de proteína quinase C por Western Blot	64
3.5.1 Grupos experimentais	64
3.5.2 Técnica de Western Blot para análise da expressão de isoformas de proteína quinase C	65
3.6 Análise estatística	67
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.1 Avaliação da eficácia da indução do diabetes mellitus utilizando a citotoxina estreptozotocina (STZ)	68
4.2 Tratamento de ratos diabéticos utilizando insulina NPH humana	71
4.2.1 Comportamento alimentar e variação dos níveis glicêmicas de ratos controles e com diabetes induzido por estreptozotocina	71
4.2.2 Estabelecimento do tratamento de ratos Wistar diabéticos por estreptozotocina utilizando insulina NPH humana	78
4.2.3 Avaliação da eficácia do tratamento de ratos Wistar diabéticos utilizando insulina NPH humana	80
4.3 Análise da expressão e distribuição intracelular das isoformas α , ϵ e ζ de proteína quinase C em células cromafins da medula adrenais utilizando a técnica de imunohistoquímica	89
4.4 Análise da expressão das isoformas α , ϵ e ζ de proteína quinase C em células cromafins adrenais utilizando a técnica de Western Blot.	95

5 CONCLUSÕES	113
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESTATÍSTICA, DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DO DIABETES MELLITUS

Estatísticas apontam para o aumento na prevalência do diabetes mellitus (DM) em adultos de 171 milhões no ano de 2005 para 366 milhões no ano de 2030 em todo o planeta (OMS, 2005). A elevação do número de casos de DM relaciona-se com vários fatores como a urbanização, o aumento da expectativa de vida, a industrialização e a obesidade, dentre outros (Onkamo et al., 1999; Torquarto et al., 2003).

A situação do Brasil não é diferente da encontrada no resto do mundo. O Censo Nacional do Diabetes realizado pelo Ministério da Saúde e o CNPq entre 1986 e 1988 mostrou que o DM atinge 7,6% da população entre 30 a 69 anos (MALERBI e FRANCO,1992). Apesar de nenhum outro estudo com abrangência nacional ter sido realizado desde então, nas últimas décadas a taxa de mortalidade atribuída ao DM aumentou significativamente no Brasil (GEORG et al., 2005).

Torquarto et al., 2003 realizou um estudo na cidade de Ribeirão Preto no qual foi utilizado a mesma metodologia do Censo Nacional do Diabetes. Os resultados mostraram que em indivíduos da faixa etária entre 30 e 69 anos a prevalência média do DM foi de 12,1%. Esse estudo é um indicativo de que cidades em processo progressivo de urbanização, como em Ribeirão Preto, possivelmente apresentarão resultados similares, o que sugere que a prevalência de 7,6% observada quando o Censo Nacional do Diabetes foi realizado provavelmente já foi ultrapassada (TORQUARTO et al., 2003).

Wild et al. (2004) constataram que no ano 2000 o número de brasileiros acometidos pelo DM era de 4,6 milhões e estimou que em 2030 este número possivelmente atingirá a cifra de 11,3 milhões de habitantes.

Foi estimado que o gasto financeiro do Brasil devido ao DM no ano 2000 foi de aproximadamente 23 bilhões de dólares. Desse total, cerca de 19 bilhões foram devido a gastos diretamente relacionados à doença e o restante, aproximadamente 4 bilhões de dólares com gastos indiretos. Podem ser classificados como custos diretos do DM as despesas geradas com serviços médicos ambulatorial e hospitalar

(internações), exames laboratoriais e medicamentos. Já os gastos indiretamente relacionados ao DM incluem perda de produtividade devido à ausência ao trabalho (afastamento), redução da capacidade de produção, aposentadoria precoce e mortalidade prematura (BARCELÓ et al, 2003).

O DM é um conjunto de doenças metabólicas caracterizado pelo desequilíbrio do metabolismo dos carboidratos, das gorduras e das proteínas como consequência da reduzida síntese e/ou secreção de insulina pelas células β pancreáticas e/ou devido ao desenvolvimento de resistência dos tecidos ao hormônio, o que reduz drasticamente a captação e metabolismo da glicose pela maioria das células do corpo (TURNER e NEIL, 1992, GUYTON e HALL, 2006).

Os sintomas clássicos do DM são poliúria, polidipsia e perda de peso inexplicada. O DM pode ser diagnosticado por meio de três critérios, (1) presença dos sintomas do DM e glicemia casual $\geq 200\text{mg/dl}$; (2) glicemia após período de jejum de no mínimo oito horas $\geq 126\text{mg/dl}$ e (3) glicemia $\geq 200\text{mg/dl}$ duas horas após ingestão de 75g de glicose anidra dissolvida em água durante teste oral de tolerância à glicose (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2008).

A hiperglicemia é o principal fator de risco responsável pelo desenvolvimento de complicações sistêmicas que são consideradas as principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes com DM (EVCIMEN e KING, 2007). Estas complicações são divididas em dois grupos, as complicações macrovasculares que incluem doença da artéria coronária, arterosclerose e doença vascular periférica; e as complicações microvasculares que incluem retinopatia, nefropatia e neuropatia (BROWNLEE, 2001; EVCIMEN e KING, 2007). Como consequência os pacientes com DM possuem maior risco de desenvolver infarto do miocárdio, diversas neuropatias periféricas autonômicas debilitantes, cegueira, falência renal, amputação dos membros inferiores e derrame cerebral (BROWNLEE, 2001).

A American Diabetes Association (2008) classificou a doença em quatro categorias de acordo com a sua etiologia: o DM tipo 1, o DM tipo 2, o DM gestacional e um grande grupo denominado de outros tipos específicos de DM.

O DM tipo 1 é responsável por 5 a 10% dos pacientes com DM. Esse tipo de DM acomete predominantemente crianças e adolescentes, mas pode surgir em qualquer idade até mesmo em idosos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2008). O DM tipo 1 resulta predominantemente de um processo auto-imune de destruição das células β pancreáticas denominado de insulite (BALDA e PACHECO-

SILVA, 1999). Diversos mecanismos podem contribuir para a destruição das células β , incluindo reações de hipersensibilidade tardia mediadas pelos linfócitos T “helper”¹ (T_H1) reativos aos antígenos das ilhotas pancreáticas, a lise das células das ilhotas mediada pelos linfócitos T citotóxicos e a produção local de citocinas, como por exemplo o fator de necrose tumoral (TNF) e a interleucina-1 (IL-1) contra as células das ilhotas (ABBAS, LICHTMAN e POBER, 2003). As células secretoras de outros hormônios presentes nas ilhotas pancreáticas, como as células α produtoras de glucagon, as células δ produtoras de somatostatina e as células PP produtoras de polipeptídio pancreático, não são destruídas durante a insulite (BALDA e PACHECO-SILVA, 1999). Fatores ambientais também estão relacionados com a destruição das células β pancreáticas, porém esses fatores ainda não estão claramente definidos. A taxa de destruição das células β do pâncreas é variável entre os pacientes, sendo geralmente rápida em crianças e lenta nos adultos. Portanto o DM tipo 1 também é caracterizado por ausência virtual de insulina e freqüentemente está associado a cetoacidose, deste modo, o paciente tem necessidade de fazer aplicações de insulina exógena desde o momento do diagnóstico da doença. Essa é a forma mais grave do DM. Uma minoria de pacientes com DM tipo 1 não apresenta evidências de auto-imunidade contra as células β pancreáticas e a etiologia da doença ainda não é conhecida. Essa forma mais rara do DM tipo 1 é classificada como DM idiopática (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2008).

O DM tipo 2 é responsável por 90 a 95% dos casos da doença (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2008). A etiologia do DM tipo 2 varia de paciente para paciente podendo apresentar desde um predomínio da resistência a insulina com pouca deficiência de sua secreção até um predomínio da deficiência secretória de insulina com pouca resistência dos tecidos ao hormônio. O DM tipo 2, como o DM tipo 1, também apresenta predisposição genética, porém o estilo de vida e a idade são fundamentais para determinar o início e a intensidade da doença. O risco de desenvolvimento de DM tipo 2 aumenta com a idade, obesidade e falta de exercício físico. Esse tipo do DM reúne um grupo heterogêneo de formas mais leves da doença e ocorre predominantemente em adultos obesos, visto que a obesidade por si só causa resistência à insulina. Pacientes com DM tipo 2 que não são obesos geralmente apresentam acúmulo de tecido adiposo na região abdominal. A resistência à insulina pode ser diminuída com redução do peso e/ou tratamento

farmacológico da hiperglicemia, mas raramente a sensibilidade dos tecidos a insulina retorna ao normal (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2008). É importante ressaltar que atualmente tem sido observado o aumento da prevalência do DM tipo 2 em crianças e adolescentes. Como nos adultos os principais fatores de risco também são a obesidade e estilo de vida sedentário (MARCOVECCHIO, MOHN e CHIARELLI, 2005).

O DM gestacional é definido como o primeiro diagnóstico de intolerância à glicose durante a gravidez. Geralmente a diminuição da tolerância à glicose ocorre no terceiro trimestre da gravidez. Essa classificação não exclui a possibilidade de que as alterações na tolerância à glicose possam anteceder a gravidez, porém não foram previamente identificadas. Também não é considerado se a aplicação de insulina é necessária para o tratamento ou se apenas modificações da dieta são suficientes e também se o DM persistirá ou não após o parto. A prevalência de casos de DM gestacional varia de 1 a 14% do total de mulheres grávidas dependendo da população estudada (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2008).

Os outros tipos específicos de DM englobam as mais variadas etiologias da doença: DM causado por funcionamento anormal das células β ou da insulina devido a defeitos genéticos, DM decorrente de outras doenças do pâncreas endócrino, DM induzido por drogas, infecções e ainda formas incomuns de DM mediado pelo sistema imune ou associado a outras síndromes genéticas como a síndrome de Down, Turner, Klinefelter e outras (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2008).

Segundo a AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (2008), a caracterização de um paciente como tendo um tipo específico de DM geralmente depende das circunstâncias presentes no momento do diagnóstico. Porém muitos pacientes diabéticos não se enquadram facilmente dentro de uma única classe. Deste modo, para o profissional de saúde e para o paciente, o mais importante não é nomear o tipo particular de DM e sim entender a patogênese da hiperglicemia e tratá-la eficazmente, devolvendo ao paciente o seu equilíbrio metabólico.

1.2 HIPOGLICEMIA IATROGÊNICA E A IMPORTÂNCIA DAS CATECOLAMINAS PARA O METABOLISMO

A insulina é o mais importante hormônio que reduz os níveis sanguíneos de glicose sendo liberada pelo pâncreas em situações de hiperglicemia. Ela atua aumentando o transporte de glicose para o interior das células, a glicogênese, a conversão da glicose em excesso a ácidos graxos e seu estoque no tecido adiposo, e inibindo a lipólise, a gliconeogênese e a secreção de glucagon. Em situação de deficiência grave de insulina a utilização da glicose pelas células é cada vez menor, enquanto aumenta a utilização das gorduras e das proteínas elevando a liberação de corpos cetônicos no plasma com o desenvolvimento de acidose metabólica (GUYTON e HALL, 2006).

O tratamento do DM tipo 1 consiste na administração de insulina exógena para manter o metabolismo energético o mais próximo possível da normalidade. No caso do DM tipo 2, no início do tratamento são recomendados dieta e exercícios físicos visando a perda de peso e diminuição de possível resistência dos tecidos à insulina. Se esse esquema falha é aconselhável a administração de fármacos que aumentam a sensibilidade dos tecidos à insulina, como as tiazolidinedionas e a metformina ou fármacos que estimulam a secreção do hormônio pelo pâncreas como as sulfoniluréias. Entretanto, em muitos indivíduos, deve-se administrar insulina exógena para regular o nível de glicemia (GUYTON e HALL, 2006).

As sulfoniluréias são exemplos de medicamentos que aumentam a secreção de insulina. Elas atuam ligando-se a um receptor específico da célula β que determina o fechamento dos canais de potássio dependentes de ATP, resultando em alteração do potencial de membrana, abertura de canais de cálcio dependente de voltagem, entrada de cálcio, ocasionando a secreção de insulina na corrente sanguínea. As sulfoniluréias também reduzem a remoção da insulina da circulação pelo fígado, aumentando a sua meia-vida (GUYTON e HALL, 2006).

Apesar da existência de várias drogas hipoglicemiantes, a insulina constitui a base do tratamento de praticamente todos os pacientes com DM tipo 1 e de muitos pacientes com DM tipo 2 e também das outras categorias de DM. Apesar de melhorar significativamente a qualidade de vida dos indivíduos diabéticos, um fator

limitante da insulinoterapia são as situações de hipoglicemia decorrentes do próprio tratamento (DIABETES CONTROL e COMPLICATIONS TRIAL, 1997).

Pacientes diabéticos sofrem em média de um a dois episódios de hipoglicemia sintomática por semana. Dez por cento dos pacientes que fazem tratamento convencional e 25% dos pacientes que fazem terapia intensiva com insulina sofrem pelo menos um episódio de hipoglicemia grave por ano. Quatro por cento das mortes de indivíduos diabéticos são atribuídas à hipoglicemia. Portanto a hipoglicemia decorrente do tratamento, também chamada de hipoglicemia iatrogênica, é um dos principais problemas enfrentado pelos diabéticos (CRYER, DAVIS e SHAMOON, 2003).

A hipoglicemia iatrogênica pode ser explicada como o resultado do excesso de insulina no plasma juntamente com defeitos do sistema de contra-regulação da glicose plasmática. O sistema de contra-regulação da glicose promove um aumento da glicemia em situações de baixa concentração de glicose no sangue. Ele é composto por vários fatores e cada um deles possui um grau de importância diferente dentro desse sistema. Os fatores contra-regulatórios da glicose são: glucagon, adrenalina, hormônio do crescimento, cortisol, auto-regulação da glicose pelo fígado, neurotransmissores, outros substratos metabólicos que não a glicose (CRYER, 1997).

Em humanos a hipoglicemia se desenvolve em situações de deficiência de glucagon e adrenalina na presença de insulina a despeito da ação de todos os outros fatores contra-regulatórios da glicose. Portanto o glucagon e a adrenalina são os agentes principais para recuperação da normoglicemia enquanto todos os outros fatores citados acima possuem menor grau de importância para a contra-regulação (CRYER, 1997).

A secreção de glucagon e adrenalina são estimuladas quando o nível glicêmico é de aproximadamente 68 mg/dl, ou seja, próximo ao limiar inferior da normoglicemia que é 70 mg/dl (CRYER, 2007). O glucagon é um hormônio secretado pelas células α pancreáticas que aumenta a glicemia por elevar as taxas de glicogenólise e gliconeogênese no fígado e inibindo a secreção de insulina pelo pâncreas. A adrenalina eleva a glicemia atuando principalmente nas células musculares e do fígado onde aumenta a taxa de quebra do glicogênio e diminui a sua captação. Além disso, também inibe a secreção da insulina pelas células β pancreáticas (GILMAN, HARDMAN e LIMBIRD, 2001). A adrenalina é um hormônio

secretado pela glândula supra-renal. A adrenalina juntamente com a noradrenalina e dopamina são denominadas de catecolaminas (GUYTON e HALL, 2006).

Porém, em humanos, a secreção de glucagon é diminuída pelo DM ao final de cinco anos. Este problema é compensado pela secreção de adrenalina pela glândula adrenal, que supre a falta do glucagon, evitando situações graves de estresse hipoglicêmico (CRYER, 1994).

O problema é que com o desenvolvimento da doença a secreção de catecolaminas pela glândula supra-renal também torna-se reduzida. Provavelmente isso ocorre porque o limiar de disparo da resposta contra-regulatória é aumentado, ou seja, um maior estímulo hipoglicêmico passa a ser necessário para estimular a secreção de catecolaminas (CRYER, 1994).

Foi também observado que em pacientes diabéticos com reduzida secreção de catecolaminas, o último episódio de hipoglicemia ocorrido contribui para aumentar cada vez mais o limiar de disparo da resposta contra-regulatória, favorecendo o desenvolvimento de novos episódios de hipoglicemia. Portanto, é formado um ciclo vicioso em que a ocorrência de um episódio de hipoglicemia favorece a ocorrência de um próximo episódio com situação cada vez mais grave de estresse glicêmico. (CRYER, 2006).

O desenvolvimento de resposta deficiente das catecolaminas também está relacionado com o desenvolvimento da síndrome de não percepção da hipoglicemia. O indivíduo diabético passa a não apresentar mais os sintomas neurogênicos que indicam a situação de hipoglicemia – como suor, fome, tremor, ansiedade e taquicardia – o que lhe permite prevenir o desenvolvimento de hipoglicemia grave (TOWLER et al., 1993). Foi relatado que um terço dos episódios de hipoglicemia severa ocorre enquanto os pacientes estão acordados e não é acompanhada dos sintomas de advertência (CRYER, 2004).

Os sintomas neurogênicos se manifestam quando os níveis glicêmicos são de aproximadamente 54mg/dl e são de fundamental importância visto que o coma hipoglicêmico ocorre quando a glicemia situa-se na faixa de 41 a 49 mg/dl (BEM-AMI et al, 1999).

Portanto, a diminuição na secreção de catecolaminas pela glândula adrenal é um evento patofisiológico crítico no DM visto que pacientes que apresentam deficiência combinada de glucagon e catecolaminas possuem 25 vezes mais risco de desenvolver episódios de hipoglicemia grave com ocorrência de coma que

pacientes com deficiência de glucagon, mas com secreção normal de catecolaminas (CRYER, 2007).

1.3 A SÍNTESE E SECREÇÃO DE CATECOLAMINAS PELAS CÉLULAS CROMAFINS ADRENAIS

A glândula supra-renal é um órgão bilateral que se localiza ântero-posteriormente aos pólos superiores de cada rim. Cada glândula tem comprimento de cerca de 5 centímetros e espessura em torno de 1 centímetro. A glândula-supra renal é considerada uma glândula complexa porque é formada por dois tipos de tecidos totalmente diferentes quanto à histologia, à origem embriológica, à bioquímica e às características funcionais. Esses dois tecidos são a medula adrenal, localizada centralmente e que secreta catecolaminas, e o córtex adrenal que se localiza na periferia da glândula adrenal e secreta corticóides (DOUGLAS, 2000).

Embriologicamente o córtex da glândula adrenal é originário de células mesodérmicas da zona urogenital que se acumulam no espaço entre o somito e o tubo neural para formar o primórdio córtex adrenal. Posteriormente, células ectodérmicas de linhagem simpatoadrenal provenientes da crista neural se agregam na periferia do primórdio córtex adrenal antes de migrarem para o seu interior e constituírem a medula adrenal (AUNIS e LANGLEY, 1999). A separação entre as células medulares e as células corticais da glândula adrenal é resultado da expressão de diferentes moléculas de adesão entre elas (LANGLEY e AUNIS, 1984; LEON et al., 1992).

A medula adrenal é composta basicamente por células cromafins, neurônios colinérgicos e noradrenérgicos e células que apresentam fenótipo intermediário entre células noradrenérgicas e neurônios. Essas células secretam noradrenalina, mas a sua função fisiológica ainda não é conhecida (AUNIS e LANGLEY, 1999).

As células cromafins, assim denominadas porque se coram com facilidade pelo ácido crômico, podem ser classificadas como adrenérgicas e noradrenérgicas. As células cromafins adrenérgicas secretam basicamente adrenalina enquanto as células cromafins noradrenérgicas secretam principalmente noradrenalina (DOUGLAS, 2000). Essas células também podem ser diferenciadas por meio de

análise microscópica, enquanto as células cromafins noradrenérgicas apresentam grânulos escuros e de formato irregular, as células adrenérgicas possuem grânulos esféricos, mais claros e dispersamente distribuídos no interior da célula (ARTALEJO, 1995).

Foi verificado que a proporção entre células cromafins adrenérgicas e noradrenérgicas dentro da medula adrenal é variável entre as espécies. Em humanos e bovinos aproximadamente 75% das células cromafins adrenais são adrenérgicas enquanto que no rato as células adrenérgicas podem representar 85% do total das células cromafins (AUNIS e LANGLEY, 1999).

Além da adrenalina e da noradrenalina, as vesículas secretoras presentes nas células cromafins contém dopamina, histamina e serotonina. Além dessas aminas, esses grânulos são também compostos por opióides, encefalinas, substância P, peptídeo vasoativo intestinal (VIP), somatostatina, neurotensina, peptídeo natriurético atrial, neuropeptídeo Y e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina. Esses compostos estocados nos grânulos cromafins podem modular a secreção de catecolaminas por meio de ação autócrina e parácrina (BURGOYNE, 1991; ARTALEJO, 1995).

Em condições fisiológicas as catecolaminas e demais compostos presentes nos grânulos das células cromafins adrenais são secretados por exocitose (BURGOYNE, 1991; ARTALEJO, 1995). A regulação da secreção de catecolaminas é basicamente neurogênica sendo que as células cromafins são inervadas por fibras pré-ganglionares simpáticas do nervo esplâncnico, principalmente colinérgicas, provenientes das colunas intermédio-laterais da medula espinhal (YAMAGUCHI, 1992). Células cromafins adrenérgicas e noradrenérgicas possuem padrão de inervação diferenciada sendo que populações de neurônios pré-ganglionares distintos inervam células cromafins adrenérgicas ou noradrenérgicas (EDWARDS et al, 1996). Cada célula cromafim é estimulada individualmente, de modo que a união elétrica entre as células não é necessária, além disso a ligação entre células cromafins por meio de junções comunicantes tem sido questionada (LEON et al., 1992).

A acetilcolina (ACh), o estimulador fisiológico das células cromafins, é capaz de ativar duas classes de receptores presentes na membrana da célula: o receptor nicotínico (nAChR) e o receptor muscarínico (mAChR). A ativação desses receptores

dispara uma cadeia de eventos intracelulares que resulta no aparecimento de catecolaminas na corrente sanguínea (MALHOTRA, 1989; ARTALEJO, 1995).

A quantidade de nAChR e mAChR expressados em células cromafins adrenérgicas e noradrenérgicas não é homogênea. Células cromafins adrenérgicas expressam predominantemente nAChR enquanto as células cromafins noradrenérgicas expressam principalmente mAChR (ZAIKA et al., 2004).

A eficiência de diferentes classes de agonistas em estimular a secreção de catecolaminas pelas células cromafins depende de sua habilidade em elevar a concentração intracelular de Ca^{2+} livres pelo influxo desses íons a partir do meio extracelular ou pela liberação desses íons de pools intracelulares (BURGOYNE, 1991), sendo que o principal sinal para a secreção de catecolaminas induzida por ACh é o aumento da concentração intracelular de cálcio livres devido ao influxo deste íon a partir do meio extracelular (ARTALEJO, 1995).

A ativação de nAChR permite a entrada de Na^+ e Ca^{2+} através do seu canal iônico, que é inespecífico. A entrada desses íons promove a abertura de canais de Na^+ dependentes de voltagem de modo que o processo de despolarização da membrana é dirigido essencialmente pelo Na^+ extracelular enquanto que a eficiência do íon Ca^{2+} como agente despolarizador é bem menor (NOONEY et al., 1992). A despolarização da membrana plasmática causa a abertura de vários tipos de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (CCDVs) e conseqüente aumento da concentração citosólica de Ca^{2+} livres devido ao influxo desses íons provenientes do meio extracelular (ARTALEJO, 1995; GARCIA et al, 2006).

Os CCDVs podem ser classificados de acordo com a variação de voltagem ao longo da membrana plasmática que é necessária para que ele seja ativado. Os CCDVs que despolarizam por meio de fraca despolarização da membrana, entre 60 a 50mV, são denominados de LVA (*low voltage-activated*) e os que necessitam de despolarizações mais elevadas ($> -30\text{mV}$) são chamados de HVA (*high voltage-activated*) (ARTALEJO, 1995).

Os canais de Ca^{2+} LVA apresentam um único subtipo, referido como canais de Ca^{2+} do tipo T. A principal característica desse subtipo é a produção de uma corrente elétrica transiente devido à rápida inativação do canal. Os canais de Ca^{2+} do tipo HVA são classificados em diferentes subtipos de acordo com sua resistência ou não a ação bloqueadora de diferentes fármacos e também de acordo com a velocidade de retorno ao estado inativado após ativação do canal. Esses canais são

denominados de canais do tipo L (*little inactivation*), do tipo P (foi primeiramente observado em células de Purkinje), do tipo Q (devido a suas semelhanças ao canal do tipo P), do tipo N (inativam mais rápido do que o do tipo L) e do tipo R (*“resistent”* resistência a vários fármacos bloqueadores de canais de Ca^{2+}) (GARCIA, 2006).

A ligação de ACh ao mAChR ativa a fosfolipase C (PLC) que quebra fosfatidilinosítois de membrana formando 1,4,5 trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O DAG permanece ligado à membrana plasmática e auxilia na ativação de proteína quinase C (PKC). O IP_3 difunde pelo citosol e ativa receptores de IP_3 presentes no retículo endoplasmático liso liberando Ca^{2+} para o citosol (MALHOTRA, 1989; BURGOYNE, 1991).

Contudo, a estimulação dos nAChR também pode resultar no aumento da atividade da PLC (EBERHARD e HOLZ, 1988). Além disso, IP_3 também pode elevar a concentração de Ca^{2+} citosólico livre por meio do influxo de Ca^{2+} extracelular através de canais de Ca^{2+} não dependentes de voltagem (MOCHIZUKI-ODA et al., 1991).

Com relação ao IP_3 , já foi demonstrada a presença de receptores desse mensageiro intracelular na membrana de outras organelas além do retículo endoplasmático liso, porém a participação direta dessas organelas para o processo secretório ainda não é claro. Por exemplo, receptores de IP_3 já foram detectados na membrana nuclear interna (HUMBERT et al., 1996; GERASIMENKO et al., 2003), na membrana nuclear externa (STENNO-BITTEL, LUCKHOT e CLAPHAM, 1995) e em vesículas secretoras que contém grande quantidade de Ca^{2+} presentes no citosol de células neuroendócrinas (YOO e JEON, 2000).

Além da estimulação fisiológica de catecolaminas por ACh, outras substâncias também atuam como secretagogos de catecolaminas em células cromafins. Como por exemplo a carbamilcolina, K^+ em altas concentrações e cafeína são secretagogos utilizados em estudos sobre a mobilização de íons Ca^{2+} e secreção de catecolaminas em células cromafins.

A carbamilcolina é um análogo sintético da ACh que se liga aos receptores de ACh presentes na membrana plasmática da célula cromafim. A utilização de carbamilcolina em pesquisas tem a vantagem dela não se degradado por acetilcolinesterases (ARTALEJO, 1995).

A exposição da célula cromafins a altas concentrações de K^+ também estimula a secreção de catecolaminas por meio da despolarização da membrana

plasmática e conseqüente abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (CALLEWAERT, JOHNSON e MORAD, 1991).

A cafeína é uma droga que causa a mobilização de Ca^{2+} em células musculares ligando-se a receptores presentes no retículo endoplasmático (GARCIA et al., 2006). Já foi reportado que a cafeína também libera Ca^{2+} do pool intracelular sensível a rianodina (TERAOKA et al., 1991). O pool de Ca^{2+} sensível a rianodina é mobilizado por Ca^{2+} pelo mecanismo de Ca^{2+} induzido por Ca^{2+} (CICR) que pode ser proveniente do meio extracelular (O'SULLIVAN et al., 1989) ou da mobilização de outro pool intracelular (STAUDERMAN et al., 1991).

Geralmente a secreção de catecolaminas pela células cromafins não diminui a concentração intracelular dessas moléculas. Isso ocorre porque o processo secretório está diretamente relacionado com o aumento da síntese de catecolaminas (DUNKLEY et al., 2004).

No biossíntese de catecolaminas, o aminoácido tirosina, que pode ser captado do sangue é convertido em DOPA (di-hidroxifenilalanina) pela ação da enzima tirosina hidroxilase (TH), que acrescenta uma hidroxila ao anel benzênico do aminoácido formando o grupo catecol, a parte da molécula responsável pelos efeitos biológicos da molécula. A TH é a principal reguladora da via biossintética, sendo responsável por determinar a velocidade de produção das catecolaminas. A segunda etapa da via consiste na conversão de dopa em dopamina que ocorre por um processo de descarboxilação promovida pela dopa descarboxilase. Em seguida dopamina sofre ação da enzima dopamina β -hidroxilase (DBH) formando a molécula de noradrenalina. Nas células adrenérgicas, uma etapa adicional da via produz a adrenalina pela ação da enzima feniletanolamina-N-metil transferase (PNMT) sobre a noradrenalina. Essa enzima é regulada positivamente pelo cortisol (GILMAN, HARDMAN e LIMBIRD, 2001).

A produção das catecolaminas é regulada por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais e sem dúvida a maioria deles estão envolvidos com a expressão e atividade de TH. A atividade de TH pode ser modulada a nível de sua expressão gênica (estabilidade da enzima, freqüência da transcrição do gene de TH, estabilidade da molécula de mRNA, ocorrência de *splicings* alternativos) e a nível da capacidade catalítica (ocorrência de *feedback* de inibição, regulação alostérica e regulação de fosforilações e desfosforilações) (DUNKLEY et al., 2004).

A atividade de TH é regulada pela fosforilação nos resíduos de Ser-8 Ser-19, Ser-31 e Ser-40. A fosforilação em Ser-40 é a que confere maior atividade a TH, enquanto a contribuição direta da fosforilação das outras serinas para a atividade de TH é pequena. Portanto aumenta a discussão se a fosforilação de Ser-8, Ser-19 e Ser-31 colaboram de maneira indireta para a ativação da TH. A fosforilação em Ser-19 resulta em uma molécula de TH com conformação mais aberta o que facilita a fosforilação em Ser-40, favorecendo a ativação de TH. Já foi reportado que a fosforilação em Ser-31 aumenta atividade de TH visto que confere maior afinidade da enzima ao cofator BH₄ (*tetrahydrobiopterin*), necessário para converter tirosina em DOPA (DUNKLEY et al., 2004).

1.4 FATORES QUE PODEM AFETAR A SECREÇÃO DE CATECOLAMINAS NO DIABETES MELLITUS

Os mecanismos responsáveis pela redução na secreção de catecolaminas pela medula adrenal durante o DM ainda não são claros. Nijima (1975) reportou que a secreção diminuída de catecolaminas pode ser explicada pela redução na frequência de liberação de ACh pelos terminais nervosos simpáticos que chegam às células da medula adrenal durante a hiperglicemia. Alguns autores afirmam que a causa seja neuropatia autonômica diabética (HOELDTKE et al, 1982; FUSHIMI et al, 1988; WILKE et al, 1993; HILSTED, 1995). A neuropatia autonômica está relacionada principalmente com lesão axonal ou perda da fibra nervosa sendo portanto irreversível (CRYER, 1994). Estudos histoquímicos para avaliar a integridade morfológica das terminações nervosas do nervo esplênico dentro da medula adrenal durante o DM revelaram que ocorre a diminuição da densidade de inervação das células cromafins, fragmentação axonal e hipertrofia das células de Schwann (WILKE et al, 1993).

Porém, outros autores afirmam que os danos morfológicos observados nas terminações nervosas do nervo esplênico dentro da medula adrenal não constituem a causa da redução na secreção de catecolaminas e consideram que esses dois fenômenos provavelmente não estão relacionados (RYDER et al., 1990; WILKE e HILLARD, 1994; GRANADOS et al., 2000). Cryer (1994) afirmou que a secreção de catecolaminas é afetada a nível celular, já que a resposta adrenal à

queda nos níveis de glicose se reduz em curto prazo, mantendo-se no entanto, inalterada para outros estímulos, o que descarta a hipótese de neuropatia.

A redução da secreção de catecolaminas durante o DM também pode ser explicada pela redução da sensibilidade das células cromafins da medula suprarrenal à ACh (HART et al., 1988; WILKE e HILLARD, 1994). Dessa forma, a diminuição na concentração plasmática de catecolaminas observada durante o DM é devido à redução na frequência de secreção, não sendo portanto causada pela redução da síntese ou do estoque vesicular do hormônio na célula cromafim (GALLEGO et al., 2003). Porém, um outro artigo reporta que a redução da concentração plasmática de catecolaminas é devido a reduzida capacidade de síntese e de secreção desses hormônios pelos indivíduos doentes (GALAN et al., 2004). Garcia (2004) também afirmou que em ratos diabéticos por estreptozotocina (STZ) ocorre redução na síntese e secreção de catecolaminas.

Portanto alguma via de sinalização intracelular relacionada com a síntese e/ou secreção de catecolaminas em células cromafins é comprometida no estado hiperglicêmico. Garcia (1998) relatou que em células PC12 cultivadas em meio hiperglicêmico ocorre uma modificação no padrão de fosforilação de proteínas. As células PC12 são células cromafins tumorais isoladas de medula adrenal de ratos (KIM, PARK e JOH, 1993). Nesse trabalho, foi observado através de Western Blot que uma proteína de massa molecular de aproximadamente 43KDa deixa de ser fosforilada em resíduos de tirosina e serina/treonina quando a célula PC12 é cultivada em meio hiperglicêmico. Devido à massa molecular em acordo com o descrito com a literatura e o fato de ter sido fosforilada em dois tipos de resíduos diferentes, foi proposto que essa proteína é uma proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK).

As MAPKs são proteínas intracelulares envolvidas na sinalização que regula eventos de exocitose (COX e PARSONS, 1997). Elas formam uma família de serina/treonina quinases que são ativadas por fosforilação em resposta a uma variedade de estímulos extracelulares e que por sua vez, fosforilam e ativam outras proteínas intracelulares (COBB, 1999).

O fato de MAPKs deixarem de ser fosforiladas significa que toda a via subsequente à MAPK deixa de ser ativada e que algum ponto na via de sinalização acima da MAPK também está comprometido. Vários estudos sugerem que proteínas quinase C (PKCs) podem estar envolvidas na regulação de MAPKs. As PKCs

também são proteínas sinalizadoras intracelulares e estão presentes em vários tipos celulares afetados pelo DM.

Diversos estudos têm analisado o efeito da hiperglicemia sobre essas proteínas porém a contribuição de cada isoforma de PKC para a patogênese das complicações do DM nos diferentes órgãos ainda não está esclarecida (KANG, 1999). O estudo dessas proteínas torna-se complicado porque o efeito do DM e/ou hiperglicemia sobre a expressão e atividade da PKC é dependente da isoforma envolvida e do tipo celular em que está inserida.

1.5 PROTEÍNA QUINASE C: ESTRUTURA, CLASSIFICAÇÃO E MECANISMO DE ATIVAÇÃO

As PKCs são constituintes fundamentais da maquinaria de sinalização intracelular controlando as principais funções da célula (NISHIZUKA, 1995; DEMPSEY et al, 2000). A família PKC é uma família heterogênea de proteínas do tipo serinotreonina quinases que regulam a atividade de várias outras proteínas (NEWTON, 1997; ALBERTS et al., 2006).

As isoformas de PKC diferem entre si devido à estrutura, cofatores requeridos para a ativação e especificidades para o substrato (JAKEN, 1996; NEWTON, 1997). Estas isoformas estão divididas em três grupos de acordo com os cofatores requeridos para a ativação: PKCs convencionais (α /alfa, β_1 /beta1, β_2 /beta2, γ /gama) que necessitam de diacilglicerol (DAG) ou ésteres de forbol, Ca^{2+} e fosfatidilserina (PS); as PKCs novas (δ /delta, ϵ /épsilon, η /eta, θ /teta) que necessitam de DAG ou ésteres de forbol e PS e as PKCs atípicas (λ /lâmbda, ι /iota, ζ /zeta) que necessitam de PS para serem ativadas mas não necessitam de DAG, ésteres de forbol e Ca^{2+} para apresentarem atividade máxima (NISHIZUKA, 1995; JAKEN, 1996; NEWTON, 1997).

Com relação à PKC- ν foi verificado que ela apresenta 77,3% de similaridade com a proteína quinase μ (mu) e 77,4% com a sua homóloga murina, proteína quinase D (HAYASHI, 1999). Atualmente não há consenso se essas três proteínas juntas compõem um quarto grupo dentro da família de PKC (HAYASHI, 1999) ou se

formariam uma distinta família denominada de proteína quinase D (NEWTON 1997, NEWTON, 2001).

Estruturalmente, todas as PKCs consistem de uma única cadeia polipeptídica que contém uma região regulatória amino-terminal de 20-70 KDa e um domínio quinase carboxi-terminal de aproximadamente 45 KDa (figura 1). Uma região de dobradiça conecta a região regulatória com o domínio quinase (NEWTON, 1997; FONTAINHAS, OBUKHOV e NOWYCKY, 2005).

A porção regulatória contém um domínio autoinibitório chamado de pseudosubstrato e dois domínios de ligação reversível à membrana denominados de domínios C1 e C2 (JAKEN, 1996). O domínio C1 é uma região rica em resíduos de cisteína e está presente em todas as isoformas de PKC. PKCs convencionais apresentam duas cópias do domínio C1 denominadas de C1A e C1B. PKCs novas e atípicas contém apenas uma cópia de C1, porém em PKCs atípicas o domínio C1 é chamado de domínio C1 atípico por não se ligar a ésteres de forbol. O domínio C2 está presente em todas as PKCs convencionais e novas (NISHIZUKA, 1995; JAKEN 1996; NEWTON, 1997; NEWTON, 2001). Proteínas quinases μ e D não possuem domínio C2, mas apresentam um domínio chamado de PH, onde podem se ligar fosfoinosítídeos (NEWTON, 2001).

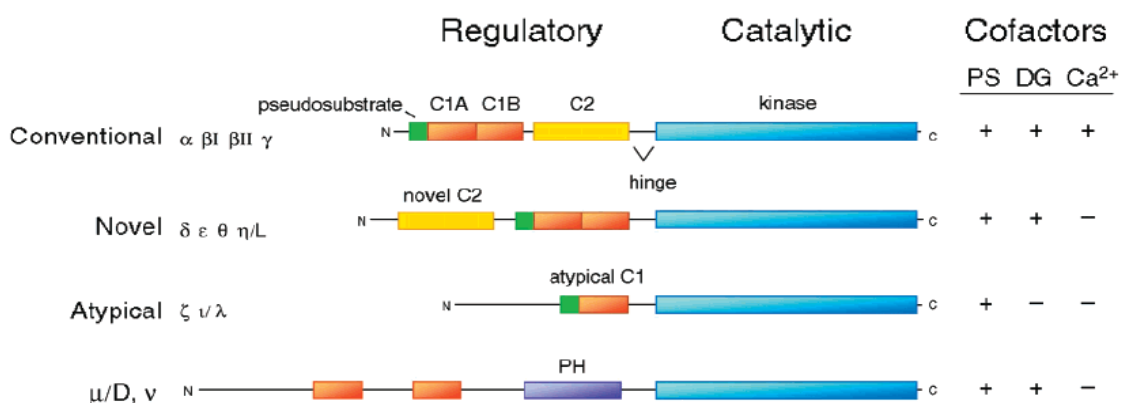


Figura 1: Representação esquemática da estrutura primária de proteínas membros da família PKC. No lado direito da figura estão representados os cofatores requeridos para a ativação por cada grupo de PKC, sendo fosfatidilserina (PS), diacilglicerol (DG) e Ca^{2+} (Newton, 2001).

No domínio catalítico estão localizados três importantes sítios de fosforilação - a alça de ativação, o motivo de ativação e o motivo hidrofóbico - e a cavidade para ligação do substrato chamado de sítio catalítico (NEWTON, 2001). As isoformas de

PKC fosforilam resíduos de serina e treonina de seus substratos na taxa máxima de 10 reações por segundo (NEWTON, 2001).

A atividade enzimática de PKC é criticamente regulada por três mecanismos (figura 2): (1) por fosforilações que modificam a conformação estrutural da enzima preparando-a para a atividade catalítica, (2) pela ligação de cofatores (DAG, forbol ésteres e Ca^{2+}) que conferem atividade enzimática a proteína e (3) pela interação com proteínas estruturais que posicionam a PKC perto de seus agentes regulatórios e substrato (NEWTON, 2001; DEMPSEY, 2000). Portanto, para exercer sua função fisiológica a PKC deve ser processada por fosforilação, ter seu pseudosubstrato liberado do sítio catalítico e estar localizada estrategicamente dentro da célula (NEWTON, 2001). Falhas em qualquer uma dessas etapas da regulação prejudicam a sinalização pela isoforma de PKC (NEWTON, 2001; SHIRAI e SAITO, 2002).

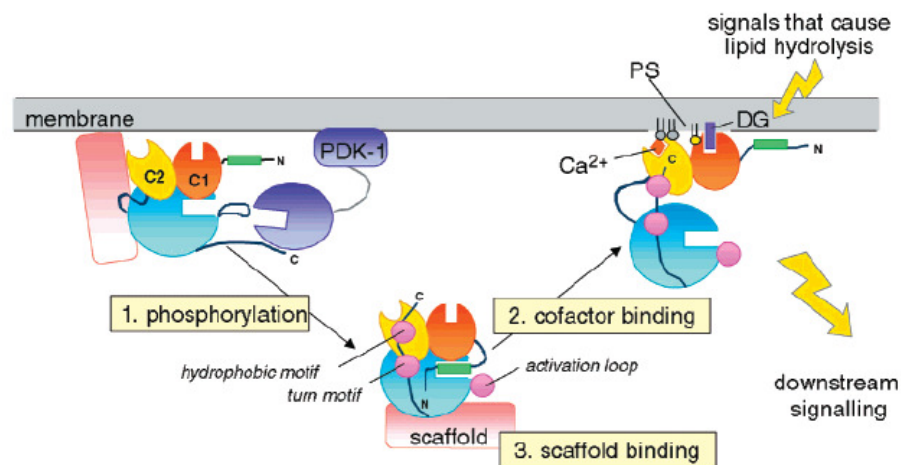


Figura 2: Regulação da atividade enzimática de PKC por (1) fosforilação, (2) ligação de cofatores e (3) interação com proteínas de ancoragem (Newton, 2001).

Para realizarem a sua função fisiológica, inicialmente as PKCs são processadas por uma série ordenada de fosforilações em três regiões conservadas entre as isoformas de PKC situadas no domínio catalítico. Essas fosforilações são requeridas para que a enzima adquira competência catalítica e se localize corretamente dentro da célula (DEMPSEY, 2000).

A primeira fosforilação ocorre na alça de ativação e é realizada pela quinase dependente de fosfoinosítídeo-1, a PDK-1 (NEWTON, 2001). Os mecanismos que controlam esse evento ainda não foram esclarecidos. Já foi reportado que a PDK-1 apresenta elevada atividade *in vitro* e permanece constitutivamente ativa *in vivo*, e a fosforilação por essa quinase é rigorosamente controlada *in vivo*. Portanto, uma

sugestão é que essa regulação é realizada pelo próprio substrato, ou seja, a regulação da fosforilação de PKC pela PDK-1 é feita pela própria PKC que para ser fosforilada deve apresentar adequada conformação estrutural e situar-se em locais específicos dentro da célula, próximos da PDK-1. Para tal, a PKC posiciona-se na porção citoplasmática da membrana, por meio da atividade de proteínas de ancoragens, que são reguladoras da localização espacial de PKCs e de outras proteínas, e então a PKC adota uma conformação específica na qual o pseudosubstrato está fora do sítio ativo, expondo a alça de ativação (NEWTON, 2001).

Porém, outros autores reportam que a PDK-1 possui vários domínios de fosforilação e sugerem no mínimo dois mecanismos regulatórios para a atividade dessa quinase (STEPHENS et al., 1998; CASAMAYOR, MORRICE e ALESSI, 1999;). Provavelmente as condições de estudo para PKCs podem mascarar os mecanismos de regulação da atividade de PDK-1 (NEWTON, 2001).

Após a fosforilação da alça de ativação pela PDK-1, as outras duas regiões do domínio catalítico, o motivo de ativação e em seguida o motivo hidrofóbico, são rapidamente autofosforilados. Após esses eventos de fosforilação a PKC adquire uma conformação denominada madura e se redistribui no citosol (DEMPSEY, 2000). Nesse estágio a PKC é cataliticamente competente, mas é mantida em uma conformação inativa porque o pseudosubstrato ocupa a cavidade onde o substrato irá se ligar (NEWTON, 2001). Portanto, como para a maioria das enzimas, os níveis de expressão e de atividade enzimática de uma PKC podem ou não estar relacionados. Desse modo, a ativação enzimática da PKC é tradicionalmente detectada pela translocação da proteína para a porção citosólica da membrana plasmática (DEMPSEY, 2000).

Shirai e Saito (2002) ressaltaram algumas limitações na interpretação de que apenas a localização da isoforma na membrana plasmática é indicativo de PKC ativada. Segundo eles, apesar de PKCs convencionais e novas translocarem para a membrana plasmática após tornarem-se ativadas, elas também podem migrar para outros compartimentos da célula que não a membrana plasmática. Uma outra questão ainda não esclarecida é se a proteína torna-se cataliticamente ativa após ser translocada ou se ela transloca após adquirir competência catalítica (SHIRAI e SAITO, 2002). Sakai et al. (1997) reportaram que PKC- γ transloca para a membrana

plasmática após tratamento com éster de forbol mesmo na presença de estaurosporina, um inibidor de ativação de PKCs.

A etapa de ativação das PKCs convencionais e novas é iniciada quando DAG ou éster de forbol se liga no domínio C1 da enzima. Essa ligação não causa significativas modificações conformacionais na proteína, mas altera as suas propriedades químicas. DAG ou éster de forbol recobre a fenda hidrofílica desse domínio de modo a criar uma superfície hidrofóbica que permite a sua ligação à membrana (NEWTON, 2001).

O DAG é um produto da clivagem, pela fosfolipase C- β , do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato que está presente em pequenas quantidades na camada interna da bicamada lipídica da membrana plasmática (ALBERTS et al, 2006). O DAG aumenta a afinidade da isoenzima de PKC com a membrana atuando como uma “cola molecular”. A elevação da concentração intracelular de Ca^{2+} também é capaz de ativar PKCs convencionais. O íon Ca^{2+} se liga ao domínio C2 (JAKEN, 1996) e atua como uma ponte entre o domínio C2 e a cabeça do fosfolípido (JAKEN, 1996, NEWTON, 2001).

A ligação da PKC madura à membrana pode ser feita pela ligação do domínio C1 ou C2 ou ainda, pela ligação de ambos os domínios simultaneamente. A ligação da PKC à membrana por apenas um dos domínios estabelece interações relativamente fracas, da ordem de 10^2 a 10^5M^{-1} , dependendo da concentração de diacilglicerol/ésteres de forbol, lipídios aniônicos e Ca^{2+} . Apenas interações de ambos os domínios, C1 e C2 simultaneamente são capazes de fornecer energia suficiente para a liberação do pseudosubstrato do sítio catalítico permitindo a ligação e fosforilação do substrato pela PKC (NEWTON, 2001).

A localização correta da PKC dentro da célula está relacionada com a sua especificidade (DEMPSEY, 2000). Várias proteínas de ancoragem ligam PKC. Algumas regulam diferentes isoenzimas enquanto outras controlam a distribuição de PKCs específicas. Existem proteínas de ancoragem para PKCs não fosforiladas, para PKCs fosforiladas mas não ativadas e para PKCs ativadas (NEWTON, 2001). Por exemplo, os receptores para PKCs ativadas (RACKs) posicionam a PKC em sua específica localização na porção citosólica da membrana permitindo rápido acesso da PKC ao DAG e ao seu substrato (DEMPSEY, 2000; JAKEN, 1996; NEWTON, 1997).

Enfim, a atividade de PKC é regulada por sua maturação, ativação catalítica e correta localização intracelular. Esses três mecanismos regulatórios, em especial os dois últimos, determinam quando e onde cada isoforma de PKC irá desempenhar a sua específica função fisiológica dentro da célula (SHIRAI e SAITO, 2002).

1.6 A CONTRIBUIÇÃO DAS ISOFORMAS DE PROTEÍNAS QUINASE C PARA AS COMPLICAÇÕES DIABÉTICAS

Os três principais fatores que determinam o desenvolvimento das complicações diabéticas, são: (1) a modificação na expressão e/ou na atividade de PKCs, (2) hiperativação da via do sorbitol, (3) o aumento na formação de produtos finais avançados de glicação (AGEs) (KOYA e KING, 1998; DU et al., 2000; BROWNLEE, 2001; EVCIMEN e KING, 2007).

O aumento do fluxo de glicose pela via do sorbitol tem como consequência o estabelecimento de estresse oxidativo dentro das células (HAMADA et al., 2000). O estresse oxidativo tem sido associado a modificações na homeostase intracelular de Ca^{2+} e processos de sinalização e diminuição da atividade da bomba de Na^+ e K^+ . Como resultado, a ativação da via do sorbitol provoca a diminuição na velocidade da condução nervosa, diminuição no conteúdo de mio-inositol, aumento na concentração citosólica de NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida) e diminuição na concentração de NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleotídeo), entre outros efeitos (SHINDO et al., 1992; DREHER, JORNOT e JUNOD, 1995, BROWNLEE, 2001; COPPEY et al., 2001).

Além disso, como o sorbitol não se difunde facilmente através da membrana foi sugerido que o aumento da concentração intracelular dessa molécula causa dano osmótico às células microvasculares (BROWNLEE, 2001).

A modificação na relação NAD^+/NADH inibi a atividade da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, o que consequentemente aumenta a concentração de trioses fosfatos dentro da célula. Provavelmente esse aumento pode ser o responsável pela elevação na formação de metilglioxal, um dos precursores de AGEs e também de DAG (BROWNLEE, 2001).

AGEs são formados por meio de reações covalentes não enzimáticas entre compostos dicarbonil reativos e proteínas, lipídios e DNA. Os compostos dicarbonil

reativos são o glioxal, 3-deoxilglicosona e o metilglioxal. A formação do AGEs altera a estrutura, funcionamento e *turnover* da molécula ao qual o composto dicarbonil se ligou contribuindo para o gradual declínio da função tecidual e manifestação das complicações patogênicas características do DM (JAKUS e RIETBROCK, 2004). Além disto, as células possuem receptores que são ativados por AGEs e a associação destas moléculas glicosiladas aos receptores disparam processos de sinalização celular e estresse oxidativo que provocam danos às células. A quantidade destes receptores é aumentada no DM (PEYROUX e STERNBERG, 2006).

Com relação a PKC, vários estudos mostram que isoformas de PKC contribuem para a patogênese de diferentes complicações decorrentes do DM. O efeito do DM sobre cada isoforma de PKC depende tipo celular em que a proteína está inserida, e do tempo decorrido da doença (EVCIMEN e KING, 2007).

A hiperglicemia é um importante fator de risco para o desenvolvimento da nefropatia diabética, de modo que a doença não ocorre na ausência de hiperglicemia mesmo na presença de predisposição genética (SCHENA e GESUALDO, 2005). A nefropatia diabética é uma síndrome clínica que resulta em redução da capacidade funcional dos rins devido ao acúmulo de matriz extracelular no mesângio e na membrana basal dos glomérulos renais e extensivas lesões no interstício dos túbulos renais (SCHENA e GESUALDO, 2005).

A hiperglicemia aumenta a síntese de DAG e a ativação de PKC nas células mesangiais e em células endoteliais dos glomérulos (MCCARTY, 1998). Foi observado que em ratos Sprague Dawley diabéticos a translocação das isoforma α e $\beta 1$ de PKC para a membrana aumentam em 50% quando comparado aos ratos controles (KOYA et al, 1997). Eles também observaram que em ratos diabéticos ocorre um aumento de 60% na quantidade de PKC- α fosforilada, enquanto em PKC- $\beta 1$ o aumento foi de 75%. Apesar do aumento na translocação e fosforilação da isoforma α de PKC nesses tecidos, utilizando o inibidor específico de PKC- β LY333531, foi verificado que apenas a ativação da isoforma $\beta 1$ é responsável pelas alterações das funções das células endoteliais dos glomérulos e em células mesangiais que estão relacionadas com a nefropatia diabética. Nenhuma modificação foi observada na expressão e translocação das isoformas $\beta 2$, ϵ e δ de PKC, que também foram analisadas (KOYA et al, 1997).

A ativação da isoforma $\beta 1$ de PKC em células mesangiais e em células endoteliais dos glomérulos está relacionada com o aumento na síntese do fator de crescimento β (TGF- β) que eleva a deposição de proteínas da matriz extracelular pelas células mesangiais, (KOYA et al, 1997; MCCARTY, 1998; SCHENA e GESUALDO, 2005) aumenta a expressão do transportador de glicose-1 (GLUT-1) que é o transportador de glicose das células renal residentes, elevando a concentração e metabolismo da glicose dentro dessas células (SCHENA e GESUALDO, 2005) e ativa fosfolipase A2 (PLA2) resultando no aumento da produção de prostanoídes vasodilatadores que dilatam seletivamente arteríolas aferentes e causam hipertensão nos capilares glomerulares (KOYA et al, 1997; MCCARTY, 1998).

A hiperglicemia causa hipertrofia das células que compõem os túbulos renais e fibrose intersticial devido ao acúmulo de proteínas da matriz incluindo fibronectina e colágeno, podendo resultar na perda da função dos túbulos proximais renais (PHILLIPS et al., 1999). Foram analisadas por Western Blot a expressão das isoformas α , $\beta 1$, $\beta 2$, δ e ϵ de PKC das células dos túbulos renais proximais de ratos Sprague-Dawley diabéticos por STZ e em ratos saudáveis. A hiperglicemia não afetou a expressão das isoformas $\beta 2$, α , δ e ϵ mas a expressão da isoforma $\beta 1$ foi significativamente aumentada. Foi também observado que há uma correlação entre o aumento da expressão de PKC- $\beta 1$ e o aumento da expressão e translocação do transportador de glicose GLUT-2. Portanto, essas alterações na expressão da isoforma PKC- $\beta 1$ e do GLUT-2 podem estar relacionadas com a patogênese de danos aos túbulos renais proximais durante o DM (GOESTEMEYER et al., 2007).

A retinopatia diabética é também uma importante complicação do DM, sendo considerada a principal causa de perda da visão na idade adulta (BURSSELL et al., 1997). Shiba et al. (1993) reportou que em células endoteliais de ratos diabéticos por STZ e de ratos geneticamente diabéticos, ocorre elevação nos níveis de DAG e aumento na translocação de PKC do citosol em direção à membrana plasmática, sugerindo aumento da ativação de PKCs convencionais. Essas modificações estão associadas com redução do fluxo sanguíneo nessa região. Experimentos realizados utilizando injeção de um inibidor seletivo de PKC- β na retina de ratos diabéticos evidenciaram que essa isoforma é a principal responsável pela alteração do fluxo sanguíneo retinal (BURSSELL et al., 1997; CURTIS e SCHOLFIELD, 2004). Um dos mecanismos pelo qual a ativação de PKC pode causar vasoconstricção na retina é

pelo aumento da expressão de endotelina-1 (ET-1), um importante vasoconstrictor (TAKAGI et al., 1996).

Mudanças na atividade de PKC também têm sido relacionadas com neuropatia diabética (NAKAMURA et al., 1999). A neuropatia diabética caracteriza-se por diminuição da velocidade da condução nervosa e menor regeneração neuronal (KOYA e KING, 1998). Entretanto o papel de PKCs para a patogênese da neuropatia no DM ainda não é clara (EVCIMEN e KING, 2007). Alguns autores sugerem que em células nervosas, o DM prejudica o *turnover* de fosfatidilinosítídeos e os níveis de DAG são reduzidos durante a doença, o que causa uma diminuição na atividade de PKC nos nervos periféricos (GREENE et al., 1992; BORGHINI et al., 1994). Borghini et al (1994) avaliaram a expressão, distribuição e atividade das isoformas α , β I, β II, δ , ϵ e γ de PKC no nervo ciático de ratos saudáveis e diabéticos por STZ. Foi reportado que, dentre as isoformas analisadas, apenas a isoforma γ não é expressada no nervo ciático dos animais saudáveis. Após tratamento das células com éster de forbol 50% do total das PKCs translocam para a membrana para uma região da membrana plasmática rica em bombas de Na^+ - K^+ (Na^+ - K^+ ATPase), com exceção da isoforma δ que não translocou. Nenhuma modificação na expressão, distribuição e translocação das isoformas de PKC estudadas foram observadas nos ratos diabéticos. Os autores sugerem que durante o DM as PKCs são ativadas porém, de maneira deficiente, o que explicaria as alterações características da neuropatia diabética. A redução da atividade de PKC comprometeria a fosforilação da subunidade α da enzima Na^+ - K^+ ATPase o que conseqüentemente compromete a ativação da proteína.

Uma outra hipótese para explicar a participação de PKCs na patogênese da neuropatia diabética é a ativação dessas proteínas pelo aumento da síntese de DAG e diminuição do fluxo sanguíneo vascular nos nervos periféricos (KOYA e KING, 1998). A inibição de PKCs normaliza a velocidade de condução nervosa em ratos diabéticos (CAMERON et al., 1999) Foi reportado que a inibição específica da atividade de PKC- β previne as disfunções nervosas decorrentes do DM (NAKAMURA et al., 1999).

Modificações na expressão de PKCs em células musculares devido a hiperglicemia podem ser responsáveis pelo aparecimento de miopatias durante o DM (GILES et al., 1998). Muitos estudos têm sugerido que o aparecimento de disfunções cardíacas em ratos diabéticos são causadas por alterações do miocárdio

devido a hiperglicemia (KOYA e KING, 1998). GILES et al. (1998) investigaram se mudanças na atividade e expressão de PKC são a causa do desenvolvimento de alterações no miocárdio e no músculo grácil no DM. Eles verificaram que nos estágios iniciais do desenvolvimento da cardiomiopatia diabética ocorre aumento na expressão e translocação das isoformas α e δ em células ventriculares de ratos BB/Wor diabéticos. A expressão e translocação das isoformas β_2 , γ e ϵ não mudaram significativamente. Resultados similares foram observados em células do músculo esquelético grácil. Como essas isoformas de PKC podem produzir mudanças no pH, na concentração de Ca^{2+} e na contratibilidade celular, eles concluíram que a atividade aumentada de PKC participa do desenvolvimento de anormalidades na musculatura do miocárdio e em músculos esqueléticos que são observadas na progressão do DM tipo 1. Por outro lado, já foi reportado que o DM aumenta a expressão da isoforma β_2 no tecido cardíaco enquanto a expressão da isoforma α não modifica significativamente (INOGUCHI et al., 1992). Wakasaki et al. (1997) verificaram que camundongos transgênicos que superexpressam especificamente a isoforma β_{II} de PKC no miocárdio apresentavam, comparativamente à espécie nativa, hipertrofia ventricular esquerda, necrose de cardiomiócitos, fibrose multifocal e redução da função ventricular esquerda. Nesse mesmo estudo, a utilização de um inibidor específico da isoforma β_{II} de PKC reduziu a maioria das mudanças patológicas cardíacas desses animais, demonstrando que a excessiva ativação dessa isoforma de PKC pode causar cardiomiopatia.

KAWANO et al. (1999) demonstraram que PKC participa de uma importante via dependente de Ca^{2+} pela qual a situação de hiperglicemia ativa o transporte de glicose para o interior de células musculares. Sob condições de hiperglicemia *in vitro*, a ativação e translocação da isoforma PKC- β_2 aumenta em três vezes nas células musculares esqueléticas. Simultaneamente, a distribuição dessa isoforma diminui na fração citosólica. Foi observado também um aumento de 47% na ativação e localização da isoforma PKC- ζ na fração de membrana. Por outro lado, a distribuição das outras isoformas analisadas nesse trabalho (α , β_1 , δ , ϵ , e θ) entre o citosol e a membrana não mostraram mudanças significativas. Esses resultados fornecem evidências de que a isoforma PKC- β_2 é um importante componente da cascata de sinalização ativada por condição de hiperglicemia aumentando o transporte de glicose para o músculo esquelético.

Com relação ao efeito da hiperglicemia sobre a expressão de isoformas de PKC em células cromafins da medula adrenal, após exaustiva revisão bibliográfica não encontramos um artigo que reporte esses efeitos. Esse estudo torna-se necessário tendo em vista que vários trabalhos relatam a participação de PKCs em vias de sinalização relacionadas com a síntese (TAKEKOSHI et al., 2001 a, b; BOBROVSKAYA et al., 2007; GELAIN et al., 2007) e secreção (SENA et al., 2001; FONTAINHAS et al., 2005; MORGAN et al., 2005) de catecolaminas por essas células. Além disso, já foram observadas que durante o DM/hiperglicemia ocorrem alterações nesses processos, o que compromete o equilíbrio metabólico do indivíduo (GALLEGO et al., 2003; GALAN et al., 2004). Esses dados sugerem que alterações na expressão ou atividade de PKC podem estar relacionadas com essas modificações fisiopatológicas.

1.7 O PAPEL DE PROTEINAS QUINASE C NOS PROCESSOS DE SÍNTESE E SECREÇÃO DE CATECOLAMINAS POR CÉLULAS CROMAFINS DA MEDULA ADRENAL

A biossíntese de catecolaminas nas células cromafins está diretamente relacionada com o processo secretório de modo que os estoques intracelulares desses hormônios são restabelecidos após a sua liberação na corrente sanguínea. A biossíntese de catecolaminas é principalmente regulada pela TH, sendo ela a enzima responsável por determinar a velocidade de produção das catecolaminas (GARCIA et al., 2006).

Diversos estudos reportam que as células cromafins possuem receptores para diferentes moléculas sinalizadoras extracelulares que estimulam a síntese e/ou a ativação de TH. Essas moléculas sinalizadoras ativam diversas vias de sinalização intracelulares, algumas delas com participação de PKC.

A leptina, um hormônio secretado pelo tecido adiposo, está relacionado principalmente com o metabolismo energético, regulação do apetite e do peso corporal. A leptina é produto do gene *ob* e a presença de receptores para leptina, denominados de *ObRs*, em células cromafins da medula adrenal já foi determinada em diversas espécies, como em porcos, ratos, bois e humanos (AHIMA, 2005).

Foi reportado que leptina estimula a síntese e atividade de TH em cultura de células cromafins de porco por vias dependentes de PKC e a expressão de TH é completamente bloqueada na presença de inibidores de PKC (TAKEKOSHI et al., 2001b). Esse mecanismo de aumento da síntese de TH é dependente da elevação da concentração intracelular de Ca^{2+} . A elevação dos níveis intracelulares de Ca^{2+} ativa PKCs convencionais que em seguida dispara a cascata de MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógenos). Ao final da cascata MAPK é formado o fator de transcrição AP-1, que é responsável pela transcrição do gene de TH aumentando os níveis de mRNA dessa proteína dentro da célula (TAKEKOSHI et al., 2001b).

Para testar se o aumento de mRNA era refletido no aumento da expressão de TH com atividade biológica, a expressão de TH e o conteúdo de catecolaminas nas células cromafins foram avaliados. Foi então verificado que a leptina estimula a síntese e secreção de catecolaminas. Posteriormente foi observado que na presença de inibidor de PKC a síntese de TH é completamente inibida enquanto os níveis intracelulares de catecolaminas são significativamente reduzidos, demonstrando a importância de PKC para esses processos (TAKEKOSHI et al., 2001b).

Um outra via pelo qual leptina aumenta a transcrição de genes de TH é por meio da ativação de PKC- ϵ . Esses autores observaram que leptina aumenta significativamente a expressão de PKC- ϵ e AMPc (5' monofosfato de adenosina cíclico) em células cromafins de bovinos cultivadas (TAKEKOSHI et al., 2001). Já foi reportado que essa isoforma de PKC pode ser ativada por AMPc (GRANESS et al., 1997) e é capaz de ativar fatores de transcrição gênica de TH via cascata de sinalização MAPK (TAKEKOSHI et al., 2001b).

O polipeptídeo PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) e seu receptor foram identificados em células cromafins adrenais (ARIMURA e SHIODA, 1995). Esse peptídeo regula a expressão dos genes de TH, DBH e PNMT por meio de diferentes mecanismos que envolvem a ativação de PKA e PKC. PKA possui efeito estimulatório sobre a expressão das três enzimas. O aumento da expressão de RNAm de TH e DBH ocorre principalmente via PKA visto que PKC também estimula, mais em menor escala a expressão de TH, e parece não participar da regulação da expressão de DBH. Por outro lado, PKC tem efeito inibitório sobre expressão de PNMT (CHOI, PARK e HWANG, 1999).

Bobrovskaya et al., (2007) demonstrou em células cromafins bovinas que PKC é responsável pela fosforilação de TH em Ser-40 e a manutenção de sua atividade enzimática por um período de até 24 horas (fosforilação sustentada) em resposta a estimulação nicotínica. PKC e outras proteínas fosforilam Ser-40 em resposta a nicotina (DUNKLEY et al., 2004), porém todas elas, com exceção de PKC, mantêm a fosforilação de Ser-40 por alguns minutos, o que é denominado de fosforilação aguda.

A fosforilação sustentada é um importante mecanismo fisiológico para o aumento da síntese de catecolaminas por longos períodos sem que seja necessário o aumento da síntese de TH. Esse mecanismo está relacionado com a resposta do organismo ao estresse metabólico (BOBROVSKAYA et al., 2007).

Em células cromafins bovinas a ativação de proteínas Ser-40 quinases por estimulação Nicotínica é dependente do influxo de Ca^{2+} extracelular através de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. A rápida inativação dessas quinases é consequência da redução dos níveis intracelulares de Ca^{2+} . Bobrovskaya et al., (2007) sugere que PKC é capaz de manter a fosforilação sustentada do resíduo Ser-40 de TH devido a ocorrência de um pequeno aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} que é suficiente para manter a atividade de PKC, mas é insuficiente para sustentar a ativação das outras quinases que também fosforilam Ser-40 de TH. Segundo os autores, redução na atividade de fosfatases não estariam envolvidas.

Bobrovskaya et al., (2007) também relatou que o tratamento de células cromafins com PDBU, um ativador de isoformas convencionais e novas de PKC, manteve as PKCs ativas e aumentou significativamente a fosforilação de Ser-40 por um período de até 24 horas. Yanagita et al, 2000 reportou após tratar células cromafins bovinas com PDBU, as isoformas α e ϵ de PKC permaneceram ativadas por no mínimo 15 horas. Isso sugere que essas isoformas podem ser as responsáveis pela fosforilação sustentada de Ser-40 em TH por 24 horas (BOBROVSKAYA et al., 2007).

A síntese de catecolaminas também pode ser modulada pelo PrRP (prolactin-releasing peptide). Essa proteína é um hormônio hipotalâmico, mas ele e seu receptor são também expressos na medula adrenal e em células cromafins PC12. Tem sido sugerido que esse hormônio exerce uma função autócrina e/ou endócrina sobre as células cromafins adrenais, regulando a biossíntese de catecolaminas (TAKAHASHI et al., 2005). Nanmoku et al., 2005 reportou que em células PC12

cultivadas PrRP estimulou a ativação da enzima TH e induziu a transcrição dos genes de TH, elevando os níveis de RNAm. Esses efeitos de PrRP é parcialmente inibido por inibidores de PKC. Ao utilizar um inibidor de PKA, foi também verificada uma atenuação da síntese de TH. Esses resultados sugerem que PrRP estimula a atividade e síntese de TH por meio da ativação de PKC e PKA (NANMOKU et al., 2005).

Retinol também induz um aumento na atividade de TH via PKC (GELAIN et al., 2007). O retinol (vitamina A) é uma molécula lipofílica que interage diretamente com a membrana e pode produzir mudanças na fluidez e no potencial elétrico da membrana plasmática. Gelain et al. (2007) demonstraram que retinol induz a ativação de TH em dois resíduos, em Ser-40 e Ser-31. PKC está envolvido com a fosforilação de TH em Ser-40, visto que inibidores de PKC bloqueiam completamente essa fosforilação.

Retinol ativa PKC por meio de um lento aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} que é dependente de Ca^{2+} do meio extracelular. Não há participação de Ca^{2+} provenientes de *pools* intracelulares. A elevação desses íons dentro da célula promovida por retinol é muito menor quando comparado ao induzido por estimulação nicotínica. Isso pode ser explicado pelo fato de que nicotina aumenta a concentração intracelular de Ca^{2+} por meio de receptores e canais iônicos e segundos mensageiros, como AMPc e canais de Ca^{2+} . Não há nenhum dado sobre a expressão de receptores de membrana para retinol. Como a concentração intracelular de Ca^{2+} induzido por retinol é muito menor quando comparado com a promovida por nicotina, ele não é capaz de ativar todas as quinases que são ativadas por nicotina, mas é capaz de ativar PKC (GELAIN et al., 2007).

A fosforilação de TH em Ser-31 induzida por retinol é mediada por ERK-1 e ERK-2. Essas quinases podem ser ativadas de maneira dependente ou independente de PKC. Não foi encontrado evidência de que isoformas de PKC estejam envolvidas, visto que inibidor de PKC não afetou a fosforilação em Ser-31 (GELAIN et al., 2007).

Com relação à secreção de catecolaminas pelas células cromafins, diversos estudos tem descrito diferentes proteínas que participam do processo secretório que são substrato de PKC.

PKC juntamente com proteína quinase A (PKA) e a fosfatase calcineurina regulam a capacidade de nAChRs presentes em células cromafins retornarem a sua

conformação ativa após serem dessensibilizados (KHIROUG et al, 1998). Os nAChRs podem ser dessensibilizados quando submetidos à exposição prolongada a ACh ou a altas concentrações desse neurotransmissor (ARTALEJO, 1995). PKC e PKA ao fosforilarem domínios intracelulares de nAChR favorecem a ressensibilização desses receptores enquanto a calcineurina retarda o processo de ressensibilização. Portanto o balanço intracelular entre PKC, PKA e calcineurina regula o estado de fosforilação do nAChR (KHIROUG et al, 1998).

A ativação de receptores específicos presentes na superfície das células cromafins adrenais de bovinos pelos agonistas bradicinina e histamina resulta na ativação de PKC. Essa ativação por contrapartida, inibe a atividade da fosfolipase C por um mecanismo de *feedback* que é controlado pela própria PKC (BOARDER e CHALLIS, 1992; SENA et al, 1996). Portanto, PKC regula a produção de IP₃, molécula envolvida na mobilização de íons Ca²⁺ de pools intracelulares, interferindo na secreção de catecolaminas pelas células cromafins.

Experimentos realizados em células cromafins bovinas mostraram que o éster de forbol PMA, ativador inespecífico de isoformas PKC deprime a despolarização e conseqüentemente reduz a secreção de catecolaminas por essas células. A proteína quinase C ao fosforilar canais de Ca²⁺ sensíveis a voltagem exerce um controle negativo que reduz a probabilidade de abertura desses canais. Canais de Ca²⁺ sensíveis a voltagem do tipo L são os principais alvos para a inibição. Esse processo pode ser essencial para a fina regulação da secreção de catecolaminas por receptores de membrana que interagem diretamente com PKC, não apenas em células cromafins, mas também em neurônios e em outros tipos de células secretórias (SENA et al, 1996). Posteriormente foi reportado que a inibição da atividade de canais de Ca²⁺ sensíveis a voltagem é mediado especificamente pela isoforma ϵ de PKC (SENA et al, 2001).

Por outro lado, foi reportado que em células PC12, a ativação inespecífica de isoformas de PKC estimula a secreção de catecolaminas mesmo na ausência de estímulo despolarizante e sem causar despolarização da membrana plasmática. A PKC ao fosforilar CCDVs (canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem) predominantemente do tipo L, causa a abertura desses canais, o que permite o influxo de íons Ca²⁺ através deles. A conseqüente secreção de catecolaminas pelas células PC12 pode ser devido ao aumento da sensibilidade do aparato secretório ao Ca²⁺ (TAYLOR, 2000).

Os canais de Na^+ controlados por voltagem são fundamentais para o processo de reversão da polaridade da membrana plasmática e conseqüente aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} (CATTERAL et al, 2006). Além disso, a densidade de canais de Na^+ controlados por voltagem são determinantes na regulação do desenvolvimento, diferenciação e regeneração de células neuronais (KOBAYASHI et al, 2002). A ativação de PKC reduz a densidade de canais de Na^+ expressos na membrana plasmática de células cromafins (YANAGITA et al, 1999; YANAGITA et al, 2000). PKCs também regulam as propriedades elétricas de canais de Na^+ controlados por voltagem. A fosforilação de um resíduo de serina (Ser-1506) localizado na subunidade α que forma o canal de Na^+ torna a inativação do canal mais lenta e reduz o pico de corrente de Na^+ através do canal (LI et al., 1993).

PKC também é capaz de regular o processo secretório em células cromafins interferindo na dinâmica do citoesqueleto visto que muitas proteínas que compõem o citoesqueleto são substratos de PKC. As MARCKS são proteínas que unem actinas globulares e estabelecem ligações cruzadas entre filamentos de actina que preenchem o córtex celular (VITALE, 1995). PKC- ϵ ao fosforilar essas proteínas promove a desmontagem da malha cortical de actina facilitando a translocação de vesículas secretórias para regiões próximas da membrana plasmática (PARK et al., 2006).

A ativação de PKC torna as vesículas secretórias mais sensíveis a Ca^{2+} aumentando o número de vesículas que compõem o conjunto de vesículas altamente sensíveis a Ca^{2+} (HCSP). O disparo de um potencial de ação devido a um estímulo fisiológico aumenta o número de HCSP localizadas próximas a canais de Ca^{2+} . Em adição, a ativação de PKC aumenta a sensibilidade das vesículas secretórias mais distantes dos canais de Ca^{2+} ao íon Ca^{2+} . Desse modo, tende a recrutar vesículas localizadas longe dos canais de Ca^{2+} para serem secretadas, alteram o padrão espaço-temporal da exocitose em células cromafins (YANG et al, 2002).

A ativação de PKC estimula a secreção de uma população de vesículas menores e promove a ocorrência do fenômeno de *"Kiss and run"* (GRAHAM et al, 2000). No fenômeno de *"Kiss and run"* não acontece a fusão completa da vesícula secretória com a membrana plasmática que permite a liberação de todo o seu conteúdo para o meio extracelular. O que ocorre é a formação de um poro de fusão temporário com a membrana plasmática que permite apenas a parcial liberação do

conteúdo de catecolaminas devido à pequena extensão do poro e seu curto período de abertura (CHEN et al, 2005).

Experimentos realizados em células PC12 mostraram que a isoforma ζ de PKC regula canais de K^+ controlados por voltagem (canais Kv) em células neuronais (KIM et al., 2003). Os canais Kv consistem de quatro proteínas integrais de membrana denominadas de $K\alpha$ que juntas formam o poro iônico. As subunidades $K\alpha$ são classificadas em quatro diferentes famílias de acordo com o gene codificador: família Kv1 (gene *Shaker*), família Kv2 (gene *Shab*), família Kv3 (gene *Shaw*) e família Kv4 (gene *Shal*) (MISONOU e TRIMMER, 2004). Cada uma dessas famílias de $K\alpha$ é composta por vários membros que foram identificados por análises do DNA complementar (cDNA). A família Kv.1 é composta por sete componentes (Kv1 – Kv-7), enquanto as outras famílias de Kvs possuem menor número de componentes, sendo composta pelos seguintes membros: família Kv2 (Kv2.1 e Kv2.2), família Kv3 (Kv3.1 – Kv3.4) e família Kv4 (Kv.4.1 – Kv4.3) (SONG, 2002).

As propriedades funcionais dos canais Kv dependem das subunidades $K\alpha$ que formam o canal e da interação dessas subunidades com proteínas auxiliares que possuem funções regulatórias. Os canais podem ser homotetraméricos, quando as quatro subunidades $K\alpha$ são idênticas, ou heterotetraméricos, quando as subunidades são diferentes. Com relação aos canais heterotetraméricos, esses apresentam características variadas que dependem das interações entre cada subunidade que o forma (MINOSOU e TRIMMER, 2004). Dentre as proteínas regulatórias, as mais bem estudadas são as subunidades citoplasmáticas $K\beta$ s (PONGS et al., 1999; GULBIS et al., 2000).

O efluxo de K^+ através dos canais Kv regula o potencial de membrana, determinando a abertura ou não dos diferentes canais iônicos dependentes de voltagem localizados na membrana plasmática, inclusive os canais de Na^+ e Ca^{2+} que são fundamentais para o processo secretório (ARTALEJO, 1995).

Os canais de K^+ do tipo Kv1.4, Kv3.4, Kv4.1, Kv4.2 e Kv4.3 permitem o efluxo de íons quando a célula se encontra polarizada e são rapidamente inativados quando a célula despolariza. Portanto, esses canais regulam a formação do primeiro pulso elétrico despolarizador e também participam da regulação da frequência com que as despolarizações ocorrem. Esse tipo de corrente de K^+ é denominado de corrente do tipo A (SERODIO, et al., 1996).

Os canais Kv retificadores são responsáveis pelo restabelecimento do potencial de repouso da membrana após a despolarização e propagação de um potencial de ação em células nervosas e musculares. Portanto, esses canais modulam a frequência e duração do potencial de ação nessas células (MARTENS, KWAK e TAMKUN, 1999). Os canais Kv2.1, Kv2.2, Kv3.1 e Kv3.2 são responsáveis pela formação de corrente retificadora de K⁺ (SONG, 2002).

Kim et al, (2003) demonstraram que por meio de uma proteína denominada de p62, a PKC- ζ se liga e fosforila a subunidade Kv β . A fosforilação dessa subunidade regulatória modula a atividade do canal, diminuindo a dependência por voltagem e possivelmente reduzindo a intensidade da despolarização da célula quando ela é estimulada. Enquanto a célula PC12 está em repouso, o nível de p62 é mantido abaixo de um nível crítico, de modo que a isoforma ζ de PKC não se liga a subunidade Kv β . Quando a célula é estimulada eletricamente a expressão da molécula p62 é aumentada permitindo que PKC- ζ se aproxime e fosforile Kv β (KIM et al., 2003). Dessa maneira, essa isoforma de PKC desempenha um importante papel no comportamento elétrico da célula cromafim, o que pode influenciar sua capacidade secretória.

1.8 PROTEÍNAS QUINASE C E A CASCATA DE SINALIZAÇÃO MAPK EM CÉLULAS CROMAFINS ADRENAIS

Proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) são serina/treoninas quinases que são ativadas por fosforilação em resposta a uma variedade de estímulos extracelulares e em seguida ativam várias proteínas intracelulares (BLENIS, 1993).

Dependendo do estímulo extracelular, a via de sinalização MAPK regula, por exemplo, a transcrição de genes, a localização específica de proteínas dentro da célula, a proliferação celular, a embriogênese, a diferenciação celular e a motilidade celular. A ativação inadequada de vias de sinalização MAPK tem sido relacionada com doenças, tais como câncer, doenças inflamatórias, obesidade e DM (LEVENSON et al., 2004; LAWRENCE et al., 2008).

Uma cascata MAPK é composta por três ou mais quinases que se fosforilam de maneira seqüencial. Já está bem estabelecido que a sinalização MAPK não é

formada por uma única via de sinalização, existem portanto várias cascatas de sinalização MAPK. Um determinado estímulo extracelular desencadeia a fosforilação de uma via de sinalização MAPKs específica (SEGER e KREBS, 1995; COBB, 1999).

As quinases que formam a cascata MAPK recebem duas denominações (figura 3). Uma dessas denominações refere-se ao nível da cascata que ocupa, sendo igual para todas as quinases que ocupam igual posição, mesmo pertencendo a vias de sinalização MAPK distintas. Em acordo com o nível da cascata que ocupa, as MAPKs são designadas como MAP4K, MAP3K, MAPKK, MAPK e MAPKAPK (SEGER e KREBS, 1995).

A outra denominação refere-se ao grupo de isoformas que constituem um nível da cascata em uma via de sinalização específica. No caso de um estímulo que ativa isoformas de PKC, a via MAPK é constituída pela isoforma de PKC (MAP4K), c-Raf-1 (MAP3K), MEK-1 e MEK-2 (MAP2K), ERK-1 e ERK-2 (MAPK) (SEGER e KREBS, 1995).

A quinase c-Raf-1 é uma das isoformas da família Raf, outros membros dessa família em células de mamíferos são as isoformas A-Raf e B-Raf (Hagemann e Rapp, 1999). A isoforma c-Raf-1 apresenta aproximadamente 75 KDa, e contém um domínio quinase na porção carboxi-terminal e um domínio regulatório na extremidade amino-terminal (COBB, 1999). Enquanto c-Raf-1 não é ativada, é mantida no citosol. A ativação de c-Raf-1 é realizada pela proteína RAS que induz a sua translocação do citosol em direção a membrana plasmática (DOUGHERTY et al., 2005). Mas, já foi reportado que PKCs convencionais também podem diretamente ativar c-Raf-1 (SÖZERI et al., 1999). Após ativada, c-Raf-1 fosforila e ativa MEK (mitogen extracellular signaling-regulated kinase) -1 e MEK-2 (WU et al., 1993). A fosforilação de MEK-1 e -2 envolve a fosforilação de um único resíduo de serina (AHN et al., 1993). MEK-1 é uma proteína de 41 KDa, enquanto MEK-2 apresenta 45 KDa (SEGER e KREBS, 1995). MEK-1 e MEK-2 também podem ser ativadas por MEK quinase (MEKK) e autofosforilação (GARDNER et al., 1994). As MEKs ativadas ativam as isoformas ERK-1 e ERK-2 (SEGER e KREBS, 1995).

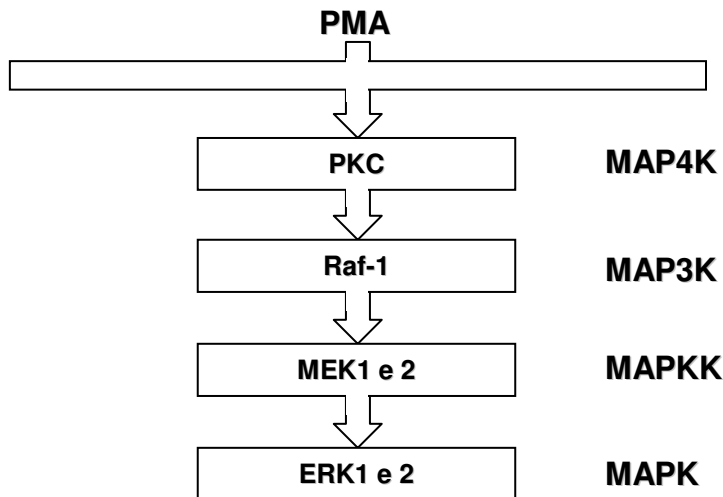


Figura 3: Cascata de sinalização MAPK com participação de PKC (adaptado de Seguer e Krebs, 1995).

As ERKs (extracellular signal-regulated kinases) consistem também em uma família de isoformas, sendo que ERK-1 e ERK-2 são as mais estudadas. Outras isoformas já descritas são a ERK-3 (BOULTON et al., 1994), ERK-4 (BOULTON e COBB, 1991), ERK-5 (LEE et al., 1995) e ERK-7 (ABE et al., 1998). ERK-1 e ERK-2 podem fosforilar um grande número de proteínas após sua ativação. Geralmente essas proteínas são regulatórias (SEGER e KREBS, 1995). Fatores de transcrição nuclear são substratos de ERK, sendo fosforilados após a translocação de ERK para o núcleo (LENORMAMND et al, 1993).

Foi observado que em oócitos de sapos do gênero *Xenopus*, as isoformas de Raf são expressas em baixa concentração quando comparado com o nível de expressão das isoformas MEK-1 e MEK-2. Essa diferença de expressão entre essas quinases permite que o sinal ao ser transmitido de Rafs para MEK-1 e MEK-2 seja amplificado. Quando essas isoformas transmitem o sinal para ERK-1 e ERK-2 não ocorre amplificação. Geralmente, a concentração dessas isoformas de MEK é maior que a de ERK-1 e ERK-2. Isso pode ser explicado pela necessidade de MEKs ter que fosforilar 2 resíduos (uma serina e uma treonina) de ERKs. Devido a maior expressão de MEK-1 e MEK-2, rapidamente o limiar de ERK-1 e ERK-2 ativadas para desencadeamento da resposta ao estímulo é alcançada (FERREL, 1996).

Vários estudos sugerem que PKCs estão envolvidas na regulação de MAPKs em células cromafins adrenais (COX e PARSONS, 1997; TAKEKOSHI et al., 2001; MENDOZA et al., 2003; YANAGITA et al., 2003; WADA et al., 2004). Portanto, as MAPKs também participam dos processos de síntese e secreção de catecolaminas por essas células.

Já foi reportado que quando células cromafins intactas de bovinos são tratadas com nicotina, as células são estimuladas a secretar catecolaminas. Nessas mesmas condições foi observado que PKCs e MEKs também são ativadas (COX e PARSON, 1996). Em experimento no qual foi utilizado inibidores de PKCs, foi observado que a secreção estimulada por nicotina e a atividade de MEK foram reduzidas. Quando as células foram tratadas com inibidores de MEK, a secreção de catecolaminas estimulada por nicotina também foi reduzida. Portanto, PKC e MEK participam do processo de secreção de catecolaminas e parte do mecanismo de secreção dependente de PKC ocorre via cascata de sinalização MAPK (COX e PARSONS, 1997).

Mendoza et al., 2003 reportaram que a despolarização de células cromafins bovinas por meio de elevadas concentrações de K^+ (40mM) causa a fosforilação de ERK por uma via dependente de PKC. Foi observado que as células cromafins que foram tratadas com um inibidor de PKCs convencionais (Gö6976), quando submetidas à despolarização por K^+ , a fosforilação de ERK era reduzida em aproximadamente 96%. Não foi observada redução significativa quando as células cromafins foram tratadas com inibidores de PKA e CaM quinase (CaMK). Em células tratadas com PMA e despolarizadas por K^+ não foi observado elevação na expressão de ERK fosforilado. Esses resultados indicam que o aumento na concentração de Ca^{2+} livre intracelular induzido pela despolarização por K^+ e a ativação de PKC (pelo PMA ou Ca^{2+}) convergem para a mesma via de sinalização que resulta na fosforilação de ERK.

Em experimentos nos quais as células cromafins foram tratadas com dois inibidores seletivos de MEK foi observado redução na expressão de ERK fosforilada, o que sugere que nessa via de sinalização ERK era fosforilada por MEK. Em seguida foi analisado qual isoforma de PKC convencional seria a responsável pela fosforilação de MEK. Com base nos estudos de Sena et al., (1996) e Yanagita et al., (2000), apenas a isoforma convencional α de PKC foi detectada em células cromafins. Portanto, Mendonza et al., (2003) analisou a distribuição intracelular de PKC- α por meio da técnica de imunohistoquímica. As análises de imagens confocais mostraram que em células cromafins não estimuladas, PKC- α encontra-se distribuída por todo o citoplasma. Quando a célula cromafim é despolarizada por K^+ ou PMA, a PKC transloca para a membrana plasmática, região perinuclear e núcleo, sendo que a expressão de PKC- α observada no citosol é diminuída. Com base

nesses resultados, os autores concluíram em células cromafins bovinas, a fosforilação de ERK induzida por elevada concentração de K^+ ocorre de maneira dependente de ativação de PKC- α .

Proteínas que constituem a cascata de sinalização MAPK e as isoformas α e ϵ de PKC também estão relacionadas com a expressão de canais Na^+ na membrana plasmática de células cromafins adrenais (YANAGITA et al., 2003). O canal de Na^+ é formado pela união de duas subunidades, as subunidades α e β . A subunidade α é responsável pela formação do poro iônico enquanto a subunidade β está relacionada com a abertura do poro do canal (GOLDIN, 2001).

Yanagita et al., (2003) observou que quando as células cromafins foram tratadas com inibidores da fosforilação de ERK-1 e ERK-2 (PD98059 ou U0126) ou submetidas à deprivação de soro, a fosforilação de ERK-1 e ERK-2 foi reduzida. A deprivação de soro provavelmente causou a redução da fosforilação de ERK-1 e ERK-2 devido ao fato de que vários fatores de crescimento estão presentes no soro, embora ainda não seja conhecida a concentração média em que esses fatores se encontram no soro (PEARSON et al., 2001). Foi também observado que nas células tratadas a meia-vida do RNA mensageiro (mRNA) da subunidade α foi prolongado de 17,5 para aproximadamente 26h e a taxa de transcrição gênica dessa proteína não foi alterada. Desse modo, a expressão da subunidade α do canal na membrana plasmática foi aumentada, por outro lado, a meia vida da subunidade β ou a estabilidade do seu mRNA não foram modificadas.

Portanto, há uma relação inversa entre a fosforilação de ERK-1 e ERK-2 e a estabilidade do mRNA da subunidade α do canal de Na^+ , que é suficiente para aumentar a densidade desses canais na membrana plasmática. Apesar de apenas a estabilidade da subunidade α ter sido aumentada, a funcionalidade do canal de Na^+ preservada (YANAGITA et al., 2003).

Wada et al., (2004) reportaram que a ativação de isoformas específicas de PKCs reduz a expressão de canais de Na^+ . A ativação da isoforma α promove a internalização desses canais enquanto a ativação da isoforma ϵ reduz a meia vida do mRNA mensageiro da subunidade α que forma o canal iônico.

Com relação a síntese de catecolaminas, Cammarota et al., (2003) reportou que o tratamento de células cromafins adrenais bovinas com histamina causa a fosforilação de TH no resíduo Ser-31 por meio da ativação de ERK-1 e ERK-2. Para certificar se a fosforilação de ERK-1 e ERK-2 estava relacionada com a fosforilação

de Ser-31 as células foram tratadas com inibidores de MEK-1 e MEK-2. Foi então observado que a fosforilação de Ser-31 foi completamente bloqueado. A mensuração da atividade de TH após tratamento das células com um inibidor da atividade de histamina reduziu significativamente a atividade da TH, mostrando que a ativação de Ser-31 por histamina é necessária para a total ativação de TH.

Como dito anteriormente no item 1.7, o hormônio leptina ao se ligar a receptores específicos na membrana de células cromafins aumenta a frequência da transcrição do gene de TH, elevando a expressão de mRNA dessa proteína. Esse processo resulta no aumento da expressão de TH com atividade biológica, o que eleva a síntese de catecolaminas. Em experimentos utilizando inibidores de PKC foi observado que a expressão é completamente bloqueada, demonstrando que essa quinase é determinante para o aumento da síntese de catecolaminas estimulada por leptina (TAKEKOSHI et al., 2001).

Uma das vias pela qual leptina estimula a síntese de catecolaminas de maneira dependente de PKC ocorre pelo aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} através da ativação de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. A elevação dos níveis intracelulares de Ca^{2+} ativa PKC convencionais que em seguida dispara a cascata de MAPKs (TAKEKOSHI et al., 2001).

Vários estudos sugerem que PKC regulam MAPKs em células cromafins (SÖZERI et al., 1992; COX e PARSONS, 1997). PKCs, mas principalmente as PKCs dependentes de Ca^{2+} são capazes de diretamente fosforilar Raf-1, primeira quinase da cascata MAPK (SÖZERI et al., 1992; SEGER e KREBS, 1995).

Ao final da cascata MAPK, ocorre a ativação de ERKs e JNK que são quinases que regulam a atividade de fatores de transcrição gênica, e então fosforilam c-Fos e c-Jun respectivamente. Portanto é formado o fator de transcrição AP-1, que é constituído pelo dímero c-Fos/c-Jun que inicia a transcrição do gene de TH aumentando os níveis de mRNA de TH dentro da célula (TAKEKOSHI et al., 1999).

Foi também observado que na ausência de leptina, PMA, um ativador de PKC aumentam a atividade de ERK-1 e ERK-2, demonstrando a ação direta de PKC sobre estas MAPKs. As atividades de ERK-1 e ERK-2 foram completamente bloqueadas pela ação de inibidores de PKC. Por outro lado, a atividade de PKC não é bloqueada por inibidor de PKCs demonstrando que MAPKs estão localizadas abaixo das PKCs nesta cascata de sinalização

Um outra via pelo qual leptina e PMA aumentam a transcrição de genes de TH é por meio da ativação de PKC- ϵ . Esses autores observaram que leptina aumenta significativamente a expressão de PKC- ϵ e AMPc em células cromafins de bovinos cultivadas (TAKEKOSHI et al., 2001). Já foi reportado que essa isoforma de PKC pode ser ativada por AMPc (GRANESS et al., 1997) e é capaz de fosforilar Raf, e essa quinase em seguida ativa ERKs (SÖZERI et al., 1992). Em seguida ERKS translocariam para o núcleo e fosforilariam fatores de transcrição gênica relacionados a TH(TAKEKOSHI et al., 2001).

Portanto, os trabalhos citados acima e no item anterior (item 1.7) mostram claramente que PKCs estão diretamente envolvidas nos processos de síntese e secreção de catecolaminas pelas células cromafins da medula adrenal.

A nossa hipótese é que redução na síntese e secreção de catecolaminas pelas células cromafins durante o DM estão relacionadas com modificações nos processos de sinalização intracelular nessas células. Hipotetizamos também que essa redução na síntese e secreção de catecolaminas é causada pela hiperglicemia.

Para testar essa hipótese usaremos o modelo de DM induzido por STZ em ratos Wistar. Utilizaremos a técnica de imunohistoquímica para fazer análises comparativas da expressão e distribuição de isoformas de PKC em células cromafins da medula adrenal de ratos saudáveis e ratos diabéticos.

Para investigar o efeito do DM/hiperglicemia sobre a expressão de PKCs faremos comparações entre animais diabéticos hiperglicêmicos e diabéticos com glicemia controlada fazendo a quantificação dessas proteínas por Western Blot.

Com esses estudos pretendemos estabelecer um panorama mais completo sobre o efeito do DM sobre a fisiologia das células cromafins, contribuindo para uma maior compreensão dos problemas de contra-regulação dos níveis glicêmicos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Contribuir para a compreensão do efeito do DM sobre a fisiologia das células cromafins da glândula supra-renal.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o efeito do DM sobre a expressão das isoformas de PKC em células cromafins de ratos diabéticos;
- Determinar se o tratamento de ratos diabéticos com insulina, mantendo os níveis glicêmicos próximos ou dentro da faixa de normoglicemia reverte as modificações causadas pelo DM na expressão das isoformas α , ϵ e ζ de PKC em medula de glândula supra-renal de rato.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos, com 60 dias de idade, provenientes do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os animais foram acondicionados no Biotério Setorial do Departamento de Biologia, em ambiente com temperatura controlada entre $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo de luz definido em 12h de claro (7 às 19h) e 12h de escuro (19h às 7h) e livre acesso a água e ração comercial completa (NuvitalTM, BR). Essa ração era composta por 55% de carboidratos, 22% de proteínas, 4,5% de gorduras e 18,5% de resíduos minerais.

O nosso modelo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora.

3.2 INDUÇÃO DO DIABETES MELLITUS E SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

O DM foi induzido nos animais, após jejum de 12h, pela injeção intravenosa da citotoxina estreptozotocina (STZ) diluída em tampão citrato 0,05M na dose de 50mg por Kg de massa do animal. O grupo controle recebeu apenas injeção de tampão citrato sem STZ.

Os experimentos realizados durante esse trabalho seguiram o cronograma representado na figura 4. O dia em que o DM foi induzido nos animais foi denominado de dia zero. No dia 2, era verificada a eficiência da indução da doença por meio da mensuração da glicemia capilar de jejum dos animais. Para tal, os ratos foram submetidos a jejum prévio de 10 horas. Para mensuração da glicemia foi utilizado glucômetro clínico que usa como princípio o método da glicose oxidase (BERGMEYER e BERNT, 1974).

Nesse trabalho todos os animais controles apresentaram glicemia de jejum entre 60 a 100mg/dl. Todos os animais diabéticos incluídos no trabalho apresentaram glicemia de jejum acima de 250mg/dl. Os animais que não estavam dentro deste padrão estabelecido foram descartados do estudo.

Entre o dia 2 e o dia 14 do experimento os animais foram submetidos a diferentes tratamentos de acordo com o grupo experimental a que pertenciam.

No dia 15, último dia do experimento, os animais foram sacrificados por concussão cerebral. Após o sacrifício, os ratos foram adrenalectomizados e as glândulas foram imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido.

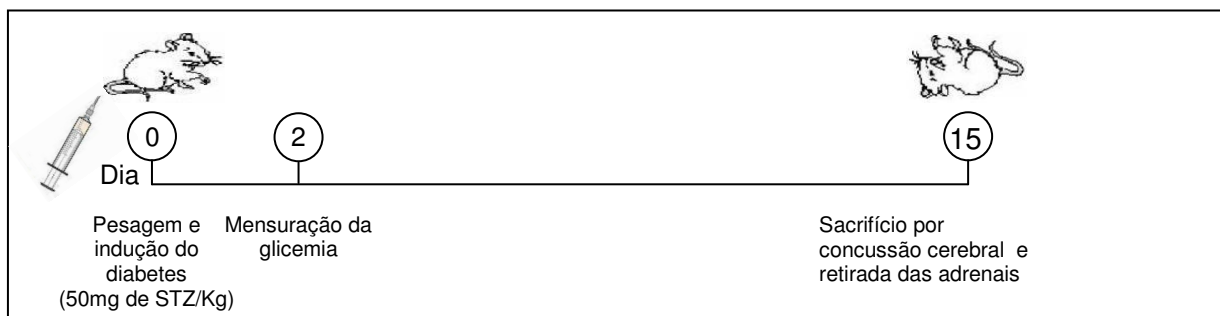


Figura 4 – Organização cronológica entre a indução do diabetes e sacrifício dos animais.

3.3 ESTABELECIMENTO DO PROTOCOLO DE TRATAMENTO DE RATOS DIABÉTICOS POR ADMINISTRAÇÃO DE INSULINA NPH HUMANA

O controle dos níveis glicêmicos dos ratos diabéticos foi feito por meio de injeções subcutâneas de insulina NPH humana exógena. O objetivo desse tratamento foi manter a glicemia desses animais o mais próximo possível da normoglicemia durante as 24 horas do dia.

Para alcançar esse objetivo analisamos o padrão de variação dos níveis glicêmicos e o comportamento alimentar de ratos Wistar durante as 24 horas do dia. Essas informações foram relevantes para a estipulação dos horários e a dose de insulina a ser administrada nos animais.

3.43.3.1 O COMPORTAMENTO ALIMENTAR E VARIAÇÃO DOS NÍVEIS GLICÊMICOS DE RATOS DURANTE AS 24 HORAS DO DIA

O estudo da variação dos níveis glicêmicos e padrão do comportamento alimentar de ratos Wistar durante as 24 horas do dia foram realizados dois dias após o DM ser induzido nos animais. Tanto as variações dos níveis glicêmicos quanto das

taxas de ingestão foram medidos de hora em hora. A ingestão de alimento foi medida pesando a ração e a glicemia, como dito anteriormente, foi medida utilizando-se glucômetro clínico.

3.3.2 TRATAMENTO DE RATOS DIABÉTICOS POR INSULINA NPH HUMANA

Inicialmente foi determinado para o tratamento dos ratos diabéticos a administração de 4U de insulina NPH humana ao dia, em acordo com os resultados encontrados nos estudos da variação dos níveis glicêmicos e do padrão do comportamento alimentar de ratos (item 3.3.1). Uma unidade de insulina foi injetada às 10h e 13h e as 2 unidades restantes às 19h. A glicemia foi medida todos os dias às 10h, 13h e 19h, imediatamente antes da injeção de insulina.

Ao longo do tratamento, em média a cada 3 dias, essa dose diária de insulina foi ajustada de acordo com as glicemias de cada indivíduo. Após testarmos a eficiência de diferentes doses e fracionamentos de insulina NPH em manter os níveis glicêmicos dos animais o mais próximo possível da normoglicemia, propomos que a dose diária de insulina com a qual os animais apresentaram melhor controle glicêmico foi de 5U/dia, sendo 1U aplicada às 13h e as 4U restantes às 19h. Esse foi o protocolo utilizado para o tratamento dos animais.

Realizamos em seguida, um experimento no qual os animais foram tratados com o esquema de tratamento proposto. Nesse experimento a glicemia foi medida 5 vezes ao longo de todo o tratamento, sempre às 19h, com exceção para o dia 15. Nesse dia, a glicemia foi mensurada às 8h, estando os animais com 10 horas de jejum.

3.3.3 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO TRATAMENTO DO DIABETES MELLITUS

Para verificar a eficácia do tratamento do DM pelo esquema de insulinoterapia proposto comparamos o ganho de massa corporal, a glicemia capilar de jejum, os níveis plasmáticos de frutossamina, triglicerídios, colesterol total, colesterol HDL (c-HDL), colesterol LDL (c-LDL) e colesterol VLDL (c-VLDL) entre os

animais controles, ratos diabéticos tratados com insulina (DTI) e ratos diabéticos tratados com salina (DTS) (figura 5).

Nos horários em que os DTI receberam injeções de insulina NPH (1U às 13h e 4U às 19h) os ratos DTS receberam injeções com volume semelhante de solução salina e os ratos controles receberam agulhadas sem injeção de qualquer substância.

Todos os animais foram pesados no dia da indução do DM (dia zero) e no último dia do experimento (dia 15). Para obtermos o dado referente ao ganho de massa corporal de cada rato subtraímos o valor da massa corporal obtido no dia 15 do valor obtido no dia zero.

A glicemia capilar de jejum foi mensurada nos dias 2 e 15 do experimento. Para tal os animais foram submetidos previamente a 10 horas de jejum. A mensuração da glicemia no dia 2 teve como objetivo selecionar os ratos que foram tratados com STZ que apresentavam glicemia de jejum acima de 250mg/dl. No dia 15, a mensuração da glicemia constituiu um dado para avaliação da eficácia do tratamento com insulina.

Imediatamente após o sacrifício, sangue da artéria aorta foi coletado e armazenado em tubos específicos para coleta de soro (VACUETTE[®], BR). O soro foi utilizado para a análise dos parâmetros bioquímicos frutossamina, triglicerídios, colesterol total e c-HDL por meio de conjunto diagnóstico (Gold Analisa Diagnóstica Ltda, BR).

Dentre os animais do grupo DTI, foram analisados apenas o soro dos ratos que apresentaram glicemia capilar de jejum entre 60 e 150mg/dl ao final da insulinoterapia (dia 15 do experimento).

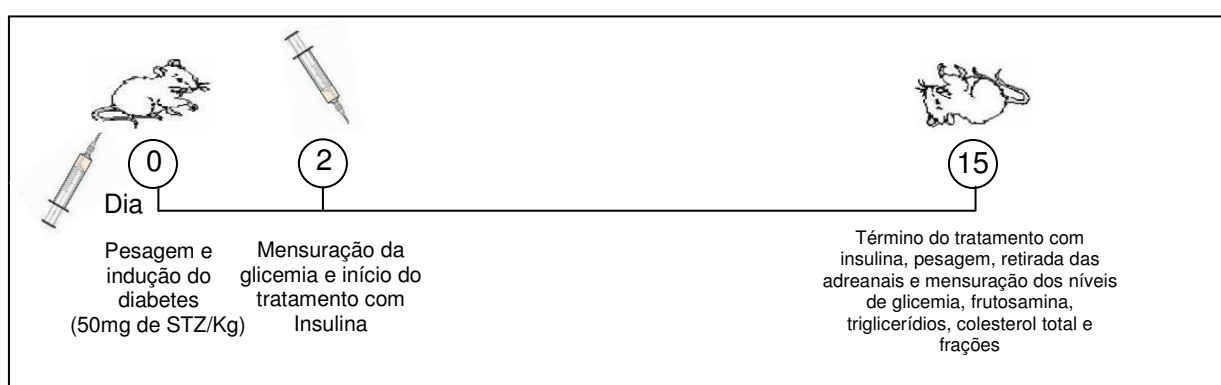


Figura 5 – Cronograma do tratamento de ratos diabéticos com insulina e procedimentos ao final do tratamento para verificar a eficácia da insulinoterapia.

Os níveis de frutossamina séricos foram determinados pelo método cinético-colorimétrico. Esse método é baseado na reação de redução do sal azul de nitrotetrazólio pela frutossamina enólica em pH alcalino com formação de um precipitado púrpura denominado formazan. A velocidade de formação do formazan em uma determinada temperatura é proporcional à concentração sérica de proteínas glicadas (BAKER et al., 1985). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/l}$.

A concentração sérica de triglicerídios (FOSSATI e PRENCIPE, 1982) colesterol total (SVENSSON et al, 1982) e c-HDL (KIMBERLY et al., 1999) foram determinadas por métodos enzimáticos-colorimétricos que tem em comum a etapa final na qual é produzida uma quinonimina de cor vermelha cuja absorbância medida a 500 nanômetros é diretamente proporcional à concentração do lipídio que está sendo mensurado. Os resultados foram expressos em mg/dl.

Os níveis séricos do c-VLDL e c-LDL foram calculados pela fórmula de Friedewald (FRIEDEWALD, LEVY e FREDRICKSON, 1972) :

$$C_{\text{LDL}} = C_{\text{total}} - C_{\text{HDL}} - \frac{\text{Triglicerídeos}}{5}$$

sendo que

$$C_{\text{VLDL}} = \frac{\text{Triglicerídeos}}{5}$$

Os resultados foram expressos em mg/dl.

3.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS ISOFORMAS DE PROTEÍNA QUINASE C POR IMUNOHISTOQUÍMICA

3.4.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Trabalhamos com dois grupos experimentais: ratos diabéticos com DM induzido por STZ (DTS) e ratos controles (C). A formação dos grupos experimentais foi realizada de acordo com o protocolo descrito no item 3.2.

Esse estudo teve como objetivos avaliar a expressão de isoformas de proteína quinase C em ratos controles e também avaliar o efeito da doença 15 dias após a sua indução.



Figura 6 – Cronograma do experimentos realizados para estudo da expressão de PKC por imunohistoquímica.

3.4.2 TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS ISOFORMAS A, E E Z DE PROTEÍNA QUINASE C

Foram estudadas a expressão das isoformas alfa, épsilon e zeta, já descritas em células cromafins bovinas (SENA et al., 1996; YANAGITA et al., 2000).

No momento da preparação do material, as glândulas foram emblocadas em OCT (*optical cutting temperature*) e mergulhadas em nitrogênio líquido. Após 15 minutos, as glândulas foram submetidas a corte semi-seriado de 4 μm em criostato a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após os cortes, as lâminas foram mergulhadas em acetona gelada por 20 segundos para a fixação do material.

Para o tratamento com anticorpos, os cortes histológicos foram submetidos à fixação com metanol 100% por 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após a fixação e lavagem com tampão fosfato (PBS), foi realizado o bloqueio das ligações inespecíficas tratando as lâminas com PBS com 3% de albumina, por 15 minutos. Logo após, as lâminas foram novamente lavadas com PBS e se iniciou o tratamento com anticorpos.

Foram utilizados anticorpos mono-específicos para cada uma das isoformas de PKC (anti-mouse monoclonal, Transduction Laboratories, USA). Estes anticorpos foram diluídos em PBS com 1% de albumina em diluições entre 1:50 e 1:65. O tratamento com o primeiro anticorpo durou entre 15 e 17 horas, em câmara úmida a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após este período, as lâminas foram lavadas com PBS e submetidas ao tratamento com o segundo anticorpo associados a rodamina (goat anti-mouse, Santa Cruz Biotechnology, USA). A exemplo do primeiro anticorpo, estes foram diluídos em PBS com 1% de albumina, em proporções entre 1:35 e 1:60.

O tratamento com o segundo anticorpo foi por uma hora, a 37 °C. Ao fim do tratamento com o segundo anticorpo, as lâminas foram lavadas com PBS, os cortes foram cobertos com solução de Dabco (para reduzir o decaimento da fluorescência) e lamínula, e armazenadas a 4 °C. Após 24 horas, as lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência.

A análise da expressão e distribuição intracelular das três isoformas de PKC (α , ϵ e ζ) e o efeito do DM sobre essas proteínas foram feitas em microscópio de fluorescência (Olympus, BX60, Japão) por três pessoas. Ao realizar a análise a pessoa não tinha o conhecimento prévio de qual grupo experimental o material pertencia e também não sabia os resultados obtidos pelos demais

Em todos os experimentos foi feito um controle negativo que consistia em lâminas que não foram tratadas com o primeiro anticorpo. Estas foram recobertas somente com PBS e albumina 1%. Os demais passos foram exatamente os mesmos aos quais as outras lâminas foram submetidas.

3.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS ISOFORMAS α , ϵ E ζ DE PKC POR WESTERN BLOT

3.5.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Trabalhamos com três grupos experimentais: 1) animais controles (C); 2) animais diabéticos por STZ tratados com insulina (DTI) e 3) animais diabéticos por STZ que foram tratados com solução salina (DTS).

Os grupos experimentais foram estabelecidos de acordo com os padrões glicêmicos previamente determinados (item 3.2). Com relação ao grupo DTI, como dito no item 3.3.3, foram incluídos apenas os animais diabéticos que apresentaram glicemia de jejum de 60 a 150mg/dl ao final da insulinoterapia (dia 15 do experimento).

O tratamento dos ratos do grupo DTI foi realizado de acordo com o protocolo descrito no item 3.3.2. Dessa forma, a insulinoterapia consistiu em injeções subcutâneas de insulina NPH humana na dose de 5U/dia, sendo que 1U era aplicada às 13h e 4U às 19h. O tratamento era iniciado no segundo dia do experimento. No 14^o dia do experimento, último dia do tratamento, no horário das

19h apenas 2U de insulina eram aplicadas nos animais. A dose de insulina era reduzida devido ao jejum a que os animais seriam submetidos a partir das 22h.

Nos horários em que os DTI receberam injeções de insulina NPH (1U às 13h e 4U às 19h) os ratos DTS receberam injeções com volume semelhante de solução salina e os ratos controles receberam agulhadas, porém sem ser injetado qualquer substância.

No 15º dia do experimento os animais eram pesados e a glicemia de jejum era medida. A glicemia de jejum era verificada sempre às 8h da manhã, horário em que os animais completavam 10 horas de jejum. Em seguida os ratos eram sacrificados por concussão cerebral. Imediatamente após o sacrifício, as glândulas adrenais eram retiradas. Dentre os animais do grupo DTI, foram utilizadas para as etapas seguintes do estudo apenas as glândulas adrenais dos ratos que apresentaram glicemia capilar de jejum entre 60 e 150mg/dL ao final da insulinoterapia.

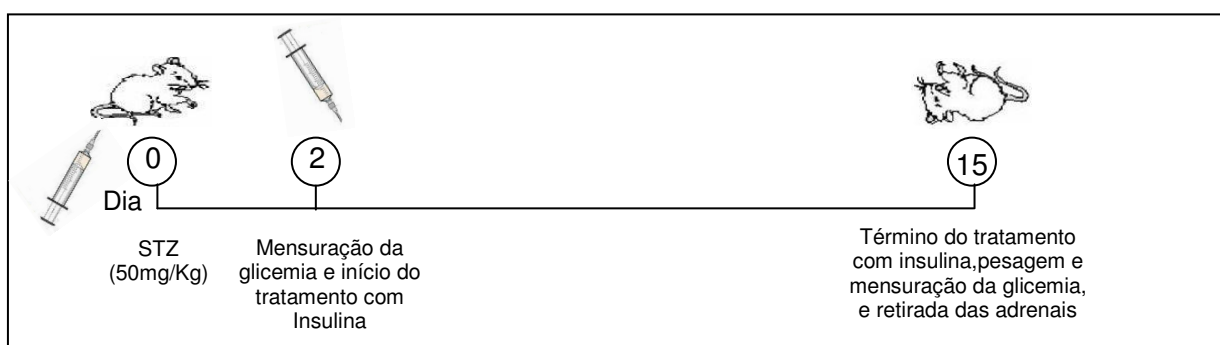


Figura 7 – Organização cronológica do tratamento de ratos diabéticos com insulina.

3.5.2 TÉCNICA DE WESTERN BLOT PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE ISOFORMAS DE PROTEÍNA QUINASE C

Após a coleta, as glândulas adrenais direitas e esquerdas tiveram as medulas dissecadas com auxílio de lupa estereoscópica e instrumentos cirúrgicos oftalmológicos. Durante a dissecação as glândulas adrenais foram mantidas resfriadas em banho de gelo. Após a dissecação as medulas foram armazenadas em eppendorf contendo 50µL de PBS 0,1M (pH 7,4) contendo ortovanadato de sódio (2mM) e coquetel de inibidores de proteases. Em seguida as células que compõem a medula foram lisadas por 10 ciclos de congelamento/descongelamento utilizando

nitrogênio líquido. Posteriormente as células foram maceradas com auxílio de bastão de vidro.

Os homogenatos foram centrifugados por 10000 rpms durante 15 minutos. As proteínas totais do sobrenadante foram determinadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Em seguida as amostras foram solubilizadas em tampão SDS (dodecil sulfato de sódio) desnaturante juntamente com β -mercaptoetanol e aquecidas a 95°C por cinco minutos para desnaturação.

As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE). Para as três isoformas de PKC em estudo (α , ζ e ϵ) foram utilizados 100 μ g de proteína por poço do gel. Em todos os experimentos, um poço do gel foi preenchido por 5 μ g de padrão de massa molecular pré-corado (Amersham Biosciences, UK). As proteínas separadas no gel foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond P, Amersham Bioscience, UK) nas quais realizamos os tratamentos com anticorpos específicos.

Para inibir ligações inespecíficas dos anticorpos, as membranas foram incubadas em tampão Tris (TBS, pH 7.6) acrescido de 5% de leite em pó por 1h e 30min em temperatura ambiente sob agitação constante. Posteriormente as membranas foram lavadas três vezes por cinco minutos com TBS.

Em seguida as membranas foram incubadas com o anticorpo primário específico para cada isoforma específica em estudo (anti-mouse monoclonal, Transduction Laboratories, USA) na diluição de 1:1000 em TBS contendo 0,5% de leite em pó. O tempo de incubação para o 1º anticorpo foi de aproximadamente 16h (overnight), sob agitação constante. Após esse período, as membranas foram novamente lavadas três vezes por cinco minutos com TBS.

Em seguida as membranas foram incubadas por 2h com anticorpo secundário (goat anti-mouse, Santa Cruz Biotechnology, USA) conjugado à peroxidase, na diluição de 1:1000 em TBS contendo 0,5% de leite em pó.

Após mais um seqüência de lavagens, as membranas foram tratadas com solução ECL (Kit ECL plus, Amersham Biosciences) por 1min seguido de exposição ao filme autoradiográfico (Hyperfil ECL, Amersham Biosciences) por 30min. Os filmes contendo as bandas protéicas foram digitalizadas e a avaliação/quantificação foi feita com auxílio do programa Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD).

Os reagentes que não tiveram sua origem citada eram da Sigma-Aldrich, USA.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Os dados foram analisados pelo programa estatístico GraphPad Prism 4. A significância foi testada pelo *teste T de student*, sendo os resultados considerados estatisticamente significantes quando $p < 0.05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.84.1 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA INDUÇÃO DO DIABETES MELLITUS UTILIZANDO A CITOTOXINA ESTREPTOZOTOCINA

A glicemia é o principal parâmetro para avaliar a eficiência do procedimento de indução do DM com STZ. Em nosso trabalho a glicemia foi verificada dois dias após a injeção de STZ (dia 2 do experimento), sempre às 10 horas da manhã, com jejum prévio. A glicemia determinou a inclusão, ou não, dos animais nos grupos experimentais diabéticos tratados com salina (DTS) ou diabéticos tratados com insulina (DTI). Para integrar qualquer um desses dois grupos experimentais os ratos deveriam apresentar glicemia de jejum superior a 250mg/dl. A figura 8 mostra as médias dos níveis glicêmicos obtidos 2 dias após a indução do DM nos três grupos experimentais. Nos ratos controles foi injetado apenas tampão citrato sem STZ.

Atualmente as duas substâncias químicas mais utilizadas para induzir o DM em ratos são a STZ e a aloxana. Essas drogas possuem ação diabetogênica devido à capacidade de destruir as células β pancreáticas (SZKUDELSKI, 2001).

O mecanismo de ação da aloxana envolve a formação de peróxido de hidrogênio, que posteriormente é convertido a radicais hidroxilas altamente reativos. A ação dessas espécies reativas de oxigênio causa rápida fragmentação do DNA, concomitantemente ocorre um aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} devido à entrada de Ca^{2+} do meio extracelular e mobilização dos estoques intracelulares do íon. Esses eventos determinam a rápida destruição das células β pancreáticas por necrose (SZKUDELSKI, 2001).

A especificidade de ação da aloxana sobre as células β do pâncreas não é satisfatória. Foi reportado que alterações na atividade da glutathione peroxidase no fígado e insulinemia, sem redução da glicemia, dois minutos após a administração da droga, o que sugere redução da sensibilidade periférica à insulina. Essas modificações provavelmente não são conseqüências do dano causado apenas pela ação da aloxana nas células β do pâncreas, e sim pela ação direta da droga em outros tecidos (SZKUDELSKI, KANDULSKAE e OKULICZ, 1998). Já foi observado que a aloxana, quando injetada na dose de 50mg/Kg de massa corporal de ratos

Wistar jovens (30 a 60 dias de vida), pode causar deficiência no crescimento, desenvolvimento de catarata e tornar os animais suscetíveis a infecções intestinais e pulmonares oportunistas graves podendo causar a morte dos animais (KOREC, 1989).

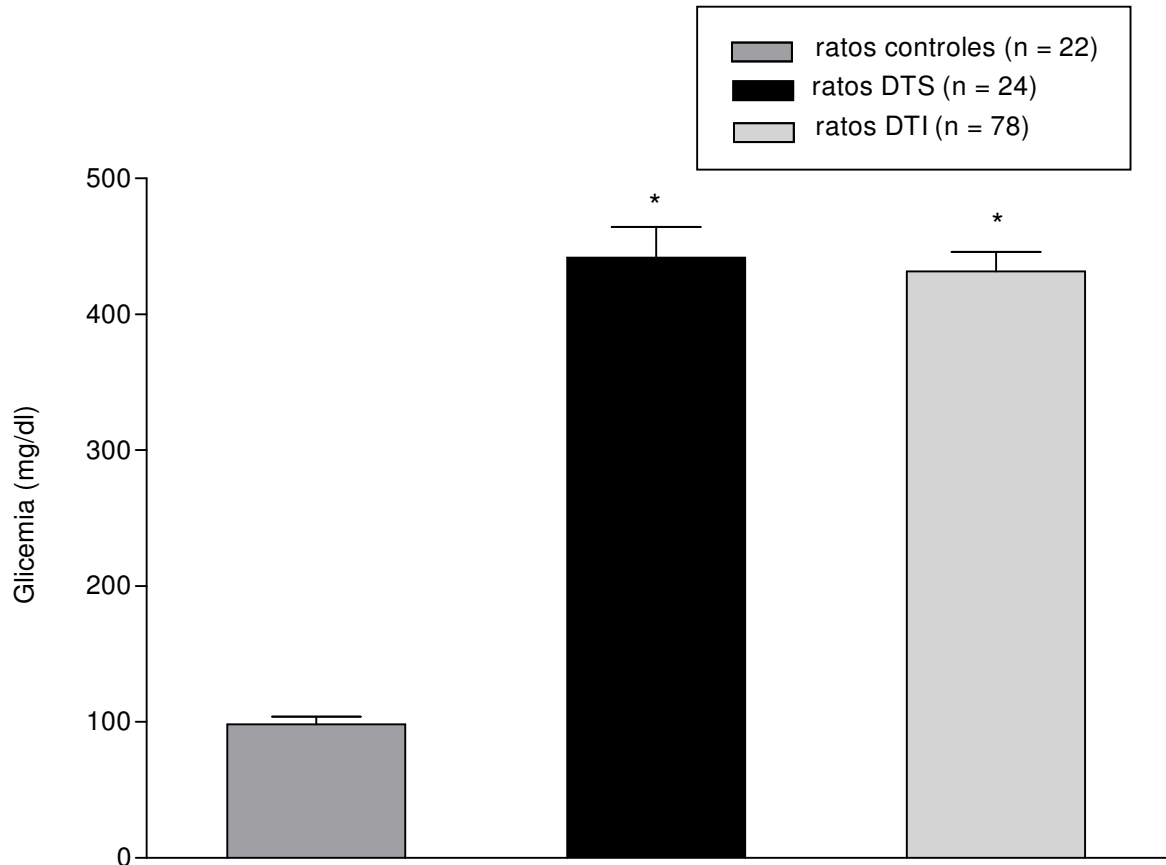


Figura 8: Efeito do tratamento de ratos Wistar com estreptozotocina (50mg/Kg de massa corporal do animal) sobre os níveis glicêmicos de jejum dois dias após a injeção da citotoxina. As barras verticais representam o EPM. * $p < 0,05$ em comparação aos animais controles.

A toxina 2-deoxi-2(3-(metil-3-nitrosureia)-D-glicopiranosose, denominada de estreptozotocina (STZ) é sintetizada pelo *Streptomyces achromogenes* (SZKUDELSKI, 2001). A STZ é considerada uma substância análoga ao monossacarídeo N-acetilglicosamina (GlcNAc) (LIU et al., 2000; KONRAD et al., 2001). Foi reportado que a toxicidade da STZ está relacionada com a inibição da enzima 0-GlcNAcase (N-acetil-D-glicosaminidase) que remove GlcNAc ligadas a proteínas (LIU et al., 2000). O aumento dos níveis intracelulares de proteínas modificadas por GlcNAc resulta na morte celular por apoptose causada por alterações no funcionamento de fatores de transcrição gênica e também pelo aumento da concentração intracelular de proteínas envolvidas no processo de

apoptose, devido à redução da degradação dessas proteínas pelo proteossoma (KONRAD et al., 2001).

Outros mecanismos diabetogênicos da STZ são a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) que provocam danos ao DNA e às mitocôndrias. A STZ atua como uma substância doadora de óxido nítrico (NO) devido à liberação de uma molécula de NO presente na porção N-metil-N-nitrosuréia (MNU) da STZ (SZKUDELSKI, 2001). Porém, foi demonstrado que o efeito diabetogênico da droga não foi preservado *in vivo* quando apenas a porção MNU foi administrada (WILSON e LEITER, 1990).

As células β do pâncreas são especificamente sensíveis à ação da STZ porque expressam elevada concentração da enzima responsável pela transferência do 0-GlcNAc para proteínas (OGT), além disso a enzima 0-GlcNAcase expressada por essas células são mais sensíveis à inibição pela STZ do que as expressadas em outros tipos celulares (KONRAD et al., 2001).

Optamos pela utilização da STZ para realização do nosso trabalho devido a sua maior especificidade sobre as células β pancreáticas quando comparada a aloxana.

Dos 136 ratos submetidos a injeção de STZ (na dose de 50mg/Kg de massa corporal do animal) para a realização desse trabalho, 122 (89,7%) desenvolveram o DM com glicemia acima de 250mg/dl sendo portanto utilizados em nossas pesquisas. Apenas 11 animais (8,1%) desenvolveram a doença com gravidade mais leve que o desejado, ou seja, apresentaram glicemia abaixo de 250mg/dl. Esses animais foram excluídos dos experimentos. Ao longo de todo o trabalho, apenas 3 animais (2,2%) morreram após o procedimento de indução da doença, provavelmente devido à hiperglicemia.

Portanto, podemos concluir que o tratamento dos animais com a citotoxina STZ foi eficiente em induzir o DM/hiperglicemia nos animais e o descarte de animais devido à glicemia inferior ao desejado, 250mg/dl, ou perdas devido à morte foram baixas.

4.2 TRATAMENTO DE RATOS DIABÉTICOS UTILIZANDO INSULINA NPH EXÓGENA

4.2.1 COMPORTAMENTO ALIMENTAR E VARIAÇÃO DOS NÍVEIS GLICÊMICOS DE RATOS CONTROLES E DIABÉTICOS

Para estabelecer um protocolo de tratamento para ratos Wistar diabéticos por injeção de STZ utilizando injeções subcutâneas de insulina exógena sentimos a necessidade de estudar o comportamento alimentar e a variação dos níveis glicêmicos de ratos Wistar normais (figura 9 A) e diabéticos (figura 9 B) durante as 24 horas do dia.

Com relação ao comportamento alimentar, verificamos que após dois dias do tratamento com STZ os ratos Wistar diabéticos tendem a ingerir maior quantidade de ração quando comparados a ratos Wistar controles. Enquanto os ratos diabéticos ingeriram em média $22,38 \pm 0,84$ g/dia os ratos controles ingeriram em média $20,93 \pm 0,99$ g/dia (figura 10). Porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Pal, Pal e Madanmohan (2002), reportaram que ratos Wistar machos com DM induzido por dose única de 75mg/Kg de STZ e livre acesso à comida, ingeriram $18,24 \pm 0,27$ g/dia enquanto os ratos normais ingeriram $14,30 \pm 0,26$ g/dia. Essas diferenças também não foram estatisticamente significativas.

Comparando os nossos resultados com os encontrados por Pal, Pal e Madanmohan (2002), a maior fagia exibida pelos nossos animais pode ser explicada pela forma de acondicionamento dos ratos. Nós mantivemos três ratos por gaiola enquanto eles acondicionaram cada rato isoladamente, além disso nós adotamos um ciclo de claro e escuro de 12h com a fase clara de 7 às 19h e a fase escura de 19 às 7h enquanto eles utilizaram o ciclo de iluminação natural. Esses fatores influenciam o padrão de alimentação dos animais (DEMARIA-PESCE e NICOLAIDIS, 1998). A idade dos animais utilizados e o tempo decorrido de DM no momento da realização dos experimentos também influenciam nessa diferença, porém esses dados não foram mencionados no trabalho de Pal et al. (2002).

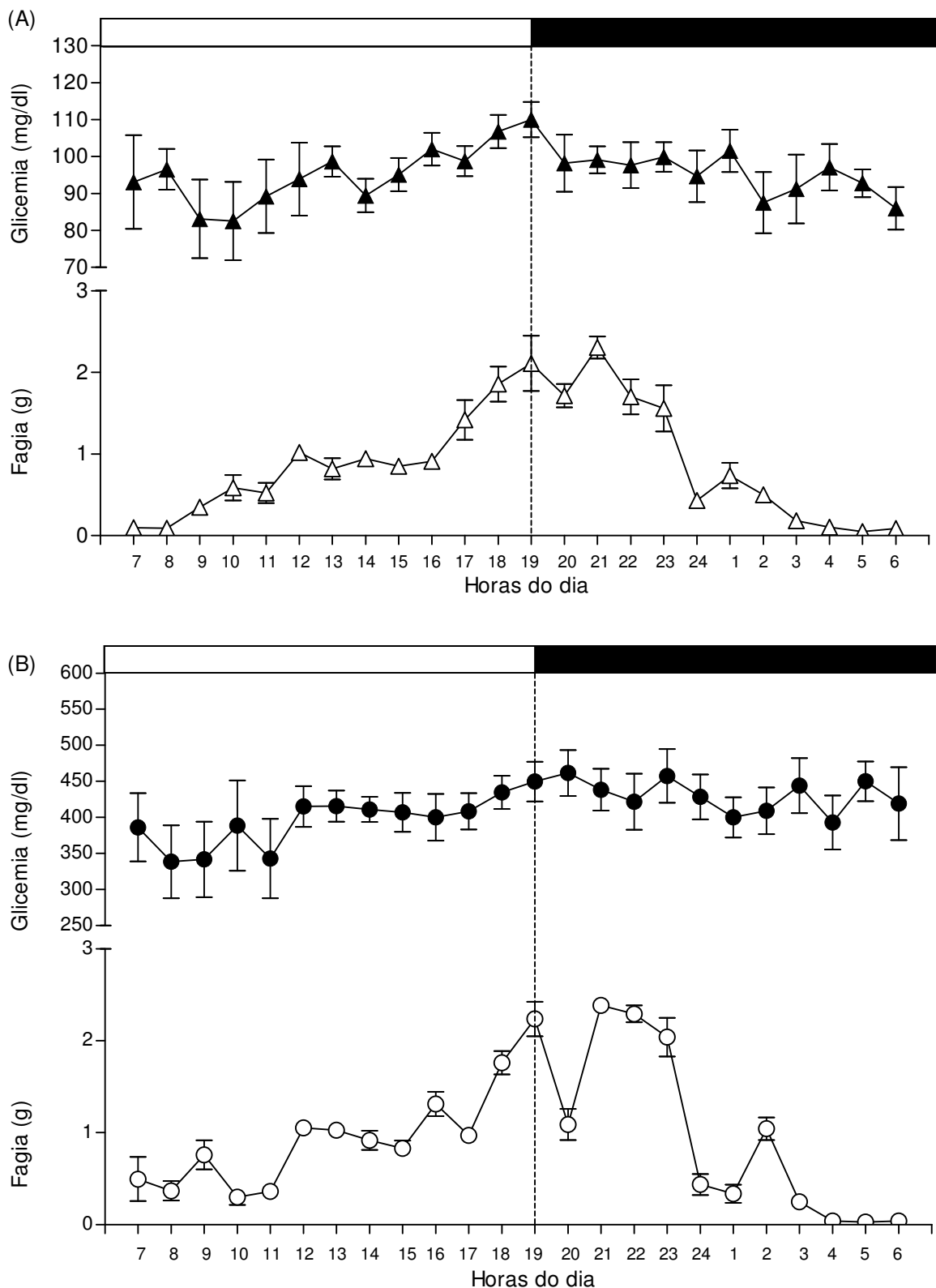


Figura 9: Variação glicêmica e alimentar de ratos Wistar controles e diabéticos durante 24 horas. Em (A) estão representados a variação glicêmica e alimentar ($n = 9$) dos ratos controles. Em (B) estão representados a variação glicêmica ($n = 10$) e alimentar ($n = 12$) dos ratos diabéticos. No topo da figura está indicado o fotoperíodo: a barra branca representa a fase clara e a barra preta representa a fase escura. A linha vertical tracejada indica a mudança de fotoperíodo, de claro para escuro. As linhas verticais representam o EPM.

Vários trabalhos mostram que ratos diabéticos por injeção de STZ apresentam aumento significativo na ingestão de ração quando comparados aos ratos normais (BOOTH, 1972; CASTRO e BALAGURA, 1975; SHIMONURA et al., 1990; PLAZA, GRANDA e CACHERO, 1993). Essa condição é denominada de hiperfagia (BOOTH, 1972).

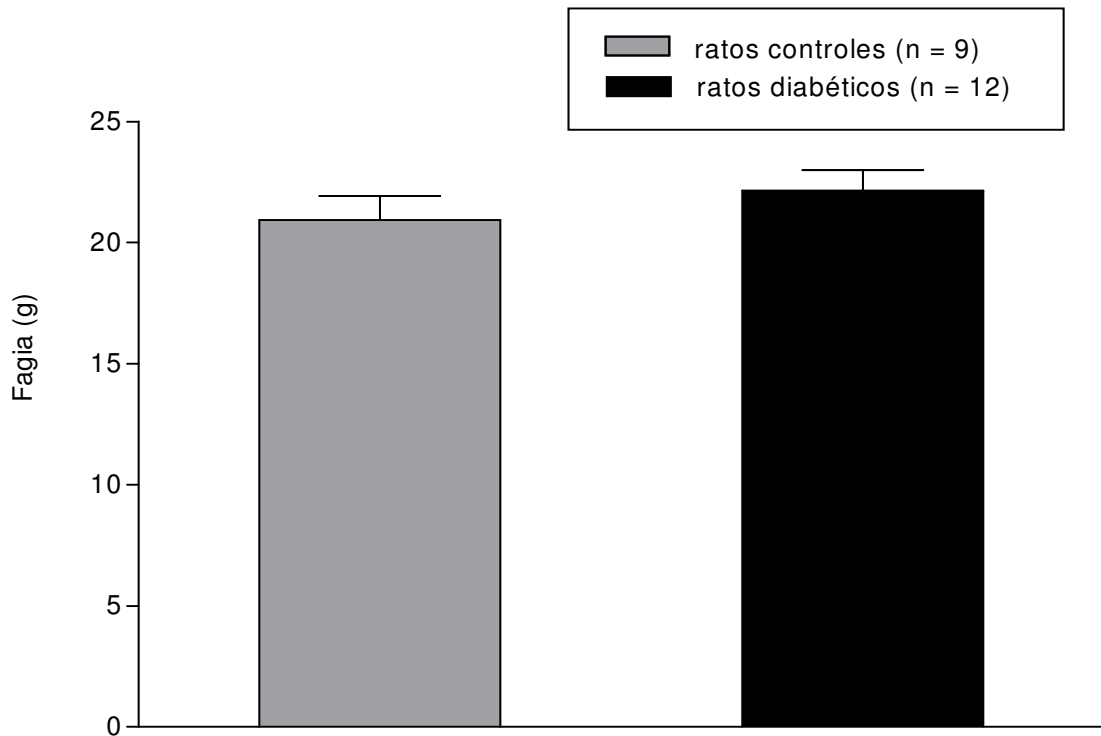


Figura 10: Ingestão de ração durante 24 horas consecutivas por ratos Wistar normais e diabéticos. A linha vertical representa o EPM.

Booth, (1972) relatou que em ratos Spreague Dawley que foram injetados com 50mg ou mais de STZ por quilograma de peso do animal, a ingestão de ração foi moderadamente deprimida a partir do primeiro dia após injeção de STZ e então estabilizou aos níveis de pré-injeção no segundo e terceiro dias após a injeção. Ingestão de ração acima dos níveis da pré-injeção foram detectados apenas a partir do quarto ao sexto dia após o tratamento dos animais com STZ.

Os nossos experimentos foram realizados no segundo dia após a indução do DM e não foi detectado aumento estatisticamente significativo na ingestão de alimento. Portanto, nossos resultados corroboram os resultados dos experimentos de Booth, (1972). Porém, uma diferença importante entre o nosso trabalho e o trabalho realizado por Booth é a linhagem de rato utilizado, nós utilizamos ratos

Wistar enquanto ele utilizou ratos da linhagem Sprague Dawley. Já foi reportado que o comportamento alimentar pode diferir entre as várias linhagens de ratos de laboratório (GLENDINNING e SMITH, 1994).

Trabalhos que mostram aumentos significativos na ingestão de alimento por ratos diabéticos em relação a animais sadios geralmente avaliam esse parâmetro vários dias após a indução do DM. Plaza, Granda e Cachero, (1993) reportaram que ratos Wistar diabéticos por STZ (45mg/Kg do animal) apresentaram aumento significativo de 1,8 vezes na quantidade de ração ingerida quando comparados aos animais controles, após 35 dias da indução da doença. Shimomura et al (1990) verificou aumento significativo na ingestão de ração por ratos Wistar diabéticos por STZ (60mg/Kg do animal) quando comparado aos animais sadios 30 dias após a indução do DM.

Sugerimos então, que o prazo de tempo de apenas 2 dias entre a indução do DM e a realização dos experimentos possa explicar a observação de aumento não significativo da ingestão de ração dos ratos diabéticos em relação aos ratos controles em nossos estudos.

O aumento da ingestão de alimentos em animais diabéticos pode ser explicado pela deficiência grave de insulina nesses animais. Já foi reportado que o aumento da ingestão de alimentos por modelos animais com DM induzido por STZ é devido à diminuição dos níveis séricos de insulina e leptina. Esses hormônios inibem a expressão de neuropeptídeos que estimulam a ingestão de alimento por neurônios que formam o núcleo arqueado hipotalâmico. Insulina e leptina também ativam neurônios adjacentes ao núcleo arqueado que secretam o hormônio estimulador de melanócitos (α -MSH) que reduz o consumo alimentar e aumento do gasto energético (GELLING, 2006)

Apesar do consenso de que ratos diabéticos apresentam aumento da ingestão de alimento, existem divergências quanto ao padrão alimentar exibido pelos ratos doentes. Booth (1972), demonstrou que ratos diabéticos por STZ apresentam refeição, quantidade de alimento ingerido durante a refeição e duração da saciedade marcadamente menor que o apresentado por animais normais enquanto Castro e Balagura (1975), reportaram que após injeção de STZ em ratos, o aumento na alimentação por esses animais é devido à ocorrência de refeições de longa duração. Já foi relatado que ratos Wistar (PLAZA, GRANDA e CACHERO, 1993, DEMARIA-PESCE e NICOLAIDIS, 1998) e Sprague-Dawley sadios (JOHNSON e JOHNSON,

1990) apresentam alimentação predominantemente noturna. Foi observado que ratos Wistar sadios ingerem aproximadamente 84% da alimentação diária durante o período noturno. Ratos diabéticos mantêm o ritmo circadiano de alimentação, porém a proporção entre a ingestão diurna e noturna é diminuída, sendo aproximadamente 60% do consumo alimentar diário ocorre durante a noite (PLAZA, GRANDA e CACHERO, 1993).

Os nossos ratos sadios ingeriram 54,82% da sua alimentação diária durante a fase escura do fotoperíodo enquanto os ratos diabéticos ingeriram 54,62%. Portanto, a proporção de ingestão de ração durante as fases clara e escura do fotoperíodo foram similares tanto para os ratos normais quanto para os ratos diabéticos. Esse resultado pode ser explicado pelo fato dos animais terem sido manipulados de hora em hora durante a realização do experimento.

Portanto, nossos resultados não apontam diferença estatística entre a ingestão de ração entre ratos sadios e diabéticos durante o período de 24 horas consecutivas. Observamos também que a proporção entre a ingestão de ração entre a fase clara e escura do fotoperíodo foram similares.

Para facilitar a análise do comportamento alimentar dos animais, dividimos as 24 horas do dia em grupos de 3 em 3 horas consecutivas (figura 11). Com os dados agrupados, observamos diferenças significativas no comportamento alimentar entre ratos controles e diabéticos nas primeiras 3 horas do da fase clara (7h -9h), devido a maior ingestão de ração pelos ratos diabéticos. Nas últimas 3 horas da fase escura (4h-6h) também houve diferença significativa na ingestão de ração, porém foi devido ao maior consumo de ração pelos ratos controles.

Com relação à glicemia, foi observado que os ratos não diabéticos apresentaram menor variação nos níveis glicêmicos durante as fases clara e escura do fotoperíodo quando comparado aos ratos diabéticos (figura 12). Os ratos normais apresentaram $\Delta = 24,22$ mg/dl durante a fase clara do fotoperíodo e $\Delta = 22,45$ mg/dl durante a fase escura do fotoperíodo. O valor de Δ (delta) foi calculado subtraindo o menor valor de glicemia do maior valor durante cada fase do fotoperíodo. Os ratos diabéticos apresentaram $\Delta = 77,5$ mg/dl durante a fase clara e $\Delta = 68,5$ mg/dl durante a fase escura do fotoperíodo. É importante ressaltar a ocorrência de queda na glicemia tanto dos animais normais quanto dos diabéticos no início da fase clara.

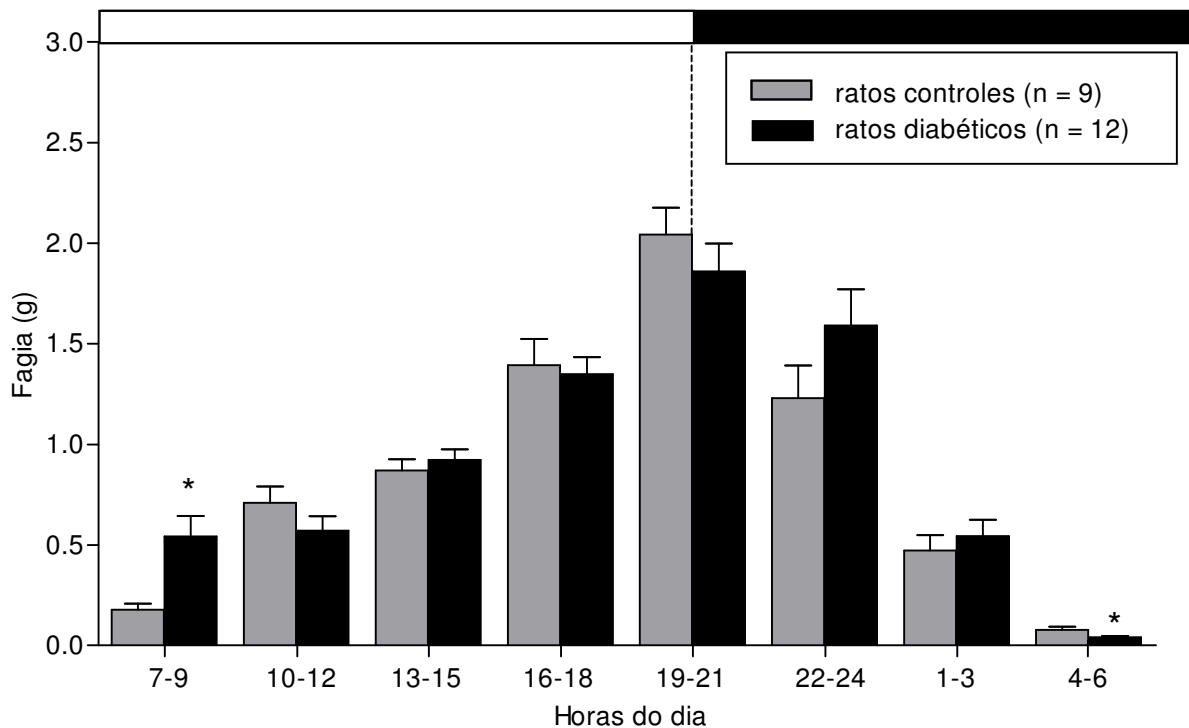


Figura 11: Variação da ingestão de ração por ratos Wistar controles e diabéticos durante o período de 24 horas consecutivas. Os dados foram agrupados em intervalos de 3 em 3 horas. No topo da figura está indicado o fotoperíodo: a barra branca representa a fase clara e a barra preta representa a fase escura. A linha vertical tracejada indica a mudança de fotoperíodo, de claro para escuro. As linhas verticais representam o EPM. * $<0,05$ em comparação aos animais controles.

A figura 9A mostra que a ingestão de ração pelos ratos controles, a despeito de pequena redução que ocorre de 7 às 8h, aumenta continuamente do início ao final da fase clara, conseqüentemente a glicemia desses animais durante a fase clara também apresentou, predominantemente, um padrão de gradual elevação. Aumentos acentuados na ingestão ocorreram ao meio dia e a partir das 16h até o apagar da luz, às 19h. Essa elevação na ingestão se refletiu em um aumento mais acentuado dos níveis glicêmicos dos animais durante esses intervalos de tempo. Apenas uma queda acentuada do nível glicêmico foi vista às 9h e 10h.

Por outro lado, o comportamento alimentar exibido pelos ratos diabéticos (figura 9B), diferente dos ratos controles que durante a fase clara do fotoperíodo apresentaram contínuo aumento da ingestão, foi mais variável, apresentando tanto horários em que a ingestão de ração foi crescente quanto decrescente. Com relação à glicemia, a partir de 12h até as 17h os níveis glicêmicos apresentaram contínua queda, porém sem alterações acentuadas. Variações glicêmicas mais acentuadas durante a fase clara foram vistas do início dessa fase até o meio dia. Durante a fase

escura do fotoperíodo, 19h às 7h, os ratos normais e diabéticos apresentaram dois picos alimentares, o primeiro às 21h nos dois grupos e o segundo à 1h nos animais normais e às 2h nos animais diabéticos. Tanto nos ratos normais quanto nos diabéticos esses dois picos foram separados por um declínio acentuado na ingestão de ração às 24h. Essas oscilações na ingestão de ração refletiram em maiores oscilações nos níveis glicêmicos dos ratos diabéticos do que nos ratos normais. A razão desta variação negativa no consumo alimentar ainda precisa ser investigada.

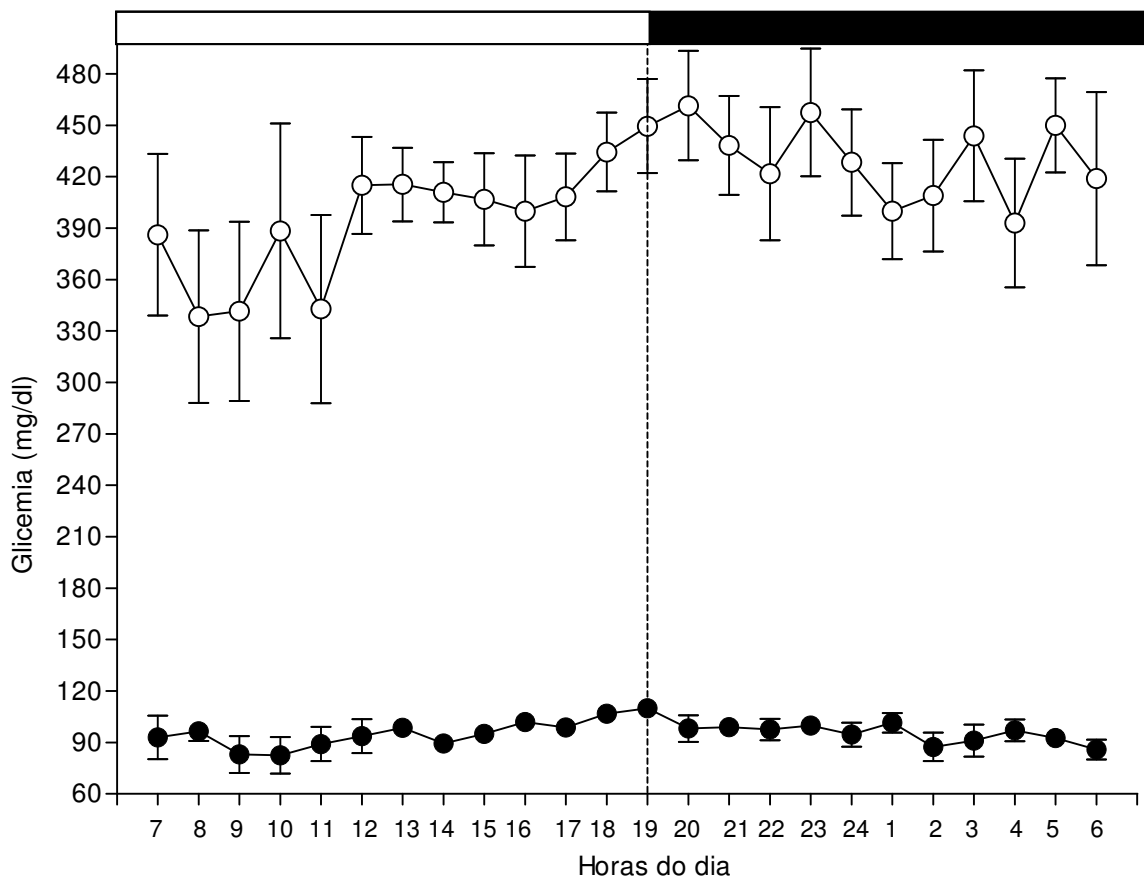


Figura 12: Variação glicêmica de ratos Wistar controles (círculos pretos, n = 9) e diabéticos (círculos brancos, n = 12) durante o período de 24 horas consecutivas. No topo da figura está indicado o fotoperíodo: a barra branca representa a fase clara e a barra preta representa a fase escura. A linha vertical tracejada indica a mudança de fotoperíodo, de claro para escuro. As linhas verticais representam o EPM.

Observamos também que tanto os ratos controles quanto os diabéticos apresentaram uma queda abrupta na ingestão nas quatro últimas horas da fase escura. Os ratos diabéticos elevaram a ingestão logo após o início da fase clara enquanto os ratos normais elevaram a ingestão apenas a partir das 9h.

4.2.2 ESTABELECIMENTO DO TRATAMENTO DE RATOS WISTAR DIABÉTICOS UTILIZANDO INSULINA NPH HUMANA

Inicialmente foram realizados experimentos para investigar a melhor dose e horário para a aplicação de insulina nos animais. Para estabelecer os horários de aplicação de insulina nos animais diabéticos consideramos os horários em que eles ingerem maior quantidade de alimento o que conseqüentemente acentua a hiperglicemia. Esses horários são 13h e 19h. Pela análise do gráfico 9B, observamos que às 12h os animais diabéticos apresentam uma elevação na ingestão de ração e a glicemia nesse horário também aumenta. Porém decidimos injetar insulina às 13h visto que no período de 8 até às 11h ocorrem quedas nos níveis glicêmicos e também na ingestão de ração. A aplicação de insulina às 12h poderia ao longo do tratamento ocasionar episódios de hipoglicemia nos animais devido à proximidade de um período do dia com tendência à redução dos níveis glicêmicos (de 8h às 11h) e também ao efeito residual de aplicações anteriores de insulina. Também devido à observação de quedas na glicemia nos animais diabéticos e controles entre 8 e 11h decidimos verificar a glicemia dos animais nesse intervalo de tempo. Portanto, medimos a glicemia também às 10 horas com o objetivo de verificar se os animais diabéticos desenvolveriam episódios de hipoglicemia em consequência do tratamento com insulina. Por outro lado, a mensuração da glicemia em um período da manhã foi também válido para avaliarmos se a dose de insulina aplicada no período de 19h estava sendo eficaz em impedir a hiperglicemia tanto durante a fase escura, quanto nas primeiras horas da fase clara.

De acordo com os valores de glicemia mensurados, as doses de insulina foram ajustadas ao longo do experimento, conforme a necessidade de cada animal e em média a cada três dias. Percebemos que dentre os ratos tratados houve a formação de grupos de animais que apresentaram tendência a desenvolver episódios de hipoglicemia, normoglicemia ou hiperglicemia quando a mesma dose de insulina era injetada a todos os animais. Isso pode ser explicado por diferenças na quantidade de ração ingerida pelo animal no intervalo de tempo compreendido entre a injeção de insulina e a medição da glicemia, diferenças na sensibilidade dos animais à insulina e à STZ e também devido a imprecisões nas metodologias de

aplicação de insulina e indução do DM nos animais. Portanto, o ideal seria a individualização e ajustes das doses de insulina de acordo com a glicemia de cada animal. Porém, essa prática era inviável para os nossos experimentos, visto que implicaria a manipulação e perfurações frequentes do rato para a medição da glicemia, gerando estresse no animal. Portanto, optamos pelo estabelecimento de uma dosagem de insulina diária constante para todos os animais ao longo do tratamento que mantivesse a maioria dos animais normoglicêmicos ou próximos da normoglicemia. Após testar a eficácia de diferentes dosagens diárias de insulina NPH humana em diversos fracionamentos propomos que a dose diária de insulina que proporcionou melhor controle glicêmico na maioria dos animais foi de 5U de insulina/dia sendo 1U injetada por via subcutânea às 13h e 4U às 19h. Em seguida realizamos um experimento no qual a glicemia dos animais foi medida cinco vezes ao longo de todo o experimento (figura 13).

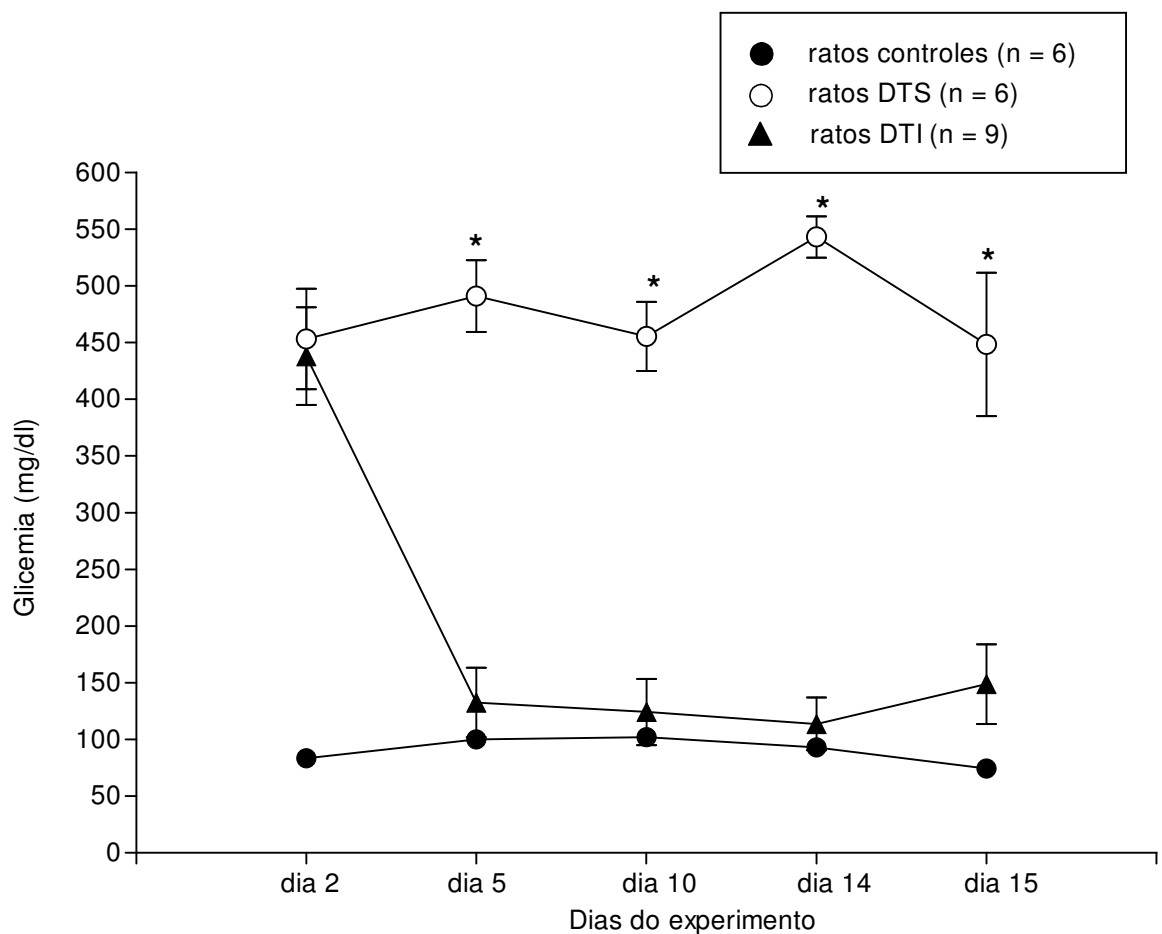


Figura 13: Efeito do tratamento de ratos diabéticos por STZ utilizando 5U de insulina NPH exógena ao dia, sendo 1U injetada às 13h e 4U às 19h. As linhas verticais representam o EPM. * $p < 0,05$ ao comparar com os ratos controles e DTI.

Nesse experimento a glicemia foi mensurada sempre às 19h, exceto para o dia 15 do tratamento, dia que a glicemia foi medida às 8h e com os animais submetidos a 10h de jejum. Como pode ser visto na figura 13, as médias das glicemias dos ratos DTI estão situadas dentro da faixa que consideramos como tolerável para a inclusão dos animais em nossa pesquisa (de 60 a 150mg/dL) durante todo o tratamento: dia 5= 132 ± 30 mg/dl, dia 10= 124 ± 29 mg/dl, dia 14= 113 ± 23 mg/dl e dia 15= 148 ± 35 mg/dl. Portanto, o esquema de insulinoterapia elaborado por nós foi eficaz em manter as médias dos níveis glicêmicos próximo da normoglicemia durante os 15 dias de tratamento.

4.2.3 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO TRATAMENTO DE RATOS WISTAR DIABÉTICOS UTILIZANDO INSULINA NPH HUMANA

Para verificar a eficácia do tratamento com insulina proposto comparamos o ganho de massa corporal, a glicemia capilar e os níveis plasmáticos de frutossamina, triglicerídios, colesterol total, e as frações do colesterol c-HDL (lipoproteínas de alta densidade), c-LDL (lipoproteína de baixa densidade) e c-VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade) entre os três grupos experimentais.

A variação de densidade entre as frações do colesterol depende do teor de lipídico presente nas partículas de lipoproteínas. Cada uma dessas partículas é constituída por um núcleo lipídico, cujo diâmetro é variável, e de uma película de proteína cuja espessura é sempre a mesma e independe do tamanho do núcleo. Assim as proporções entre os teores lipídico e protéico de cada partícula variam com o tamanho das mesmas, sendo que as maiores possuem mais lipídios e as menores mais proteínas. Como a densidade dos lipídios é menor do que a das proteínas, as partículas maiores (mais ricas em lipídios) são menos densas que as menores (mais ricas em proteínas). Portanto, as c-VLDL são as maiores lipoproteínas e as c-HDL são as menores (GUYTON e HALL, 2006).

A frutossamina é o nome genérico dado a todas as proteínas glicadas (glicoproteínas), das quais a maior parte dessas glicoproteínas é albumina. A frutossamina é decorrente de uma modificação não enzimática pós-translacional, dependente dos níveis glicêmicos. A meia vida das proteínas varia entre uma e três

semanas e portanto a frutossamina reflete as concentrações de glicose plasmática dos 20 dias anteriores estando elevada em todos os casos de pacientes diabéticos com tratamento ineficaz nesse período (JOHNSON, METCALF e BARKER, 1983; LIM e STALEY, 1985).

O nível de albumina glicada reflete os níveis de glicemia em ratos com DM induzido por STZ, podendo ser utilizado como um método de avaliação do estado glicêmico nesses animais (NEUMAN, HUD e COHEN, 1994).

Portanto, no último dia do experimento (dia 15) anteriormente ao sacrifício, os ratos foram pesados e sangue capilar da cauda dos animais foi retirado para mensuração da glicemia. Imediatamente após o sacrifício, sangue da artéria aorta foi coletado para a análise dos outros parâmetros bioquímicos (frutossamina, triglicerídios, colesterol total, colesterol c-HDL, c-LDL e c-VLDL). Apenas o sangue dos animais com glicemia entre 60 e 150mg/dl foram utilizados para mensuração desses parâmetros.

Já foi demonstrado que animais diabéticos apresentam menor ganho de massa corporal quando comparados aos animais saudáveis (PATEL, 1983; WILKE e HILLARD, 1994). Os nossos resultados mostraram que os ratos diabéticos tratados com solução salina tiveram variação negativa da massa corporal, emagrecendo em média $9,3 \pm 6,62g$ após 15 dias da indução do DM. Por outro lado, os ratos controles e os ratos diabéticos tratados com insulina apresentaram ganho de massa corporal. Enquanto os ratos não diabéticos engordaram em média $37,4 \pm 3,4g$, os ratos diabéticos tratados com insulina engordaram em média $43,4 \pm 3,24g$ (Figura 14). Portanto, os nossos resultados corroboram com os resultados encontrados previamente (PATEL, 1983; WILKE e HILLARD, 1994).

Apesar de os ratos DTS ingerirem maior quantidade de alimento, como mostrado no item anterior, eles apresentam redução da massa corporal porque não são capazes de utilizar a glicose como fonte energética devido à deficiência de insulina. Conseqüentemente ocorre um aumento na utilização de lipídios e proteínas para a produção de energia, o que reduz a massa muscular e o tecido adiposo do animal, com conseqüente redução da massa corporal (GUYTON e HALL, 2006).

A mensuração da glicemia capilar no dia 15 do experimento determinou quais animais, dentre os ratos tratados com insulina, seriam utilizados para as etapas posteriores do estudo e quais seriam descartados (figura 15). Como dito no item 4.1.1, nos observamos que dentre os animais DTI houve a formação de grupos de

animais que apresentaram tendência a desenvolver episódios hipoglicemia, normoglicemia e hiperglicemia quando a mesma dose de insulina era injetada a todos os animais. Então, com a verificação da glicemia de jejum no dia 15 nós selecionamos apenas os animais que apresentaram tendência a normoglicemia, ou seja, que responderam satisfatoriamente ao tratamento com insulina. O nosso grupo experimental DTI foi constituído apenas por ratos diabéticos que foram tratados com insulina que apresentaram glicemia capilar entre 60 a 150mg/dl. Os animais que não estavam dentro desse padrão estabelecido, foram descartados do estudo. A figura 15 mostra as médias dos níveis glicêmicos dos três grupos experimentais obtidos após os 15 dias de tratamento.

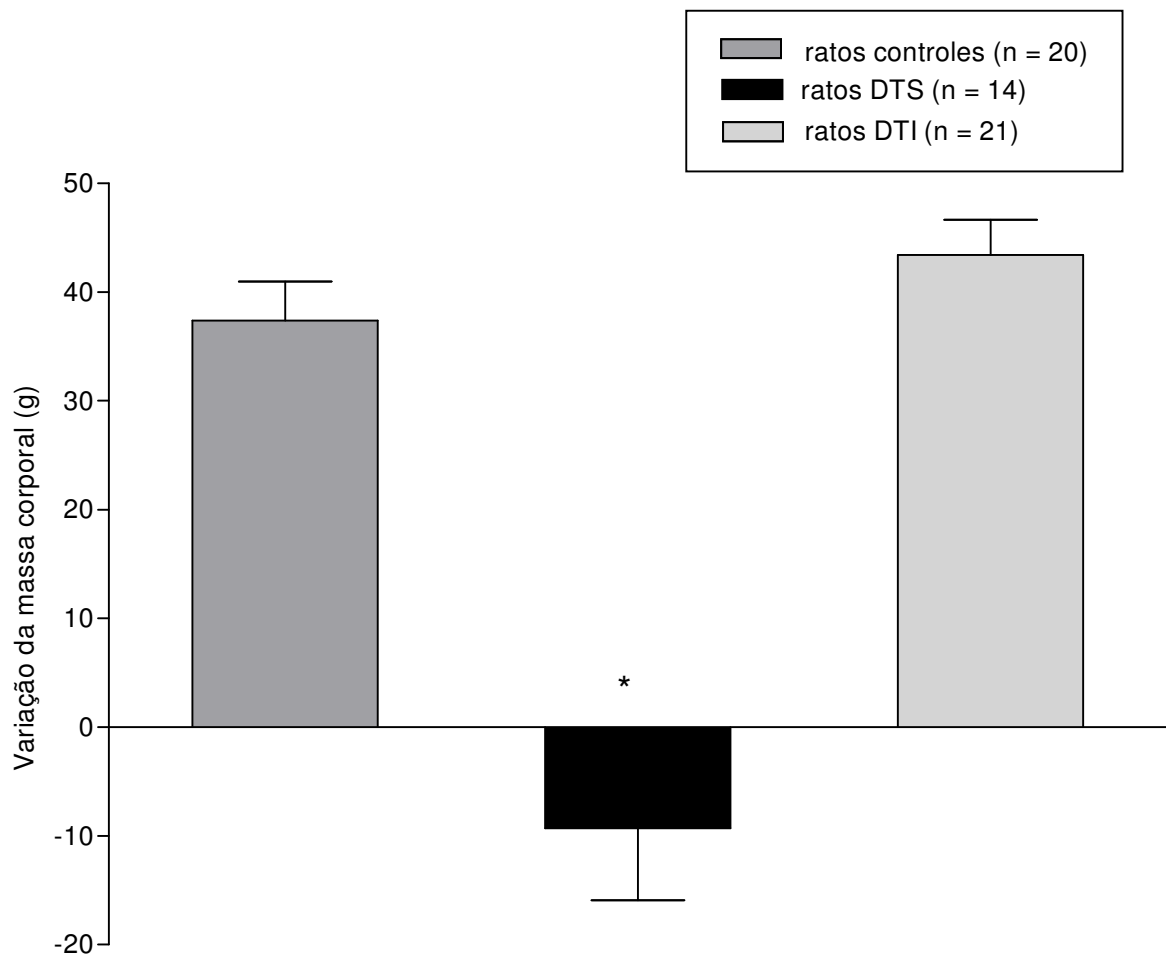


Figura 14: Efeito do tratamento de ratos diabéticos por STZ com insulina NPH humana sobre a variação da massa corporal. As barras verticais representam o EPM. * $p < 0,05$ em comparação aos ratos normais.

Sabe-se que em humanos diabéticos nos quais a glicemia não se encontra bem controlada, os níveis plasmáticos de frutossamina, colesterol total, c-LDL e triglicerídeos encontram-se elevados enquanto a fração c-HDL está diminuída. Por esse motivo, esses constituintes do plasma são utilizados como parâmetros bioquímicos para avaliar o estado metabólico do paciente e a qualidade do tratamento (MARTINEZ, 2003).

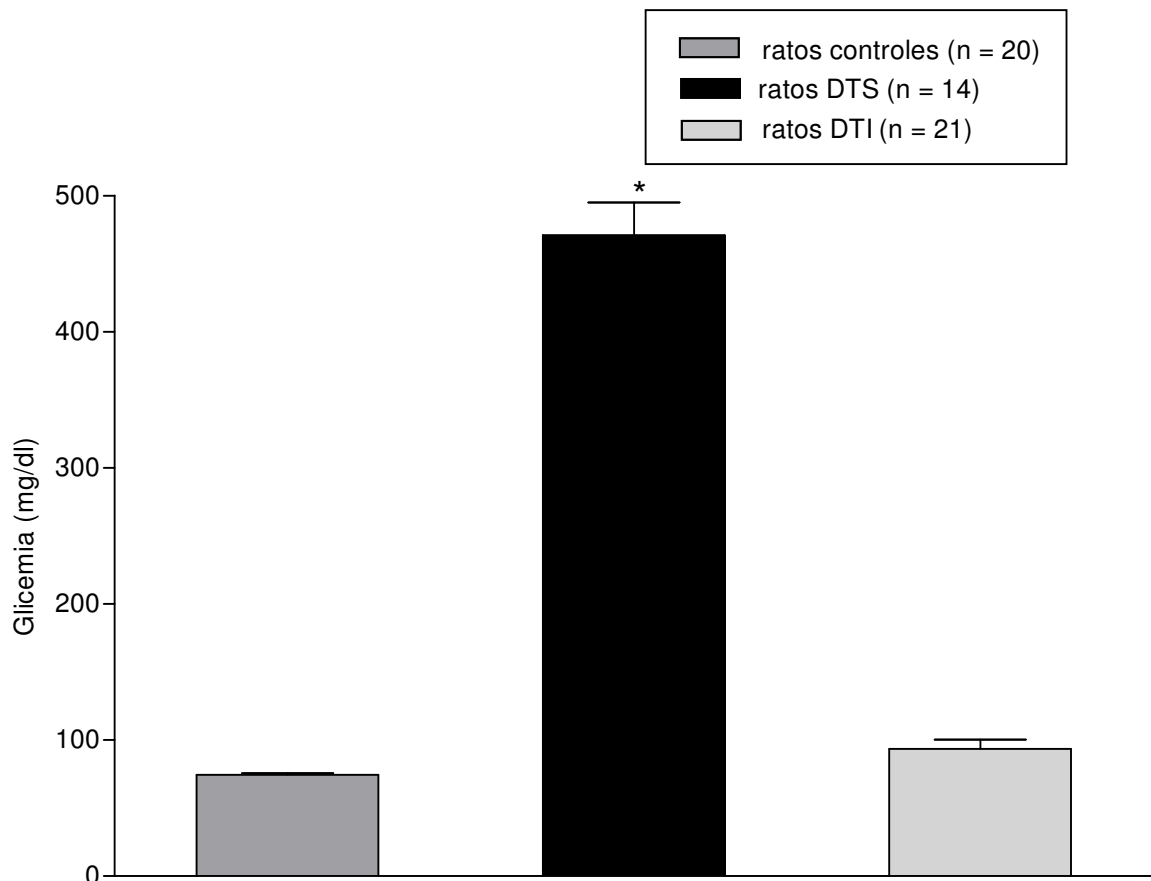


Figura 15: Efeito do tratamento de ratos Wistar diabéticos com insulina NPH humana. A glicemia foi medida no 15º dias após a indução do diabetes e os animais foram submetidos a jejum prévio de 10 horas. As linhas verticais representam o EPM. *P<0,05 em comparação aos animais saudáveis.

Portanto, as dosagens desses parâmetros bioquímicos foram feitas em nosso modelo animal de DM com o objetivo de analisar o efeito da doença sobre eles e também verificar a eficácia do tratamento com insulina proposto em reverter essas possíveis alterações causadas pela doença. Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Efeito do tratamento de ratos diabéticos (STZ) por insulina exógena NPH humana sobre os níveis plasmáticos de frutosemina, triglicéridos, c-HDL, c-LDL e c-VLDL.

Grupos experimentais	Frutosemina (umol/l)	Triglicéridos (mg/dl)	Colesterol Total (mg/dl)	HDL-c (mg/dl)	LDL-c (mg/dl)	VLDL-c (mg/dl)
Ratos normais (n=8)	299,50 ± 20,33	95,88 ± 6,93	73,13 ± 3,35	29,50 ± 2,24	24,75 ± 2,13	18,88 ± 1,38
Ratos DTS (n = 8)	307,38 ± 20,92	115,38 ± 7,91	60,13 ± 3,62 *	24,50 ± 1,64 **	11,63 ± 1,90 *	24,00 ± 1,45 #
Ratos DTI (n= 5)	234,63 ± 20,77 #	97,75 ± 6,10	70,88 ± 4,09	34,13 ± 3,36	17,50 ± 4,30	19,13 ± 1,17

O sangue foi coletado da artéria aorta dos ratos. Os animais foram submetidos a jejum prévio de 10h. Os resultados representam a média e o erro padrão da média. *p<0,05 ao comparar com os animais controles; **<0,05 ao comparar com os ratos DTI; # p<0,05 ao comparar com os demais grupos experimentais.

Com relação aos níveis de colesterol total, VLDL e triglicerídios do grupo controle, verificamos que eles são semelhantes aos apresentados pelos ratos Wistar utilizados em pesquisa na Universidade Federal de São Paulo, Unifesp (ANDERSEN et al., 2004) Os ratos da Unifesp apresentam colesterol total de $62,8 \pm 13\text{mg/dl}$ (os nossos $73,13 \pm 3,35\text{mg/dl}$), c-VLDL de $19,9 \pm 5,1 \text{ mg/dl}$ (os nossos $18,88 \pm 1,38\text{mg/dl}$) e triglicerídios de $83,7 \pm 11\text{mg/dl}$ (os nossos $95,88 \pm 6,93\text{mg/dl}$). Porém, os níveis de c-HDL e c-LDL são mais baixos do que os dos nossos animais respectivamente, $16,2 \pm 4,9\text{mg/dl}$ e $15,3 \pm 8,3\text{mg/dl}$ nos animais da Unifesp e $29,5 \pm 2,24\text{mg/dl}$ e $24,75 \pm 2,13\text{mg/dl}$ nos nossos. Eles obtiveram estes resultados utilizando ratos de 90 dias e nós com ratos machos de 75 dias.

Com relação ao valor médio de frutossamina plasmática, Taniguchi et al. (2007) reportou que seus animais, ratos Wistar machos de 90 dias e submetidos a jejum de 7h previamente à coleta de sangue, apresentaram média de frutossamina plasmática de $190 \pm 1 \mu\text{mol/l}$. Seu valor foi inferior ao mensurado em nossos animais normais, que foi $299,50 \pm 20,33 \mu\text{mol/l}$.

As diferenças em alguns dos parâmetros observados entre os nossos animais e os utilizados em outros centros de pesquisa, apesar de todos serem da linhagem Wistar, pode ser explicado pelas condições de manutenção no biotério, que incluem o tipo de dieta adotada (REAVEN e REAVEN, 1974), o estabelecimento ou não de um fotoperíodo e o número de ratos acondicionados por gaiola. Já foi reportado que os dois últimos aspectos mencionados interferem no comportamento alimentar dos animais (DEMARIA-PESCE e NICOLAIDIS, 1998). Além disso, o estabelecimento ou não de um período de jejum nos animais anteriormente à coleta do sangue para a análise também pode interferir nos resultados dos exames bioquímicos (ALAIN et al., 1974).

Com relação à idade do animal, essa variável provavelmente não colaborou para as diferenças observadas. Kobayashi et al. (2005) analisaram os níveis de colesterol total, c-HDL e triglicerídios em ratos Wistar machos de 65 dias e 125 dias. Os animais apresentaram valores médios similares em todos os parâmetros analisados nos dois dias de experimento, o que sugere que nesse intervalo de tempo a idade não afeta os níveis de colesterol total, c-HDL e triglicerídios. Porém, os valores médios apresentados para todos os parâmetros analisados foram elevados quando comparados aos nossos animais e aos animais da Unifesp. As concentrações médias de colesterol, c-HDL e triglicerídios dos ratos com 65 dias

foram, respectivamente, $114,5 \pm 4,6$ mg/dl; $58,6 \pm 3,4$ mg/dl e $152,4 \pm 11,3$ mg/dl. A justificativa para essa discrepância pode ser o tipo de dieta adotada, porém os autores não a descreveram no artigo. Outra explicação pode ser o fato dos animais não terem sido submetidos a um período de jejum prévio para a coleta do sangue.

De modo geral, a amostra de sangue para mensuração de lipídios presentes no plasma sanguíneo pode ser obtida com ou sem jejum prévio. Porém é recomendável que essas amostras sejam colhidas em jejum para minimizar a interferência da lipemia pós prandial que está frequentemente presente em amostras obtidas sem jejum prévio. Dessa maneira a realização do jejum permite a padronização das condições da coleta e facilita a interpretação e comparações dos resultados (ALAIN et al., 1974).

Comparando os resultados obtidos pelos grupos controle e DTS, os resultados mostram que dos seis parâmetros avaliados, três deles foram significativamente modificados pelo DM (colesterol total, c-LDL e c-VLDL). O DM reduziu em 17,78% os níveis de colesterol total e em 53% os níveis de c-LDL e aumentou em 27,12% os níveis de c-VLDL. Não houve diferença significativa entre os níveis de c-HDL, triglicerídeos e frutossamina entre os animais controle e DTS.

Outros autores também relatam que ao induzir o DM em seu modelo animal, não observaram alterações no perfil lipídico ou nos níveis de frutossamina como ocorre em humanos. Pepato et al. (2002) comparou os níveis plasmáticos de colesterol total e triglicerídios de ratos wistar machos saudáveis e diabéticos por STZ (40 mg/Kg do animal). Após 31 dias da indução da doença (o dobro do tempo em que mantemos os animais doentes em nossos experimentos) a média da concentração plasmática de colesterol total e triglicerídios entre os dois grupos experimentais não apresentaram diferenças significativas. É interessante mencionar que o colesterol total do grupo controle foi maior do que o mensurado para os animais diabéticos, apesar desse aumento não ter sido estatisticamente significativo.

Taniguchi et al. (2007) reportou que não houve diferença significativa nos níveis plasmáticos de triglicerídeos, colesterol total, c-LDL e c-VLDL entre animais controles e diabéticos por STZ (40 mg/Kg do animal). Apesar de não significativo, foi observado que os níveis do c-LDL e triglicerídios nos animais diabéticos foram inferiores aos dos animais controles. Apenas nos níveis de frutossamina dos animais diabéticos foi observado aumento significativo. Para a pesquisa os autores utilizaram ratos Wistar machos de 90 dias, os exames bioquímicos foram realizados 30 dias

após a indução da doença e os animais foram submetidos a jejum anteriormente à coleta de sangue.

Soltani, Keshavarz e Dehpour (2007) avaliaram os níveis plasmáticos de triglicerídeos, colesterol total, c-HDL, c-LDL e c-VLDL entre ratos Wistar saudáveis, com DM agudo (duração de dez dias) e com DM crônico (com duração de oito semanas). O DM foi induzido por STZ na dose de 40 mg/kg do animal. Não houve diferença significativa nas dosagens dos lipídios plasmáticos entre os ratos controles e com DM agudo. Foi observado que os níveis de triglicerídios e c-VLDL foram maiores, apesar de não significativo, nos animais controles quando comparado aos animais com DM agudo. Foi reportado também, que os ratos com DM crônico apresentaram aumento significativo em todos os parâmetros mensurados, quando comparados aos ratos controles e os ratos com DM agudo.

Comparar os resultados bioquímicos obtidos por nós e por outros autores após a indução do DM torna-se complicado devido às diferenças na metodologia utilizada. Ocorrem variações com relação à dose da STZ utilizada, o tempo decorrido da doença até o momento da realização dos exames bioquímicos e o tipo de dieta a que esses animais foram submetidos. A maioria dos artigos não descreve a dieta empregada para tratar os seus animais.

Segundo Ebara et al, (1994) apesar de ratos diabéticos por STZ serem o modelo mais utilizado para estudo do metabolismo de lipoproteínas durante o DM, outro modelo animal deve ser criado para essa finalidade devido a algumas diferenças fisiológicas entre homens e ratos que limitam a extrapolação dos resultados obtidos para aplicação em humanos. Uma dessas diferenças fisiológicas entre homens e ratos é a composição das lipoproteínas. Ha e Barter (1982) demonstraram que o c-VLDL em humanos contém principalmente B-100 enquanto em ratos ela é composta por B-48 e B-100. As apoproteínas desempenham funções importantes no metabolismo das lipoproteínas, o que justifica diferenças na concentração plasmática dessas estruturas entre as duas espécies.

Ao contrário do presente estudo e dos artigos acima citados, outros autores demonstraram que os modelos animais de DM utilizados por eles apresentaram alterações no perfil lipídico e nos níveis de frutamina de maneira semelhante ao que ocorre em humanos.

Liptáková et al. (2002) após induzirem o DM em ratos Wistar com STZ (60 mg/Kg do animal) observaram os níveis de frutamina, colesterol e triglicerídios. A

coleta de sangue para análise foi feita 56 dias após a indução da doença. Os resultados mostraram que todos os parâmetros bioquímicos estavam mais elevados nos animais diabéticos. Todas as alterações devido ao DM foram estatisticamente significativas.

Mahmud et al. (2004) observaram que ratos Long Evans diabéticos por STZ (90mg/dl) apresentavam triglicerídios, colesterol total e c-HDL mais elevados 100 dias após a indução da doença quando comparados aos animais controles. Todos os resultados foram estatisticamente significativos.

Comparando os resultados do grupo DTI com os ratos DTS observamos alguns indicativos de que o esquema de insulinoterapia proposto por nós foi eficiente. O tratamento com insulina elevou significativamente os níveis de HDL e reduziu, também significativamente, os níveis plasmático de VLDL. A concentração plasmática de triglicerídios também reduziu, porém não significativamente. Por outro lado, os ratos tratados com insulina apresentaram maiores concentrações plasmáticas de colesterol total e LDL, mas essas elevações não foram estatisticamente significativas.

Porém, os níveis de frutossamina plasmática nos DTI foram significativamente reduzidos quando comparados aos dos animais controles. Nos ratos DTS, a frutossamina estava aumentada em relação aos controles, mas não significativamente.

Nós sugerimos que a duração do experimento, apenas 15 dias, não é suficiente para elevar significativamente a concentração de proteínas glicadas no plasma, visto que esse exame reflete as variações glicêmicas dos últimos vinte dias. Portanto, estudos posteriores em que os animais permaneçam diabéticos por um período superior a 20 dias são necessários para testar essa hipótese. Por outro lado, a redução da frutossamina nos ratos DTI em relação aos controles pode estar evidenciando a ocorrência de episódios de hipoglicemia nesses animais.

Além disso, algumas das alterações esperadas no perfil lipídico devido ao DM (aumento do colesterol total, triglicerídios e LDL) não ocorreram como em humanos. Essas observações corroboraram a afirmação de Ebara et al, (1994) de que ratos diabéticos por STZ não representam um bom modelo animal para estudo de alterações do perfil lipídico durante o DM. Observamos também que a maioria dos trabalhos que demonstram os efeitos da indução do DM e do tratamento dos animais doentes com insulina sobre o perfil lipídico, relataram resultados semelhantes aos

nossos (PEPATO et al., 2002; SOLTANI, KESHAVARZ e DEPHOUR, 2007; TANIGUCHI et al., 2007). Assim, inicialmente concluímos que ratos e humanos não apresentam alterações lipídicas semelhantes devido ao DM.

Pretendemos realizar outros experimentos para avaliar a eficiência do tratamento, como dito acima. Mas, podemos concluir que o tratamento com insulina restabeleceu os níveis de colesterol total e do c-LDL e c-VLDL nos animais diabéticos, o que constitui indicativos da eficiência do tratamento.

4.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO E DISTRIBUIÇÃO INTRACELULAR DAS ISOFORMAS α , ϵ E ζ DE PKC EM CÉLULAS CROMAFINS ADRENAIS DE RATOS WISTAR CONTROLES E DIABÉTICOS UTILIZANDO A TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA

Os estudos sobre a expressão de isoformas de PKC em células cromafins utilizando a técnica de imunohistoquímica permitiram a avaliação das diferenças nos níveis de expressão e também da distribuição dessas proteínas no citosol em ratos controles e diabéticos por STZ. A distinção entre o córtex e a medula da glândula supra-renal é possível por técnicas de coloração. As figuras 16A e 16B mostram o aspecto da glândula supra-renal em corte histológico corado com hematoxilina-eosina. As figuras 16C e 16D mostram cortes da glândula supra-renal após tratamento com anticorpo associado a rodamina.

Vários trabalhos já avaliaram a expressão de isoformas de PKC em células cromafins de bovinos. Os resultados mostraram que essas células expressam as isoformas α , ϵ e ζ de PKC e que, por outro lado, não possuem níveis detectáveis das isoformas β_I , β_{II} , γ , δ , η , e θ (SENA et al., 1996; YANAGITA et al., 2000). Portanto o nosso estudo consistiu na análise da expressão das três isoformas de PKC já descritas em células cromafins da medula adrenal de bovinos.

Os resultados de imunohistoquímica mostraram que cada isoforma apresentou nível de expressão característico (figuras 17 a 19). A PKC- α é a isoforma mais expressada nas células cromafins de rato, seguida de ζ e depois de ϵ . Nos animais controles, a isoforma α apareceu com frequência associada à membrana plasmática (figura 17B). A isoforma ϵ também apareceu associada à membrana

plasmática, mas em menor proporção do que α (figura 18B). A isoforma ζ , ao contrário, apresentou uma distribuição mais ampla dentro das células (figura 19B).

A isoforma α de PKC é do grupo convencional, ou seja, necessita de Ca^{2+} , diacilglicerol e fosfatidilserina para ser ativada. A isoforma ϵ é do grupo chamado PKCs novas, que necessitam apenas de diacilglicerol e fosfatidilserina para serem ativadas. A isoforma ζ é do grupo das isoformas atípicas de PKC e necessitam apenas de fosfatidilserina para serem ativadas (NEWTON, 2001). Portanto a maior ou menor interação de cada isoforma de PKC com a membrana plasmática podem ser explicadas pelo seu mecanismo de ativação. Como o diacilglicerol permanece ligado à face citosólica da membrana, as PKCs convencionais e novas são translocadas do citosol para a fase interna da membrana (NEWTON, 2001). Porém, a ampla distribuição de ζ não significa que a membrana plasmática não participa da regulação da atividade de isoforma. Alguns autores têm sugerido que PKC- ζ tem sua atividade regulada pela proteína quinase PDK-1 (CHOU et al., 1998; HIRAI e CHIDA, 2003). A PDK-1 é recrutada para a membrana plasmática após a estimulação da célula por agonistas (HIRAI e CHIDA, 2003). Chou et al. (1998), sugeriram que essas enzimas permanecem associadas *in vivo* e *in vitro* formando um complexo pré-existente em células não estimuladas. Nessas condições, a PDK-1 não poderia fosforilar a PKC- ζ provavelmente devido a mecanismos auto-inibitórios da PKC- ζ e/ou da PDK-1 (CHOU et al., 1998).

O DM afetou de maneira diferenciada a expressão de cada uma das isoformas. A expressão de α foi drasticamente reduzida pela doença (figura 17, comparar B e C). Além da menor expressão, a associação à membrana plasmática parece menos freqüente nas células cromafins dos diabéticos, o que pode determinar menor atividade. A expressão da isoforma ϵ foi a menos afetada após 15 dias da indução do DM. Houve uma pequena redução na expressão de ϵ nos animais diabéticos (figura 18, comparar B e C). Devido a esta pequena variação, foi mais difícil de determinar o efeito da doença sobre a sua expressão. Outro fator que dificultou a análise foi sua baixa expressão nestas células. Já a isoforma ζ , ao contrário de α e ϵ , teve a sua expressão aumentada pelo DM (figura 19, comparar B e C).

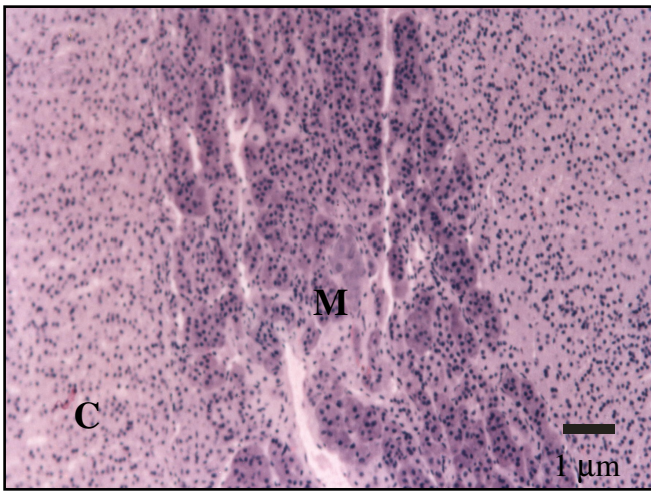
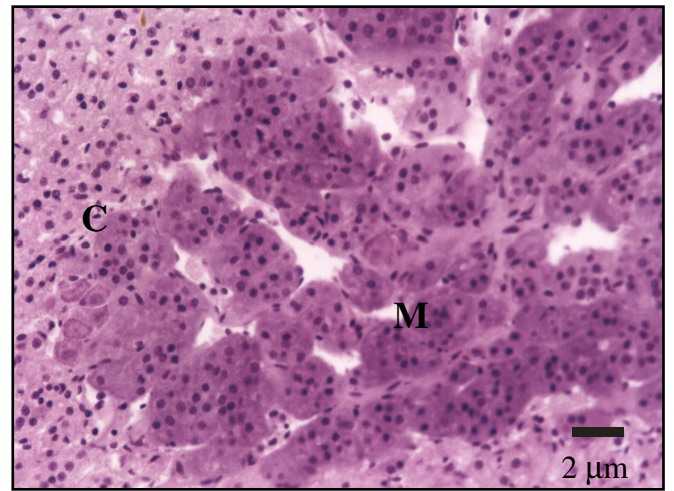
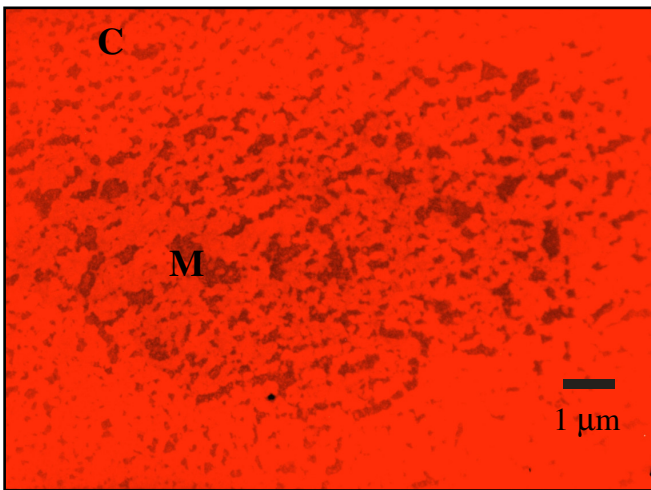
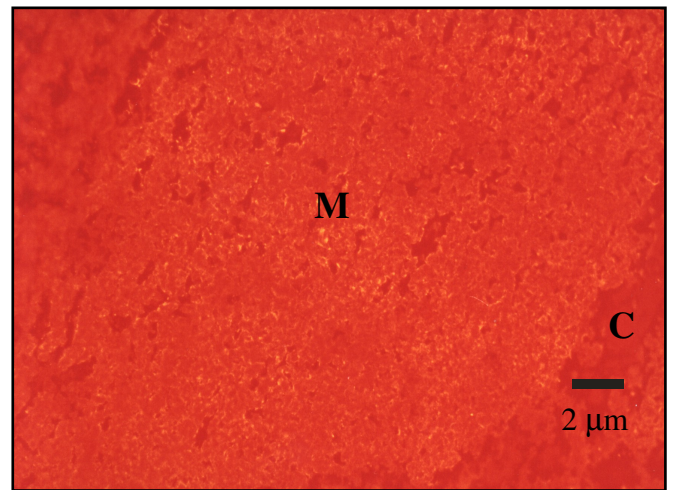
**A****B****C****D**

Figura 16- Diferenciação entre os tecidos cortical e medular da glândula supra-renal de ratos Wistar. Em A e B coloração com HE e em C e D tratamento com anticorpos associados a rodamina para análise imunohistoquímica.

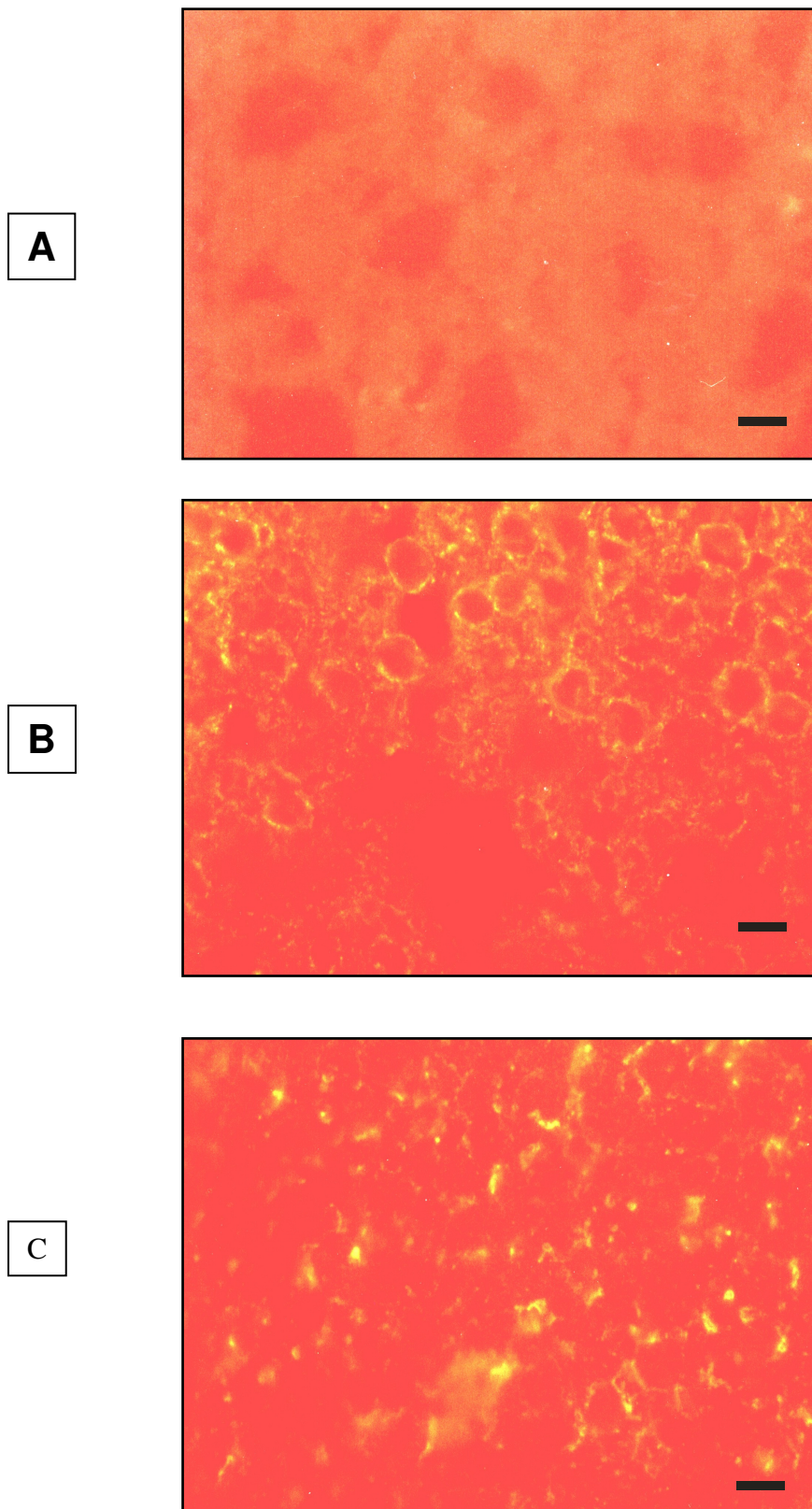


Figura 17- Efeito do diabetes sobre a expressão da isoforma alfa da proteína quinase C, após 15 dias da indução da doença. A- Controle negativo; B- Animais normais; C- Animais diabéticos. A barra representa 10 μ m.

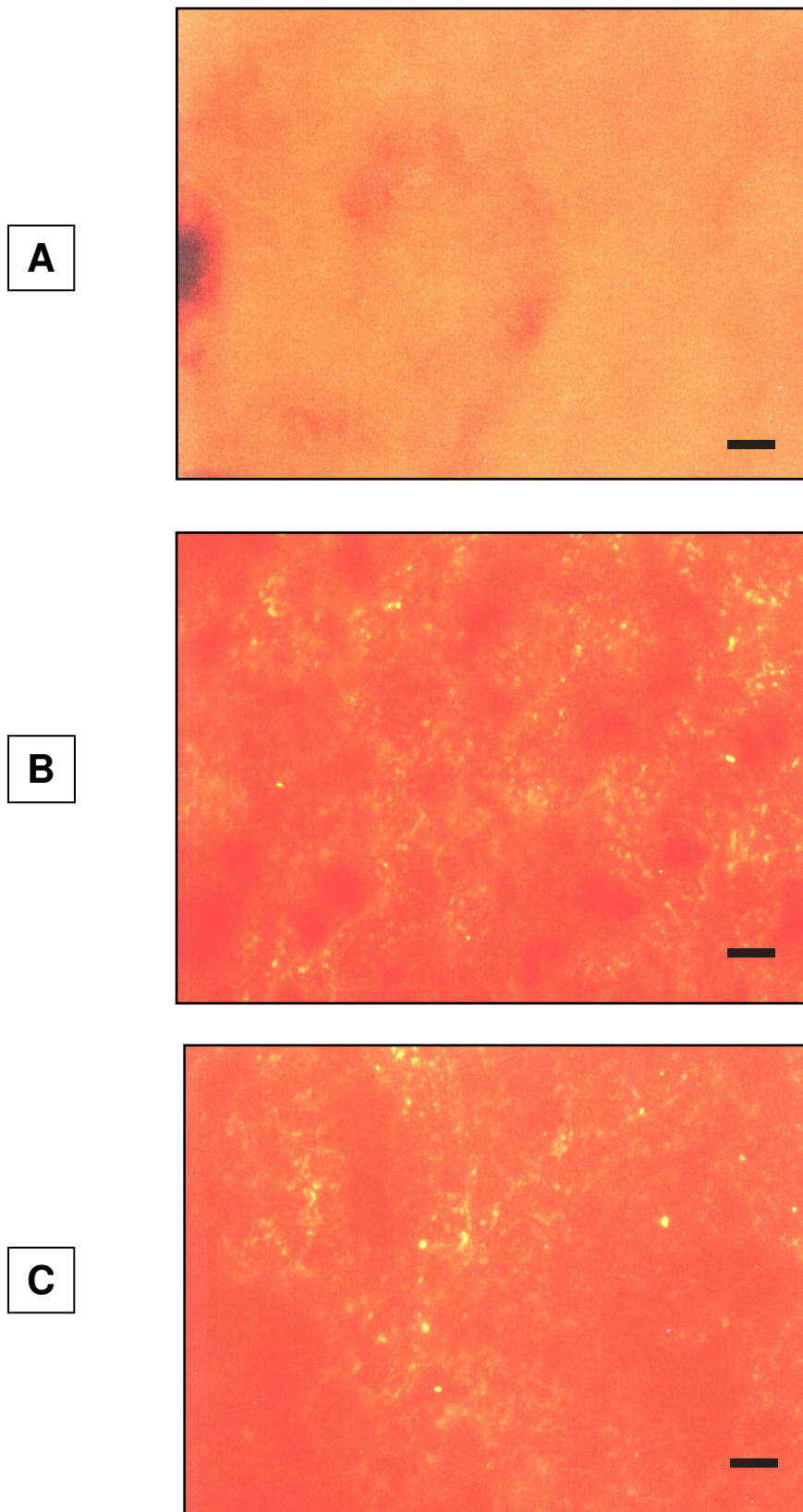


Figura 18- Efeito do diabetes sobre a expressão da isoforma épsilon da proteína quinase C, após 15 dias da indução da doença. A- Controle negativo; B- Animais normais; C- Animais diabéticos. A barra representa 10 μ m.

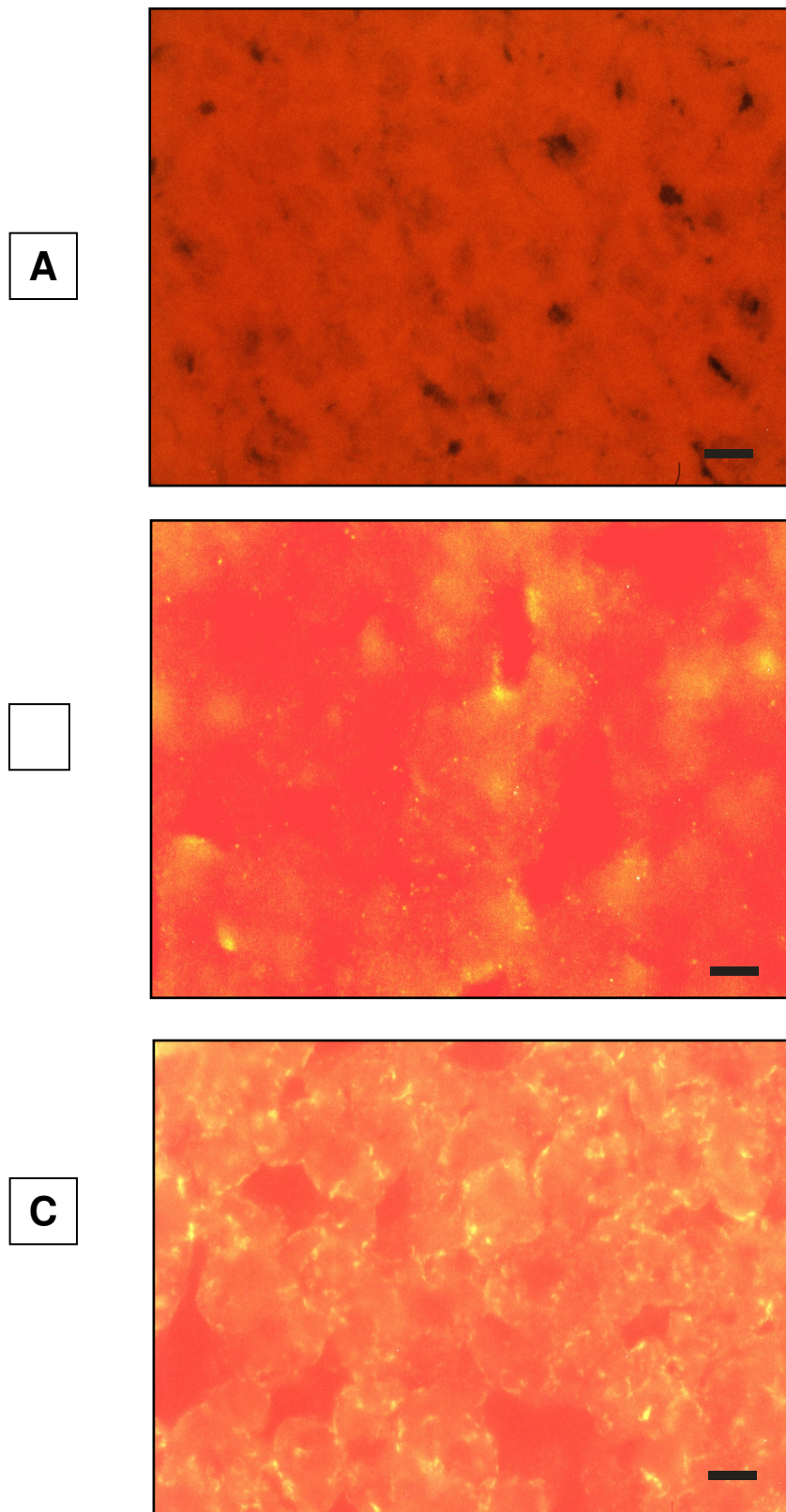


Figura 19- Efeito do diabetes sobre a expressão da isoforma zeta da proteína quinase C, após 15 dias da indução da doença. A- Controle negativo; B- Animais normais; C- Animais diabéticos. A barra representa 10 μ m.

4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS ISOFORMAS α , ϵ E ζ DE PKC EM CÉLULAS CROMAFINS ADRENAIS UTILIZANDO A TÉCNICA DE WESTERN BLOT

Um problema metodológico no trabalho com imunohistoquímica é a quantificação das proteínas sob análise, razão pela qual decidimos utilizar a técnica de Western Blot.

A análise da expressão das isoformas α , ϵ e ζ de PKC em ratos Wistar controles, DTS e DTI por Western Blot corroboraram, em parte, os resultados obtidos por imunohistoquímica.

Pela técnica de Western Blot, observamos que a expressão da isoforma α de PKC foi significativamente reduzida pelo DM (figura 20). A expressão dessa isoforma foi 39,5% menor nos animais DTS quando comparado aos animais controles. Portanto, esses resultados corroboram o resultado obtido por imunohistoquímica, que também mostrou uma redução significativa na expressão de PKC- α devido ao DM.

Nos ratos DTI a expressão de PKC- α foi similar ao observado nos ratos controles. Portanto, o controle do diabetes foi capaz de reverter o efeito do DM sobre a expressão dessa isoforma.

A expressão da isoforma ϵ foi a menos afetada após a indução do DM. Por Western Blot, foi observado aumento na expressão dessa isoforma nos ratos DTS e DTI quando comparado aos ratos controles. Porém essas alterações não foram significativas nos dois grupos experimentais (figura 21). Portanto, os resultados obtidos por Western Blot e imunohistoquímica na expressão de PKC- ϵ em ratos controles e ratos diabéticos foram diferentes.

A análise da PKC- ϵ por imunohistoquímica foi dificultada pela baixa expressão dessa isoforma nas células cromafins. Observamos pequena redução na expressão dessa proteína nos animais diabéticos. Devido a essa pequena variação, foi difícil determinar o efeito do DM sobre sua expressão. Lembrando que a metodologia de análise dos experimentos de imunohistoquímica consistiu na observação das lâminas por três pessoas que não sabiam o grupo experimental que estavam analisando, nem os resultados obtidos pelos demais. Não houve divergência nos resultados obtidos pelos três avaliadores com relação a análise das isoformas α e ζ . Por outro lado, sempre houve dúvida quanto à redução da expressão da isoforma ϵ ,

ou seja, sempre um dos avaliadores divergia. Porém, em nenhuma análise se observou aumento da expressão desta isoforma.

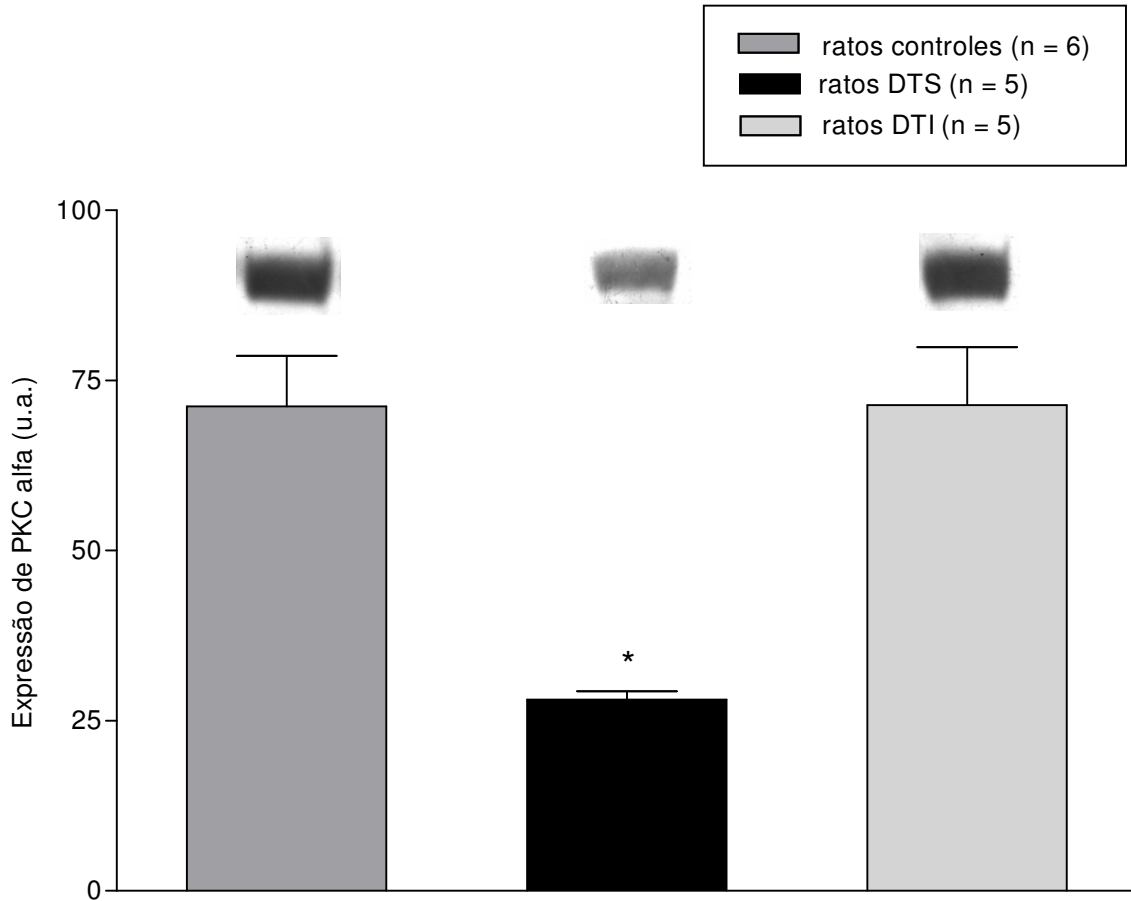


Figura 15: Efeito do diabetes e do tratamento com insulina NPH humana sobre a expressão de PKC alfa em células cromafins da medula adrenal de ratos Wistar. As colunas representam as medidas de densidade ótica vezes área. Acima de cada coluna há um Western Blot representativo dos resultados obtidos. A barra vertical representa o EPM. * $p < 0,05$ em comparação aos ratos controles.

Com relação à isoforma ζ de PKC, ao contrário de α e ϵ , os resultados de imunohistoquímica e de Western Blot mostraram que a sua expressão foi significativamente aumentada pelo DM (figura 22). Por Western Blot observamos um aumento de 74,2% na expressão de PKC- ζ nos ratos DTS quando comparado aos ratos controles. Nos ratos DTI, esse elevação na expressão foi apenas atenuada, sendo apenas 32,6% maior em relação aos ratos controles. Tanto nos ratos DTS quanto nos DTI, o aumento na expressão de PKC- ζ foi estatisticamente significativo. Portanto, apesar da insulinoterapia, o efeito do DM sobre a expressão de PKC- ζ não foi similar aos dos ratos controles, ou seja, não foi revertido.

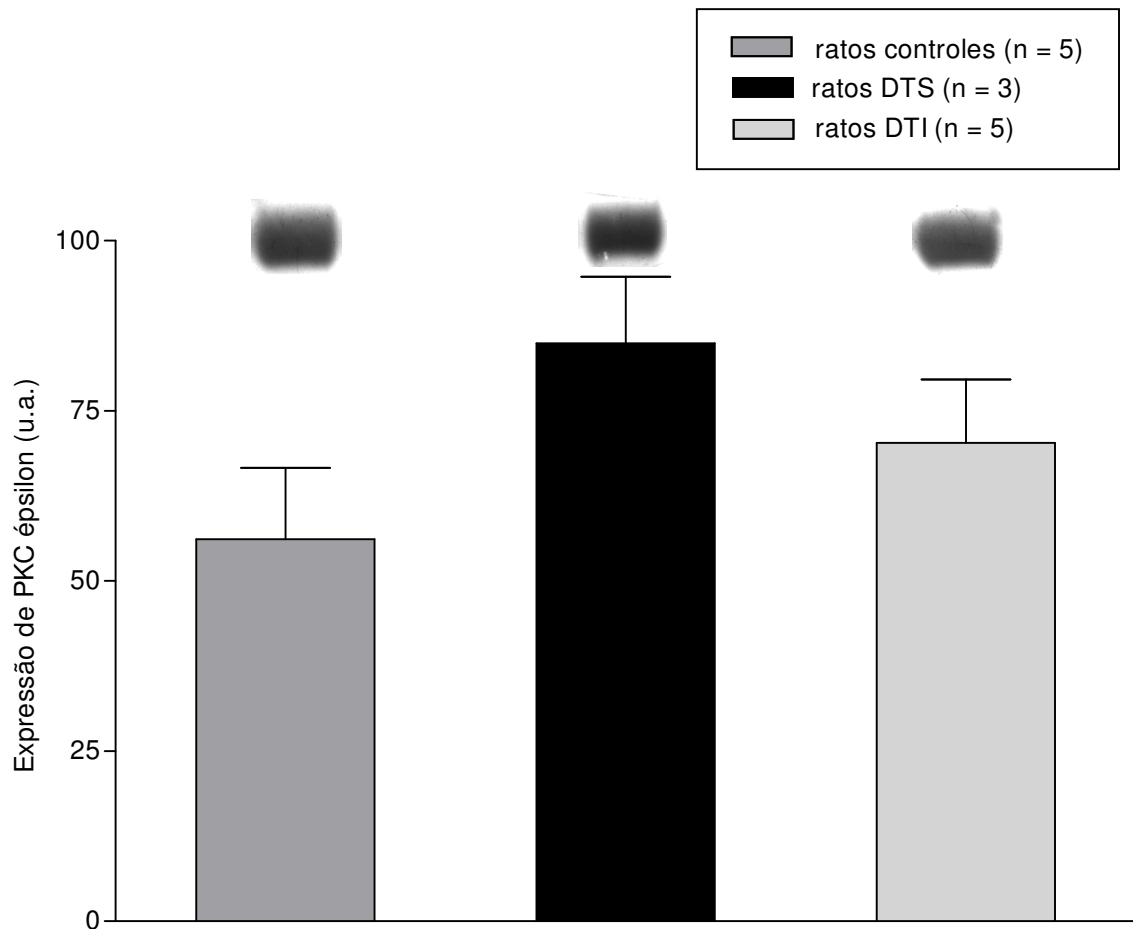


Figura 21: Efeito do diabetes e do tratamento com insulina NPH humana sobre a expressão de PKC épsilon em células cromafins da medula adrenal de ratos Wistar. As colunas representam as medidas de densidade ótica vezes área. Acima de cada coluna há um Western Blot representativo dos resultados obtidos. A barra vertical representa o EPM.

Com relação ao estudo sobre a expressão e a localização intracelular das isoformas α , ϵ e ζ de PKCs em células cromafins adrenais, inicialmente constatamos que o efeito do DM sobre esses parâmetros vai depender do tipo celular em que cada isoforma está inserida. Essa constatação foi possível pela comparação de nossos resultados como os resultados obtidos por outros autores que fizeram estudo semelhante ao nosso, porém utilizando outros tipos de células (TANG et al., 1997; BORGHINI et al., 1994; KOYA et al., 1994; BABAZONO et al., 1998; GOESTEMEYER et al., 2007).

Goestemeyer et al. (2007) verificaram que em células dos túbulos renais proximais, a expressão das isoformas α e ϵ de PKC não foram alteradas pelo DM quando comparado aos ratos saudáveis.

Koya et al. (1997) observaram que em células glomerulares de ratos diabéticos a translocação das isoforma α de PKC para a membrana aumenta em 50% quando comparado aos ratos controles. Mas, contrariamente ao trabalho de Babazono et al. (1998) nenhuma alteração na distribuição intracelular de PKC- ϵ foi observada.

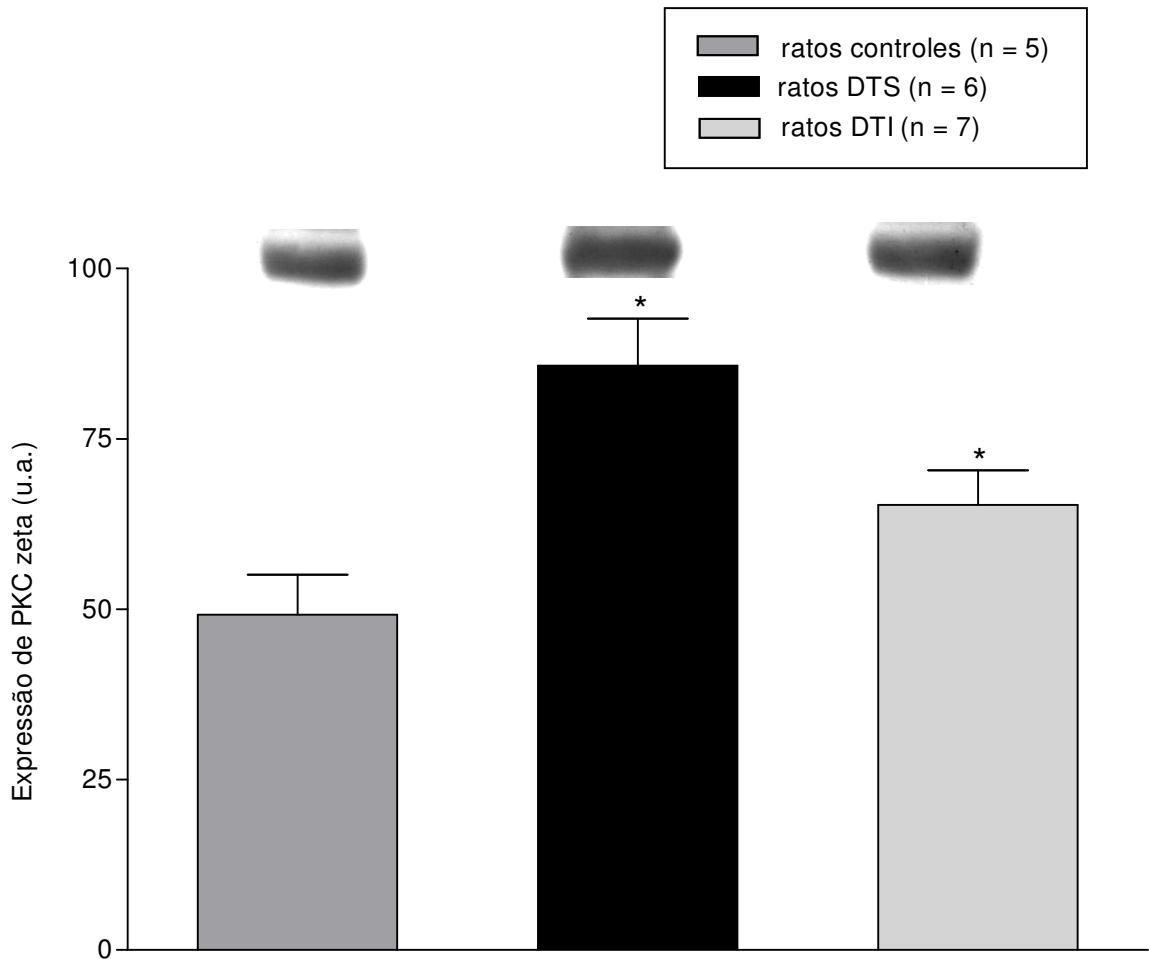


Figura 22: Efeito do diabetes e do tratamento com insulina NPH humana sobre a expressão de PKC zeta em células cromafins da medula adrenal de ratos Wistar. As colunas representam as medidas de densidade ótica vezes área. Acima de cada coluna há um Western Blot representativo dos resultados obtidos. A barra vertical representa o EPM. * $p < 0,05$ em comparação aos ratos controles.

Liu et al. (1999) reportaram que no tecido muscular cardíaco de ratos a expressão das isoformas α , ϵ e ζ de PKC são aumentadas significativamente no tecido muscular cardíaco de ratos diabéticos quando esses são comparados aos do ratos controles.

Borghini et al., (1994) observaram que o DM não causa alterações na expressão, distribuição e translocação das isoformas α e ϵ de PKC em células nervosas do nervo ciático.

Tang et al. (1993) analisaram a expressão e translocação de isoformas de PKC nos hepatócitos de ratos diabéticos. Eles reportaram que a isoforma α de PKC tem sua expressão aumentada tanto na fração citosólica quanto na fração de membrana. A expressão da isoforma ϵ nos animais controles foi principalmente associada à membrana. Com a indução do DM a expressão dessa isoforma foi aumentada. Não foram observadas alterações na expressão e distribuição celular de PKC- ζ nos hepatócitos causadas pelo DM.

A PKC- α consiste em uma cadeia de 672 aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 80 KDa (BABAZONO, et al., 1998; LUI et al., 1999). Essa proteína é expressada em praticamente todos os tipos celulares, ao contrário de outras isoformas de PKC, cuja expressão ocorre em células específicas. (NAKASHIMA, 2002). A PKC- α possui papel de destaque no controle de certos processos celulares, como por exemplo, proliferação (SCHÖNWASSER et al., 1998), apoptose (LEE et al., 1996), diferenciação celular (ZHAO et al., 2001), motilidade (SUN e ROTENBERG, 1999) e adesão celular (WALLIS et al., 2000). As diferentes funções desempenhadas pela PKC- α depende da célula em que essa isoforma é expressada e do substrato sobre qual ela atua (NAKASHIMA, 2002).

A isoforma ϵ apresenta massa molecular de aproximadamente 90 KDa (TANG et al., 1993; LUI et al., 1999). PKC- ϵ é particularmente abundante em células neuronais, células produtoras de hormônios e em células do sistema imune (OHNO et al., 1988). Já foi demonstrado que essa isoforma participa de vias de sinalização relacionadas com proliferação celular (BALCONAITE et al., 2000), diferenciação celular (RACKE et al., 2001), expressão genética (JOBAGY et al., 1999), contração muscular (ALI e SARNA, 2002), transporte intracelular (DeCOY, SNAPPER e BREYER, 1995), excitose (AKITA et al., 1994) e endocitose (SONG et al., 1999). Evidências sugerem que PKC- ϵ está relacionada com vários tipos de doenças como tumores, isquemia e DM (AKITA, 2002).

A isoforma ζ possui massa molecular de aproximadamente 78 KDa (TANG et al., 1993; BABAZONO, et al., 1998). Estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem que essa PKC possui papel relevante em diferentes vias de sinalização ativada por vários sinais extracelulares (HIRAI e CHIDA, 2003). Algumas vias de sinalização nas quais

PKC- ζ participa são a cascata de sinalização MAPK (BERRA et al., 1995), a cascata de ativação do fator de transcrição nuclear NF κ B (SANZ et al., 2000) e a cascata de sinalização da proteína ribossomal S6 (AKIMOTO et al., 1998).

Nas células cromafins, diversos estudos relatam a participação de isoformas de PKC nos processos de síntese e secreção de catecolaminas. Já foi reportado que PKC estimula a síntese e a atividade de TH, enzima que determina a velocidade de produção das catecolaminas pela medula adrenal (TAKEKOSHI et al., 2001; NANMOKU et al., 2005; BROBOVSKAYA et al., 2007; GELAIN et al., 2007). Além disso, algumas proteínas que constituem a maquinaria secretória das células cromafins são reguladas por PKCs (KHIROUG et al, 1998; YANAGITA et al, 1999; GRAHAM et al, 2000; TAYLOR, 2000; SENA et al, 2001; PARK et al., 2006). Portanto, a síntese e secreção de catecolaminas pelas células cromafins são reguladas por PKCs.

Com relação à síntese de catecolaminas, as células cromafins possuem receptores de membrana para diferentes moléculas sinalizadoras extracelulares que estimulam a síntese e/ou a ativação de TH (ARIMURA e SHIODA, 1995; TAKEKOSHI et al., 2001 a,b; TAKAHASHI et al., 2005).

O polipeptídeo PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) e seu receptor foram identificados em células cromafins adrenais (ARIMURA e SHIODA, 1995). Esse peptídeo regula a expressão dos genes de TH, DBH e PNMT por meio de diferentes mecanismos que envolvem a ativação de PKA e PKC (CHOI, PARK e HWANG, 1999). PACAP é liberado juntamente com ACh nas terminações do nervo esplâncnico na glândula adrenal de rato. Sua função fisiológica está relacionada principalmente com a resposta do organismo a situações de estresse metabólico (ARIMURA e SHIODA, 1995).

Hamelink et al., (2002) reportou que camundongos que não expressam o gene de PACAP ao serem submetidos a estresse hipoglicêmico causado por injeção de insulina (1 a 10U /Kg de massa do animal) e longo período de jejum apresentaram episódios de hipoglicemia mais severa quando comparado aos animais selvagens. Foi também observado que nessas condições de estresse metabólico, os animais que não expressam PACAP apresentaram declínio significativo na secreção e estoque intracelular de adrenalina. Por outro lado, os animais selvagens apresentaram aumento da secreção de adrenalina e ativação de TH. Foi também observado que a resposta de corticosterona, um hormônio contra-

regularório, foi similar nos dois grupos experimentais após serem submetidos ao mesmo protocolo de tratamento com insulina e jejum. Esses dados sugerem que PACAP está relacionado com a síntese de catecolaminas em células cromafins adrenais no estado de estresse metabólico.

Bobrovskaya et al., (2007) demonstraram em células cromafins bovinas que PKC é responsável pela fosforilação sustentada de TH em Ser40 que resulta na manutenção da atividade enzimática de TH por um período de até 48 horas em resposta a estimulação nicotínica.

PKC e outras proteínas fosforilam Ser40 em resposta a nicotina (DUNKLEY et al., 2004). Porém, todas elas, com exceção de PKC, mantêm a fosforilação de Ser40 por apenas alguns minutos, o que é denominado de fosforilação aguda.

Em células cromafins bovinas a ativação de proteínas Ser40 quinases por estimulação nicotínica é dependente do influxo de Ca^{2+} extracelular através de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. A rápida inativação dessas quinases é conseqüência da redução dos níveis intracelulares de Ca^{2+} . Bobrovskaya et al., (2007) sugeriram que PKC é capaz de manter a fosforilação sustentada do resíduo Ser40 de TH devido à ocorrência de um pequeno aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} que é suficiente para manter a atividade de PKC, mas é insuficiente para sustentar a ativação das outras quinases que também fosforilam Ser40 de TH. Segundo os autores uma redução na atividade de fosfatases não estaria envolvida.

Bobrovskaya et al., (2007) também relatou que o tratamento de células cromafins com PDBU, um ativador de isoformas convencionais e novas de PKC, manteve as PKCs ativas e aumentou significativamente a fosforilação de Ser40 por um período superior a 24 horas. Yanagita et al, 2000 reportaram que após tratar células cromafins bovinas com PDBU, as isoformas α e ϵ de PKC permaneceram ativadas por no mínimo 15 horas. Isso sugere que essas isoformas podem ser as responsáveis pela fosforilação sustentada de Ser40 em TH por 24 horas (BOBROVSKAYA et al., 2007).

Nossos resultados mostraram que a expressão de PKC- α é diminuída significativamente nos ratos DTS. Nos experimentos de imunohistoquímica, além de uma redução na expressão da isoforma α de PKC, foi também observado uma redução na associação dessa isoforma à membrana plasmática. Essa observação sugere uma menor ativação dessa isoforma de PKC, visto que ela é classificada

como uma PKC convencional. Dessa forma, além do DM reduzir a expressão da isoforma α de PKC, podemos também pensar que a sua atividade também foi reduzida pela doença.

De acordo com o trabalho de Bobrovskaya et al., (2007) podemos então sugerir que em consequência da menor atividade de PKC- α , a fosforilação sustentada de TH é reduzida, o que possivelmente poderia explicar a redução na síntese de catecolaminas nos animais diabéticos não tratados com insulina.

Em outros trabalhos realizados em nosso laboratório foi observado que ratos DTS apresentaram redução de aproximadamente 21% no conteúdo total de catecolaminas, o que foi estatisticamente significativo. Nos ratos DTI, esse efeito da doença foi revertido. De maneira similar, mostramos em nossos resultados que a redução na expressão de PKC- α também foi revertida pela insulino-terapia. Observamos também uma redução de 15,6% na expressão de TH nos ratos DTS, porém essa diminuição não foi significativa. Nos ratos DTI, a expressão de TH foi superior, em aproximadamente 13%, quando comparado aos ratos controles, mas esse aumento também não foi considerado significativo (manuscrito em preparação).

Juntos, esses dados sugerem que um dos mecanismos que podem estar envolvidos na redução do conteúdo total de catecolaminas seria a diminuição da atividade de TH devida a redução da expressão da isoforma α de PKC devido ao DM.

PKC- ϵ também é capaz de realizar a fosforilação sustentada, mas como dito anteriormente, em nossos experimentos não observamos alterações significativas na expressão dessa isoforma de PKC. Mas como já sugerido, acreditamos que essa isoforma não está envolvida nas alterações decorrente do DM.

Já foi reportado que a síntese de catecolaminas também pode ser modulada pelo fator liberador de prolactina (hormônio hipofisário que age sobre as glândulas mamárias) e pelo retinol. Ambos estimulam a síntese e a atividade de TH por via dependente de PKC (NANMOKU et al., 2005; GELAIN et al., 2007). Porém, nesses trabalhos não foi analisado qual isoforma de PKC está envolvida nesses processos, o que limita fazer correlações com os resultados obtidos em nossos estudos.

Não encontramos qualquer artigo que correlacione o aumento da expressão da isoforma ζ com a redução da síntese de catecolaminas pelas células cromafins adrenais.

Com relação à interpretação feita anteriormente de que a redução da associação de PKC- α à membrana plasmática é um indicativo de redução da atividade da proteína, algumas considerações que limitam essa interpretação devem ser feitas. Já foi reportado na literatura que PKC- α pode translocar para outros locais dentro da célula que não a membrana plasmática, onde irá exercer a sua função biológica, tais como o complexo de Golgi e o núcleo (NAKASHIMA, 2002).

Almholt et al. (1999) analisaram a distribuição intracelular de PKC- α em células renais de hamster. Nesse trabalho, para a visualização da isoforma de PKC dentro da célula foi utilizada uma proteína fluorescente verde (GFP) fundida a PKC- α . Anteriormente, foi verificado que a GFP não altera as propriedades de localização e movimentação da PKC- α dentro da célula.

Foi observado que em células renais de hamster não estimuladas PKC- α -GFP se distribui homogeneamente no citoplasma da célula, sendo que maior concentração de PKC- α foi observada apenas na região perinuclear. A estimulação das células com 100nM de PMA causou a translocação da PKC- α -GFP para a membrana plasmática com concomitante depleção da expressão da proteína na porção citoplasmática.

Shirai et al. (1998) observaram a translocação de PKC- ϵ em células COS-7, linhagem de célula renal de macaco. Eles reportaram que ácidos graxos insaturados induzem a translocação de PKC- ϵ do citoplasma para a membrana plasmática enquanto a PKC- ϵ transloca para a região perinuclear ou para o complexo de golgi em resposta ao ácido aracdônico. Ácidos graxos saturados e insaturados são referidos como potencializadores isoforma específicos da atividade de PKC (SHINOMURA et al., 1991; NISHIZUKA, 1995).

Esses dados mostram que o local para onde a PKC ativada transloca depende do tipo celular onde a PKC- α , ou outra isoforma de PKC convencional ou nova, é expressada. Não podemos descartar a hipótese de que o destino da translocação da PKC possa depender também do agente estimulador. Nas células cromafins adrenais, observamos uma maior translocação de PKC- α em região que consideramos ser a membrana plasmática.

Outra questão ainda não esclarecida com relação à ativação e translocação de isoformas de PKCs é se a proteína torna-se cataliticamente ativa após ser translocada ou se ela transloca após adquirir competência catalítica (SHIRAI e SAITO, 2002).

Sakai et al. (1997) observou que PKC- γ translocou para a membrana plasmática após tratamento com éster de forbol mesmo na presença de estaurosporina, inibidor inespecífico de PKCs. Porém, nesse trabalho não foi avaliada a atividade da PKC, apenas a sua localização dentro da célula por meio de sua ligação a GFP (composto fluorescente) utilizando microscopia confocal.

Outro indicativo de que a translocação nem sempre está relacionada com a aquisição da atividade catalítica foi reportada por Kajimoto et al. (2001). Eles mostraram que PKC- δ transloca para o complexo de golgi após tratamento com ceramida, porém a isoforma ainda não estava ativada. Eles sugerem que após a translocação a PKC- δ é ativada por fatores ainda não conhecidos que são regulados pela ceramida no complexo de golgi. Esses resultados sugerem que a translocação de PKC é independente da aquisição de atividade catalítica. Também já foi reportado que peróxido de hidrogênio ativa PKC- δ e não foi observado translocação (SHIRAI e SAITO, 2002).

Com relação à secreção de catecolaminas, Kim et al., (2003) reportou que canais de K^+ controlados por voltagem (Kv) constituem um importante componente na modulação da excitabilidade de células PC12 e que esses canais são regulados pela isoforma ζ de PKC.

A excitabilidade dos neurônios e das células cromafins, como também a linhagem PC12 de células cromafins, é determinada pela ativação de diferentes canais iônicos controlados por voltagem expressos na membrana plasmática dessas células (LLINAS, 1988). As células cromafins possuem características de células neuronais devido à origem embriológica em comum com os neurônios simpáticos (AUNIS e LANGLEY, 1999). As células PC12 também compartilham propriedades em comum com os neurônios e também expressam canais dependentes de voltagem e outras proteínas características de células neuronais. Tanto as células cromafins quanto as células PC12 são utilizadas para estudo de diversas funções neuronais, principalmente para o estudo da secreção de neurotransmissores (BURGOYNE, 1991).

Os canais Kvs retificadores são responsáveis pelo restabelecimento do potencial de repouso da membrana após a despolarização e propagação de um potencial de ação em células nervosas e musculares. Portanto, esses canais modulam a frequência e duração do potencial de ação nessas células (MARTENS,

KWAK e TAMKUN, 1999). Os canais Kv2.1, Kv2.2, Kv3.1 e Kv3.2 são responsáveis pela formação de corrente retificadora de K^+ (SONG, 2002).

Kim et al. (2003) observaram que quando células PC12 são submetidas a tratamento com fator de crescimento neural (NGF) ocorre modificação do potencial de membrana que é necessário para ativar canais Kv retificadores. A corrente de K^+ que no grupo controle é ativada quando o potencial de membrana chega a -10mV, nas células tratadas com NGF é disparada em -30mV. Dessa forma, a repolarização é antecipada. Foi também observado aumento da intensidade da corrente elétrica que passa através do canal. Essas modificações foram atribuídas ao aumento da expressão da proteína p62 dentro das células PC12 em virtude do tratamento com NGF.

O NGF torna as células mais excitáveis devido ao aumento de canais dependentes de voltagem que são expressos na membrana das células. O número de canais de Na^+ dependentes de voltagem (KALMAN et al., 1990) e também de canais de Ca^{2+} dos tipos L e N expressos na membrana plasmática são aumentados quando a célula é tratada por NGF.

De acordo com o modelo de regulação do canal Kv retificador por Kim et al. (2003), a proteína p62 atua como uma proteína ligadora entre a subunidade regulatória Kv- β e a isoforma ζ de PKC. Foi observado que o efeito de NGF sobre a curva de ativação da corrente por Kv requer a fosforilação por essa isoforma de PKC (figura 24).

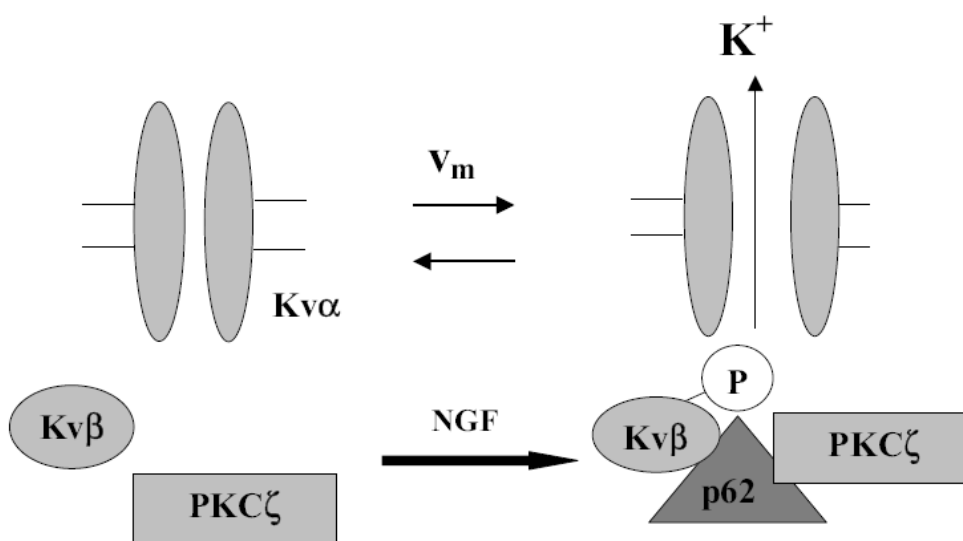


Figura 23 – Modelo de regulação de canais de K^+ retificadores controlados por voltagem pelo complexo Kv β -p62-PKC ζ (KIM et al., 2003).

Nos experimentos realizados para identificar qual isoforma de PKC regula a atividade do canal Kv foram utilizados inibidores de PKC específicos para as isoformas ζ , α e θ e também para PKA. Quando as células foram pré-incubadas com inibidor específico de PKC- ζ , o efeito de NGF sobre a ativação da corrente por Kv foi revertido. Por outro lado, nos experimentos que foram utilizados inibidores das isoformas α e θ de PKC e também o inibidor específico de PKA, o efeito de NGF não foi revertido.

De acordo com o modelo criado por Kim et al. (2003), em células PC12 pré-incubadas com NGF, o complexo protéico formado por Kv β -p62-PKC ζ regula a excitabilidade dessas células. A proximidade da PKC- ζ com o substrato Kv β possibilita a sua fosforilação. A subunidade Kv α também pode ser fosforilada. A fosforilação de Kv β ou Kv α modifica a dependência de voltagem do canal Kv, de modo que a célula repolariza mais rapidamente quando comparada as células controles.

O artigo não analisou se ocorriam modificações na capacidade secretória da célula PC12 em decorrência da alteração da atividade do canal Kv retificador.

Nas células do grupo controle a expressão de p62 encontra-se abaixo do nível crítico para formação do complexo. Portanto, o tratamento com NGF aumenta a expressão dessa proteína permitindo a formação do complexo.

Também foi observado que em células PC12, a secreção de noradrenalina exerce ação parácrina e/ou autócrina induzindo um aumento na expressão de p62. Esse efeito foi observado quando as células foram tratadas com 1 μ M de noradrenalina. Igualmente para o modelo proposto para a célula PC12 tratada com NGF, o efeito de noradrenalina sobre a atividade do canal Kv requer a formação do complexo Kv β -p62-PKC ζ . Portanto, nesse caso, a atividade de PKC- ζ também é requerida (KIM et al., 2005).

Nos nossos experimentos observamos que o DM aumenta a expressão de PKC- ζ nas células cromafins dos ratos diabéticos que não foram tratados com insulina (grupo DTS) quando comparado aos ratos controles. Este efeito não é revertido pelo tratamento com insulina (grupo DTI).

Outro trabalho realizado em nosso laboratório mostrou que após 15 dias da indução do DM, os ratos DTS e DTI apresentaram redução significativa na secreção basal e estimulada por altas concentrações de K⁺ e carbamilcolina. A secreção de

catecolaminas dos DTS foi reduzida em 42,28% e a dos DTI em 48,84% quando comparados aos ratos controles quando as células cromafins foram estimuladas com K^+ . Quando as células foram estimuladas com carbamilcolina a redução nos ratos DTS foi de 28,9% e nos ratos DTI foi de 36,8%. Por outro lado, a secreção estimulada por cafeína foi similar nos três grupos experimentais.

Considerando que K^+ e carbamilcolina têm em comum a ação despolarizante e que a redução na secreção em resposta a esses secretagogos foi similar, os autores sugeriram que esta redução na secreção de catecolaminas pode ser consequência de falhas nos processos elétricos associados à despolarização da membrana plasmática ou nas vias de sinalização disparadas por esta despolarização. Como a secreção induzida por cafeína não foi alterada, foi proposto que o DM não afeta a homeostase dos *pools* intracelulares de Ca^{2+} (manuscrito em preparação).

Por outro lado, Du et al., (2000) estudaram o efeito da redução da expressão de Kvs retificadores em células neuronais do hipocampo. Em seus experimentos, os autores utilizaram um oligonucleotídeo *antisense* que reduz seletivamente a expressão de canais de K^+ retificadores do tipo Kv2.1. Por Western Blot foi observado que houve redução de aproximadamente 90% na expressão desses canais. Os canais Kv2.1 são os principais canais retificadores presentes em neurônios do hipocampo. Nas células tratadas com o *antisense* foi observado que a repolarização da célula foi retardada e o período de tempo em que a célula apresentou aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} foi prolongado.

Portanto, esses dados sugerem que o aumento da expressão de PKC- ζ devido ao DM pode reduzir a intensidade e/ou o tempo da despolarização da célula cromafim. A redução da intensidade da despolarização quer dizer que a variação da voltagem tornaria-se menor, o que impediria a abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo HVA, que necessitam de despolarizações mais elevadas para serem ativados (ARTALEJO, 1995). Consequentemente, o influxo de Ca^{2+} seria reduzido, diminuindo também a capacidade secretória da célula cromafim. Por outro lado, a redução no tempo da despolarização apesar de ativar canais de Ca^{2+} do tipo HVA, permitiria o influxo de Ca^{2+} por pouco tempo. Da mesma forma, a capacidade secretória da célula cromafim seria reduzida.

Enfim, demonstramos que nos ratos DTS ocorre aumento da expressão da isoforma ζ de PKC e que esse efeito do não foi revertido pela insulino-terapia.

Reportamos que em outros trabalhos realizados em nosso laboratório, foi observado que em ratos DTS ocorre diminuição da secreção de catecolaminas pelos ratos doentes, e que esse efeito também não é revertido pelo tratamento com insulina. Na literatura já foi reportado que PKC- ζ modula canais Kv retificadores, diminuindo a sua dependência por voltagem e possivelmente reduzindo a intensidade da despolarização da célula. Sugerimos então que a diminuição na secreção de catecolaminas pelas células cromafins de ratos Wistar DTS e DTI está relacionado com a modulação de canais Kv retificadores por PKC- ζ .

Vários artigos demonstram que PKC- α e - ϵ também participam do processo de secreção de catecolaminas em células cromafins (YANAGITA et al., 2000; SENA et al., 2001, KOBAYASHI et al., 2002; FONTAINHAS, 2005). Em nosso trabalho, atribuímos principalmente a PKC- ζ a causa da redução da capacidade secretória, nas células cromafins devido ao fato de que tanto a expressão dessa isoforma de PKC quanto a capacidade de secreção de catecolaminas não são revertidas pelo tratamento com insulina. Por outro lado, a expressão da PKC- α é revertida e a expressão da PKC- ϵ não é afetada pelo DM.

Podemos ainda citar outros fatores que podem ter interferido na síntese e secreção de catecolaminas em nosso modelo animal de DM, que são a droga utilizada para indução da doença (a STZ), o efeito do DM sobre o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e a insulina injetada nos ratos DTI durante o tratamento.

Konrad et al. (2001) reportou que as células β do pâncreas são especificamente sensíveis à ação da STZ. Não encontramos qualquer artigo que descreva a ação tóxica da STZ em outros tipos de células. Chan et al, (2001) relatou não ter encontrado na literatura qualquer trabalho que cite efeitos tóxicos da STZ sobre o eixo HPA. Apesar disso, não descartamos a possibilidade de que a STZ possa lesar outros tecidos, inclusive o eixo HPA.

Além da possível ação da STZ sobre o eixo HPA, já foi relatado que o DM afeta o funcionamento desse eixo.

O eixo HPA é um componente central na resposta neuroendócrina ao estresse. O hipotálamo quando estimulado secreta o hormônio liberador de corticotropina (CRH) no sistema porta-hipotálamo, que faz o aporte sanguíneo para a parte anterior da hipófise. O CRH estimula a hipófise a secretar o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) na corrente sanguínea. A ACTH faz com que as adrenais secretem glicocorticóides, dentre eles o cortisol. Dentre outras funções, o

cortisol age no hipotálamo para inibir a liberação contínua de CRH (GUYTON e HALL, 2006).

Chan et al. (2001) reportaram que o DM causa a hiperativação do eixo (HPA). Esses autores demonstraram que em ratos diabéticos ocorre o aumento da expressão do RNAm do hormônio liberador de corticotropina (CRH) e também o aumento da concentração plasmática do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e de glicocorticóides. Por outro lado a secreção basal de adrenalina é reduzida. Os autores não observaram alterações na secreção basal de noradrenalina. O tratamento dos ratos doentes com insulina reverteu todas as alterações citadas acima, com exceção do aumento da expressão do mRNA do CRH, que aumentou ainda mais. Os autores sugeriram que a redução na secreção basal de adrenalina pode ter sido causada pela hipoinsulinemia e/ou prolongada elevação dos níveis plasmáticos de glicocorticóides.

Kvetnansky et al. (1993) demonstraram que a exposição crônica de neurônios simpáticos a elevados níveis de glicocorticóides pode prejudicar o funcionamento dessas células. Esse efeito foi evidenciado pela observação de que ratos que tiveram as duas adrenais retiradas e foram implantados com bomba de corticosterona apresentaram concentração plasmática de noradrenalina e precursores de noradrenalina (como por exemplo a dopamina) inferiores ao observado nos ratos que tiveram as duas adrenais retiradas mas não receberam implante, quando ambos foram submetidos a estresse por contenção. Por outro lado, as concentrações plasmáticas desses hormônios foram similares entre os ratos controles e os ratos sem adrenais implantados. Esses resultados sugerem que a corticosterona suprime várias funções simpato-neuronais, tais como a secreção e biossíntese de noradrenalina.

Com relação à ação da insulina, há trabalhos que afirmam e outros que negam que a insulina exerce efeitos diretos sobre as células cromafins (KVETNANSKY et al, 1997; DE ARAÚJO E SOUZA, GARCIA E MATHIAS et al, 1999; CHAN et al, 2005).

Kvetnansky et al. (1997) demonstrou que a insulina possui efeito direto sobre a liberação de catecolaminas pelas células cromafins adrenais *in vitro*. Em seus experimentos, inicialmente os autores verificaram a ligação de insulina a receptores presentes na membrana plasmática das células cromafins de ratos. A presença de receptores específicos para insulina foi confirmada utilizando a técnica de PCR

(Reação em Cadeia da Polimerase). Apesar de demonstrarem a presença de receptores específicos para insulina nas células cromafins, os autores não descartam a hipótese de esse hormônio também se ligue a receptores para fator de crescimento de insulina (IGF).

Posteriormente, os autores estimularam fatias da medula adrenal com diferentes concentrações de insulina, variando de 0,02 a 10 µg/ml durante 10 minutos. Eles observaram que as fatias de medula adrenal ao serem estimuladas com 0,02 a 1,0 µg/ml de insulina não apresentaram modificações na secreção de catecolaminas. Quando as células foram estimuladas com 5 e 10 µg/ml, a secreção aumentava significativamente. Porém, os próprios autores reconhecem que essas concentrações com efeitos estimulatórios são suprafisiológicas.

De Araújo e Souza, Garcia e Mathias também analisaram *in vitro* a secreção de catecolaminas por células cromafins. Eles incubaram as células em 0,75; 7,5 ou 750 µU de insulina/ml de solução. As três concentrações de insulina utilizadas nesse trabalho são consideradas como fisiológicas. Nessas soluções de incubação também foi adicionado glicose, nas concentrações de 0,56mM (baixa concentração de glicose, situação de hipoglicemia) ou 25mM (alta concentração de glicose, situação de hiperglicemia). Os autores não observaram modificações no comportamento secretório das células cromafins. Portanto, a partir dos resultados, eles concluíram que a insulina não exerce efeito agudo direto sobre a secreção de catecolaminas pelas células cromafins.

Chan et al. (2005) avaliaram o efeito da ação da hiperinsulinemia *in vivo*. Eles mensuraram a concentração de adrenalina e noradrenalina no soro de ratos saudáveis e diabéticos após esses animais terem sido submetidos a hiperinsulinemia-euglicemia *clamp* durante 150 minutos. Eles observaram que nos dois grupos experimentais houve um gradual aumento na concentração plasmática de adrenalina no decorrer do experimento, sendo que na última dosagem (150 minutos), essa diferença foi significativa quando comparada com o valor inicial (zero minuto). Por outro lado, não houve diferenças significativas na concentração de adrenalina entre os dois grupos experimentais no início e nem no decorrer do experimento. Com relação a noradrenalina, nenhum dos dois grupos apresentou modificações significativas na concentração plasmática desse hormônio. Também não foram observadas diferenças significativas entre ratos saudáveis e diabéticos. Foi então

sugerido que a hiperinsulinemia pode estimular a secreção de adrenalina, mesmo durante a normoglicemia.

Em nosso trabalho não foi mensurado a insulinemia. De qualquer forma, nos trabalhos anteriormente realizados em nosso laboratório não foi observado aumento da secreção de catecolaminas, e sim uma redução na capacidade secretória tanto dos ratos diabéticos quanto nos ratos doentes que foram tratados com insulina quando comparados aos animais controles.

Já foi relatado que episódios recorrentes de hipoglicemia podem afetar a secreção de catecolaminas em humanos (CRYER, DAVIS e SHAMOON, 2003) e em ratos (CHAN et al., 2002; INOUE et al., 2005). Inouye et al., (2005) reportaram que a redução na secreção de adrenalina devido a recorrentes episódios de hipoglicemia está relacionada com alterações no processo de síntese do hormônio. Em seus experimentos foram utilizados ratos Sprague-Dawley machos. Foi observado que os níveis de mRNA de TH e PNMT foram reduzidos quando comparados ao grupo controle, enquanto a síntese do mRNA de D β H foi aumentada. Para analisar quais fatores estariam relacionados com essa alteração, foi também analisado o nível de mRNA de CRH com o objetivo de avaliar a função do eixo HPA. A síntese de mRNA de receptores para glicocorticóides que são expressos na medula adrenal também foi analisada. Já foi reportado que glicocorticóides elevam a expressão de TH, D β H e PNMT (STACHOWIAK et al, 1988; EVINGER et al, 1992; KIM, PARK e JOH, 1993). Os resultados obtidos não mostraram diferenças significativas entre os grupos controles e tratados e sugerem que a causa da redução da secreção de catecolaminas após hipoglicemias recorrentes não está relacionada com os parâmetros analisados.

Em nosso laboratório estão sendo realizados experimentos com o objetivo de verificar se no modelo animal de DM que utilizamos também ocorre redução da expressão da enzima TH após os animais serem submetidos a episódios de hipoglicemia recorrentes.

No presente trabalho, o esquema de insulinoterapia empregado foi estabelecido após experimentos que consistiram em avaliar qual a dose de insulina deveria ser aplicada e qual horário seria o mais adequado de modo a evitar a ocorrência de episódios de hipoglicemia e hiperglicemia. Portanto, o nosso objetivo era manter a os níveis glicêmicos o mais próximo possível da normoglicemia. As concentrações plasmáticas de triglicerídeos e frutamina foram mensurados e

sugerem que o tratamento com insulina estabelecido foi eficaz no controle glicêmico dos ratos diabéticos. Porém consideramos que episódios de hiper e hipoglicemias ocorreram durante os 15 dias de tratamento dos animais. A permanência dos níveis glicêmicos dentro da faixa de normoglicemia não constitui uma realidade, mesmo no tratamento de humanos diabéticos com insulina. Portanto, não descartamos a possibilidade de que a ocorrência de episódios de hipoglicemia em nossos ratos DTI possa ter colaborado para a redução da capacidade secretória de catecolaminas pelas células cromafins adrenais desses animais.

Resumindo, mostramos que o DM exerce efeitos diferentes sobre a expressão de isoformas de PKC em células cromafins adrenais de ratos. A expressão da isoforma α é reduzida, a da isoforma ζ é aumentada, enquanto a expressão da isoforma ε não é alterada. Estabelecemos um protocolo de insulino terapia para ratos Wistar diabéticos que foi eficaz no controle glicêmico dos animais DTI. Observamos que nos animais submetidos a insulino terapia, a expressão da PKC- α foi revertida enquanto a expressão da PKC- ζ permaneceu elevada. A expressão da isoforma ε continuou inalterada. Em trabalhos anteriormente realizados em nosso laboratório, foi observado que o conteúdo total de catecolaminas é reduzido nos ratos DTS e que esse efeito do DM é revertido nos animais DTI. Porém não foi observada redução significativa na expressão de TH nos ratos diabéticos não submetidos à insulino terapia. Portanto sugerimos que a isoforma α está envolvida na regulação da atividade da enzima TH. Em outros trabalhos realizados em nosso laboratório também foi demonstrado que nos ratos DTS ocorre a redução da secreção de catecolaminas. Porém, a insulino terapia não reverte a capacidade secretória de ratos DTI quando suas células cromafins são estimuladas por secretagogos que causam despolarização da membrana plasmática. Sugerimos então que a isoforma ζ , que também não tem sua expressão revertido nos ratos DTI, pode estar envolvida em mecanismos regulatórios dos processos elétricos de membrana, sendo a modulação do funcionamento de canais Kv retificadores um desses possíveis mecanismos.

5 CONCLUSÕES

- O tratamento com estreptozotocina na dose de 50mg/Kg de massa corporal dos ratos foi eficiente em induzir o DM;
- O protocolo de tratamento com insulina estabelecido é eficaz no controle glicêmico dos ratos diabéticos;
- O tratamento com insulina restabelece os níveis normais de colesterol e frações c-LDL e c-VLDL nos animais diabéticos, corroborando a eficiência do tratamento;
- As células cromafins de rato expressam as isoformas α , ϵ e ζ de PKC;
- Dentre as isoformas de PKC estudadas, a isoforma α é a mais expressada, seguida por ζ e depois por ϵ ;
- O DM exerce efeitos diferentes sobre a expressão de isoformas de PKC em células cromafins adrenais de ratos. A expressão da isoforma α é reduzida, a da isoforma ζ é aumentada, enquanto a expressão da isoforma ϵ não é alterada;
- O tratamento dos ratos diabéticos com insulina é capaz de reverter a expressão da PKC- α , mas não reverte a expressão da isoforma ζ . A expressão da isoforma ϵ não é modificada pela insulino terapia;
- A redução da expressão de PKC- α pode estar relacionada com a diminuição da síntese de catecolaminas pelas células cromafins adrenais de ratos diabéticos. Por outro lado, a redução da secreção de catecolaminas por essas células, observada nos ratos diabéticos e diabéticos tratados com insulina, provavelmente é devido ao aumento da expressão de PKC- ζ .

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J. S. 2003. **Imunologia Celular e Molecular**, 4ª edição, Rio de Janeiro. Editora Revinter Ltda.

ABE, M.K.; KUO, W.L.; HERSHENSON, M.B.; ROSNER, M.R. 1999. Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a c-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth. **Molecular and Cell Biology**, **19(2)**: 1301-1312.

AHIMA, R.S. 2005. Central actions of adipocyte hormones. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, **16(7)**: 307-313.

AHN, N.C.; CAMPBELL, J.S.; SEGER, R.; JENSEN, A.M.; CRAVES, L.M.; KREBS, E.C. 1993. Metabolic labelling of MAP kinase in A431 cells demonstrates phosphorylation on serine and threonine residues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, **90(11)**: 5143-5147.

AKIMOTO, K.; NAKAYA, M.; YAMANAKA, T.; TANAKA, J.; MATSUDA, S.; WENG, Q.P.; AVRUCH, J.; OHNO, S. 1998. Atypical protein kinase C λ binds and regulates p70 S6 kinase. **The Biochemical Journal**, **335(Pt2)**: 417-424.

AKITA, Y.; OHNO, S.; YAJIMA, Y.; KONNO, Y.; SAIDO, T. C.; MIZUNO, K.; CHIDA, K.; OSADA, S.; KUROKI, T.; KAWASHIMA, S.; SUZUKI, K. 1994. Overproduction of a Ca²⁺-independent protein kinase C isozyme, nPKC epsilon, increases the secretion of prolactin from thyrotropin-releasing hormone-stimulated rat pituitary GH4C1 cells. **The Journal of Biological Chemistry**, **269(6)**: 4653- 4660.

AKITA, Y. 2002. Protein Kinase C- ϵ (PKC- ϵ): Its unique structure and functions. 2002. **Journal of Biochemistry**, **132(6)**: 847- 852.

ALAIN, C.A.; POON, L.S.; CAHN, C.S.G.; RICHMOND, W.; FU, P.C. 1974. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemistry**, **20(4)**: 470-475.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. 2006. **Biologia molecular da célula**. 4ª edição, Porto Alegre, Editora Artmed, p. 831-906.

ALI, I; SARNA, S. K. 2002. Selective modulation of PKC isozymes by inflammation in canine colonic circular muscle cells. **Gastroenterology**, **122(2)**: 483- 491.

ALMHOLT, K.; ARKHAMMAR, O. G.; THASTRUP, O.; TULLIN, S. 1999. Simultaneous visualization of the translocation of protein kinase C α -green fluorescent protein hybrids and intracellular calcium concentrations. The **Biochemical Journal**, **337(Pt2)**: 211-218.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. 2008. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, **31(S1)**: S55-S59.

ANDERSEN, M.L.; D'ALMEIDA, V.; KO, G.M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P.J.F.; DE MAGALHÃES, L.E.; TUFIK, S. 2004. **Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais de Experimentação**, 1^a edição, São Paulo, Unifesp.

ARIMURA, A.; SHIODA, S. 1995. Pituitary adenylate cyclase polypeptide (PACAP) and its receptors: neuroendocrine and endocrine interaction. **Frontiers in Neuroendocrinology**, **16(1)**: 53-88.

ARTALEJO, A.R. 1995. **Electrical properties of adrenal chromaffin cells**. In: The electrophysiology of neuroendocrine cells. USA, CRC Press, 259-299.

AUNIS, D.; LANGLEY, K. 1999. Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. **Acta Physiologica Scandinavica**, **167(2)**: 89-97.

BABAZONO, T.; KAPO-DREZGIC, J.; DLUGOSZ, J.A.; WHITESIDE, C. 1998. Altered expression and subcellular localization of diacylglycerol-sensitive protein kinase C isoforms in diabetic rat glomerular cells. **Diabetes**, **47(4)**: 668-676.

BAKER, J.R.; METCALF, P.A.; JOHNSON, R.N.; NEWMAN, D.; RIETZ, P. 1985. Use of protein-based standards in automated colorimetric determinations of fructosamine in serum. **Clinical Chemistry**, **31(9)**: 1550-1554.

BALCIUNAITE, E.; JONES, S.; TOKER, A.; KAZLAUSKAS, A. 2000. PDGF initiates two distinct phases of protein kinase C activity that make unequal contributions to the Go to S transition. **Current Biology**, **10(5)**: 261- 267.

BALDA, C. A.; PACHECO-SILVA, A. 1999. Aspectos imunológicos do diabetes melito tipo 1. **Revista da Associação Médica Brasileira**, **45(2)**: 175-180.

BARCELÓ, A.; AEDO, C.; RAJPATHAK, S.; ROBLES, S. 2003. The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean. **Bulletin of the World Health Organization**, **81(1)**:19-27.

BEN-AMI, H.; NAGACHANDRAN, P.; MENDELSON, A.; EDOUTE, Y. 1999. Drug-induced hypoglycemic coma in 102 diabetic patients. **Archives of internal medicine**, **159(3)**: 281-284.

BERRA, E.; DIAZ-MECO, M.T.; LOZANO, J.; FRUTOS, S.; MUNICK, M.M.; SANCHEZ, P.; SANZ, L.; MOSCAT, J. 1995. Evidence for a role of MEK and MAPK during signal transduction by protein Kinase C ζ . **EMBO Journal**, **14**: 6157-6163.

BERGMEYER, H.U.; BERNT, E. 1974. Determination of glucose with glucose oxidase and peroxidase. In: BERGEYER, H. U. Ed. **Methods of Enzymatic Analysis**, Ed. Verlag Chemie: 1105-1212.

BLENIS, J. 1993. Signal transduction via the MAP Kinases: proceed at your own RSK. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, **1(13)**: 5889-5892.

BOARDER, M.R.; CHALLISS, R. A. J. 1992. Role of protein kinase C in the regulation of histamine and bradykinin stimulated inositol polyphosphate turnover in adrenal chromaffin cells. **Brasilian Journal of Pharmacology**, **107(4)**: 1140-1145.

BOBROVSKAYA, L.; ODELL, A.; LEAL, R.B.; DUNKLEY, P.R. 2001. Tyrosine hydroxylase phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells: the role of MAPKs after angiotensin II stimulation. **Journal of Neurochemistry**, **78(3)**: 490-493.

BOOTH, D. A. 1972. Some characteristics of feeding during streptozotocin-induced diabetes in the rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, **80(2)**: 238-249.

BORGHINI, I.; ANIA-LAHUERTA, A.; REGAZZI, R.; FERRARI, G.; GJINOVCI, A.; WOLLHEIM, C.B.; PRALONG, W.F. 1994. Alpha, beta I, beta II, delta and epsilon

protein kinase C isoforms and compound activity in the sciatic nerve of normal and diabetic rats. **Journal of Neurochemistry**, **62(2)**: 686-696.

BOULTON, T.G.; COBB, M.H. 1991. Identification of multiple extracellular signal-regulated (ERKs) with antipeptide antibodies. **Cell Regulation**, **2(2)**: 357-371.

BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle-dye binding. **Analytical Biochemistry**, **72**: 248-254.

BROWNLEE, M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, **414**: 813-820.

BURGOYNE, R.D. 1991. Control of exocytosis in adrenal chromaffin cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1071 (2)**: 174-202.

BURSELL, S.E.; TAKAGI, C.; CLERMONT, A.C.; TALAGI, H.; MORI, F.; ISHII, H.; KING, G. 1997. Specific retinal diacylglycerol and protein kinase C Beta isoform modulation mimics abnormal retinal hemodynamics in diabetic rats. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, **38(13)**: 2711-2720.

CALLEWAERT, G.; JOHNSON, R.G.; MORAD, M. 1991. Regulation of the secretory response in bivariate chromaffin cells. **American Journal Physiology Cell Physiology**, **260(4)**: 851-860

CAMERON, N.E.; COTTER, M.A.; JACK, A.M.; BASSO, M.D.; HOHMAN, T.C. 1999. Protein kinase C effects on nerve function, perfusion, Na⁺, K⁺-ATPase activity and glutathione content in diabetic rats. **Diabetologia**, **42(9)**: 1120-1130.

CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L.R.; ROSTAS, J.A.; SUBKLEY, P.R. 2003. Histamine activates tyrosine hydroxylase in bovine adrenal chromaffin cells through a pathway involves ERK1/2 but not p 38 or JNK. **Journal of Neurochemistry**, **84(3)**: 453-458.

CASAMAYOR, A.; MORRICE, N.A.; ALESSI, N.A. 1999. Phosphorylation of Ser-241 is essential for the activity of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1:

identification of five sites of phosphorylation *in vivo*. **The Biochemical Journal**, **342**(PT 2): 287-292.

CASTRO, J. M.; BALAGURA, S. 1975. Meal patterning in the streptozotocin – diabetic rat. **Physiology and Behavior**, **15**(3): 259-263.

CATTERALL, W.A.; HULME, J.T.; JIANG, X.; FEW, W.P. 2006 Regulation of sodium and calcium channels by signaling complexes. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, **26**(5-6): 577-598.

CHAN, O.; CHAN, S.; INOUE, K.; VRANIC, M.; MATTHEWS, S.G. 2001. Molecular regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in streptozotocin - induced diabetes: Effects of insulin treatment. **Endocrinology**, **142**(11): 4872-4879.

CHAN, O.; CHAN, S.; INOUE, K.; SHUM, K.; MATTHEWS, S.G.; VRANIC, M. 2002. Diabetes impairs hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) responses to hypoglycemia, and insulin treatment normalizes HPA but not epinephrine responses. **Diabetes**, **51**(6):1681-1689.

CHAN, O.; INOUE, K.; AKIRAV, E.; PARK, E.; RIDDELL, M.C.; VRANIC, M.; MATTHEWS, S.G. 2005. Insulin alone increase hypothalamo-pituitary-adrenal activity, and diabetes lowers peak stress responses. **Endocrinology**, **146**(3): 1382-1390.

CHEN, X.K.; WANG, L.C.; ZHOU, Y.; CAI, Q.; PRAKRIYA, M.; DUAN, K.L; SHENG, Z.H.; LINGLE, C.; ZHOU, Z. 2005. Activation of GPCRS modulates quantal size in chromaffin cells through G $\beta\gamma$ and PKC. **Nature Neuroscience**, **8**(9): 1160-1168.

CHOI, H.J.; PARK, S.Y.; HWANG, O. 1999. Differential involvement of PKA and PKC in regulation of catecholamine enzyme genes by PACAP. **Peptides**, **20**(7): 817-822.

CHOU, M.M.; HOU, W.; JOHNSON, J.; GRAF-HAM, K.L.; LEE, M. H.; CHE, C.S.; NEWTON, C. A.; SCHAFFHAUSEN, B.S.; TOKER, A. 1998. Regulation of protein kinase C ζ by PI 3-Kinase and PDK-1. **Current Biology**, **8**(19): 1069- 1077.

COBB, M.H. 1999. MAP Kinase pathways. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, **71**(3-4): 479-500.

COPPEY, L.J.; GELLETT, J.S.; DAVIDSON, E.P.; DUNLAP, J.A.; LUND, D.D. and YOREK, M.A. 2001. Effect of antioxidant treatment of streptozotocin-induced diabetic rats on endoneurial blood flow, motor nerve conduction velocity, and vascular reactivity of epineurial arterioles of the sciatic nerve. **Diabetes** **50 (8)**: 1927-1937.

COX, M.E.; PARSONS, S.J. 1997. Roles for protein kinase C and mitogen-activated protein kinase in nicotine-induced secretion from bovine adrenal chromaffin cells. **Journal of Neurochemistry**, **69(3)**: 1119-1130.

CRYER, P.E. 1994. Hypoglycemia: The limiting factor in the management of IDDM. **Diabetes**, **43(11)**: 1378-1389.

CRYER, P.E. 1997. Hierarchy of physiological responses to hypoglycemia: relevance to clinical hypoglycemia in type I (insulin dependent) diabetes mellitus. **Hormone and Metabolic Research**, **29(3)**: 92-96.

CRYER, P.E. 2004. Diverse causes of hypoglycemia-associated autonomic failure in diabetes. **The New England Journal of Medicine**, **350(22)**: 2272-2279.

CRYER, P.E. 2006. Hypoglycemia in diabetes: pathophysiological mechanisms and diurnal variation. **Progress in Brain Research**, **153**: 361-365.

CRYER, P.E. 2007. Hypoglycemia, functional brain failure, and brain death. **The Journal of Clinical Investigation**, **117(4)**: 868-870.

CRYER, P.E.; DAVIS, S.N.; SHAMOON, H. 2003. Hypoglycemia in diabetes. **Diabetes Care**, **26(6)**: 1902-1912.

CURTIS, T.M.; SCHOLFIELD, C.N. 2004. The role of lipids and protein kinase Cs in the pathogenesis of diabetic retinopathy. **Diabetes/ Metabolism Research and Reviews**, **20(1)**: 28-43.

DE ARAUJO E SOUZA, K. L.; GARCIA, R. M. G.; MATHIAS, P. C. F. 1999. Glucose does not affect catecholamine stimulus-secretion coupling in rat adrenal medulla: relationship to low changes in osmolarity and to insulin. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, **105(3)**: 200-212.

DECOY, D. L.; SNAPPER, J. R.; BREYER, M. D. 1995. Antisense DNA down-regulates protein kinase C-epsilon and enhances vasopressin-stimulated Na⁺ absorption in rabbit cortical collecting duct. **The Journal of Clinical Investigation**, **95(6)**: 2749-2756.

DEMARIA-PESCE, V. H.; NICOLAIDIS, S. 1998. Mathematical determination of feeding patterns and its consequence on correlational studies. **Physiology and Behavior**, **65(1)**: 157-170.

DEMPSEY, E.C.; NEWTON, A.C.; MOCHLY-ROSE, D.; FIELDS, A.P.; REYLAND, M.E.; INSEL, P.A. MESSING, R.O. 2000. Protein Kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. **American Journal of Physiology, Lung Cellular and Molecular Physiology**, **279(3)**: L429-L438.

DIABETES CONTROL and COMPLICATIONS TRIAL (DCCT) RESEARCH GROUP. 1997. Hypoglycemia in the diabetes control and complications trial. **Diabetes**, **46(2)**: 271-286.

DOUGHERTY, M.K.; MÜLLER, J.; RITT, D.A.; ZHOU, M.; COPELAND, T.D.; CONRADS, T.P.; VEENSTRA, T.D.; LU, K.P.; MORRISON, D.K. 2005. Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. **Molecular Cell**, **21(2)**: 215-224.

DOUGLAS, C.R. 2000. **Tratado de fisiologia aplicado á ciência da saúde**. 4^a edição, São Paulo, Editora Robe.

DREHER, D.; JORNOT, L.; JUNOD, A.F. 1995. Effects of hypoxanthine-xanthine oxidase on Ca²⁺ stores and protein synthesis in human endothelial cells. **Circulation Research** **76(3)**: 388-395, 1995.

DU, J.; HAAK, L. L.; PHILLIPS-TANSEY, E.; RUSSELL, J. T.; McBAIN, C. 2000. Frequency-dependent regulation of rat hippocampal somato-dendritic excitability by the K⁺ channel subunit Kv2.1. **Journal of Physiology**, **522(1)**:19-31.

DUNKLEY, P.R.; BOBROVSKAYA, L.; GRAHAM, M.E.; NAGY-FELSOBUKI, E.I.V.; DICKSON, P.W. 2004. Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. **Journal of Neurochemistry**, **91(5)**: 1025-1043.

EBARA, T.; HIRANO, T.; MAMO, J.C.L.; SAKAMAKI, R.; FURUKAWA, S.; NAGANO, S.; TAKAHASHI, T. 1994. Hiperlipidemia in streptozotocin-diabetic hamster as a model for human insulin deficient diabetes: Comparasion to streptozotocin-diabetic rats. **Metabolism**, **43(3)**: 299-305.

EBERHARD, D.A.; HOLZ, R.W. 1988. Intracellular Ca^{2+} activates phospholipase C. **Trends in Neurosciences**, **11(12)**: 517-520.

EDWARDS, S.L.; ANDERSON, C.R.; SOUTHWELL, B.R.; McALLEN, R.M. 1996. Distinct preganglionic neurons innervate noradrenaline and adrenaline cells in the cat adrenal medulla. **Neuroscience**, **70(2)**: 825-832.

EVCIMEN, N.D.; KING, G.L. 2007. The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. **Pharmacological Research**, **55(6)**: 498-510.

EVINGER, M.J.; TOWLW, A.C.; PARK, D.H.; LEE, P.; JOH, T.H. 1992. Glucocorticoids stimulate transcription of the rat phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT) gene in vivo and in vitro. **Cellular and Molecular Neurobiology**, **12(3)**:193-215.

FERREL, J.E.Jr. 1996. Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded in puts into switch-like outputs. **Trends in Biochemical Sciences**, **21(12)**: 460-466.

FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. 1982. Serum triglycerides determined colorimetrically with na enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clinical Chemistry**, **28(10)**: 2077-2280.

FONTAINHAS, A.M.; OBUKHOV, A.G.; NOWYCKY, M.C. 2005. Protein kinase Ca modulates depolarization-evoked changes of intracellular Ca^{2+} concentration in a rat pheochromocytoma cell line. **Neuroscience**, **133(2)**: 393-403.

FRIEDEWAL, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, **18(6)**: 499-502.

FUSHIMI, H.; INOUE, T.; MATSUYAMA, Y.; KISHINO, B.; KAMEYAMA, M.; FUNAKAWA, S.; TOCHINO, Y.; YAMATODANI, A.; WADA, H.; MINAMI, T. 1988.

Impaired catecholamine secretion as a cause of diabetic autonomic neuropathy. **Diabetes Research and Clinical Practice**, **4(4)**: 303-307.

GALAN, B.E.; TACK, C.J.; WILLEMSSEN, J.J.; SWEEP, C.G.J.; SMITS, P. LENDERS, W.M. 2004. Plasma metanephrine levels are decreased in type 1 diabetic patients with a severely impaired epinephrine response to hypoglycemia, indicating reduced adrenomedullary stores of epinephrine. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, **89(5)**: 2057-2061.

GALLEGO, M.; SETIÉN, R.; IZQUIERDO, M.J.; CASIS, O.; CASIS, E. 2003. Diabetes-induced biochemical changes in central and peripheral catecholaminergic systems. **Physiological Research**, **52(6)**: 735-741.

GARCIA, A.G.; GARCIA-DE-DIEGO, A.M.; GANDIA, L.; BORGES, R.; GARCIA-SANCHO, J. 2006. Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. **Physiological Reviews**, **86(4)**: 1093-1131.

GARCIA, R.M.G. **A regulação da secreção de catecolaminas em células cromafins**. Rio de Janeiro, Curso de Mestrado e Doutorado em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, 1998. 110p. (Tese de Doutorado em Ciências - Biologia Celular).

GARCIA, R.M.G. **O efeito da hiperglicemia sobre a síntese e secreção de catecolaminas e a expressão de isoformas de proteína quinase C em células cromafins da medula supra-renal de ratos diabéticos**. Juiz de Fora, Relatório Final de Projeto de Pesquisa enviado ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq). 2004. 49p.

GARDNER, A.M.; VAILLANCOURT, R.R.; LANGE,-CARTE, C.C.; JOHNSON, C.L. 1994. MEK 1 phosphorylation by MEK kinase, Raf and mitogene-activated protein kinase analysis of phosphorylation and regulation of activity.

GELAIN, D.P.; MOREIRA, J.C.F.; BEVILAQUA, L.R.M., DICKSON, P.W.;DUNKLEY, P.R. 2007. Retinol activates tyrosine hydroxylase acutely by increasing the phosphorylation of serine 40 and then serine 31 in bovine adrenal chromaffin cells. **Journal of Neurochemistry**, **103(6)**: 2369-2379.

GELLING, R.W. 2006. Diabetic hyperphagia – ghrelin in the driver's seat. **Endocrinology**, **147(6)**: 2631-2633.

GEORG, A. E.; DUNCAN, B. B.; TOSCANO, C. M.; SCHMIDT, M. I., MENGUE, S.; DUARTE, C.; POLANCZYK, C. A. 2005. Economic analysis of a screening program for diabetes mellitus in Brazil. **Revista Saúde Pública**, **39 (3)**: 452-460.

GERASIMENKO, J.V.; MARUYAMA, Y.; YANO, K.; DOLMAN, N.J.; TEPIKIN, A.V.; PETERSEN, O.H. GERASIMENKO, O.V. 2003. NAADP mobilizes Ca^{2+} from a thapsigargin-sensitive store in the nuclear envelope by activating ryanodine receptors. **The Journal of Cell Biology**, **163(2)**: 271-282.

GILES, T.D.; OUYANG, J.; KERUT, E.K.; GIVEN, M.B.; ALLEN, G.E.; McLLWAIN, E.F.; GREENBERG, S.S. 1998. Changes in protein kinase C in early cardiomyopathy and in gracilis muscle in the BB/Wor diabetic rat. **American Journal of Physiology**, **274(1 Pt 2)**: H295-H307.

GILMAN, A.G.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. 2001. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10ª edição, Rio de Janeiro, Editora McGraw-Hill Interamericana do Brasil.

GLENDINNING, J.I.; SMITH, J.C. 1994. Consistency of meal patterns in laboratory rats. **Physiology & Behavior**, **56(1)**, 7-16.

GOESTEMEYER, A.K.; MARKS, J.; SRAI, S.K.; DEBNAM, E.S; UNWIN, R.J. 2007. GLUT-2 protein at the rat proximal tubule brush border membrane correlates with protein kinase C (PKC)- beta and plasm glucose concentration. **Diabetologia**, **50(10)**: 2209-2217.

GOLDIN, A.L. 2001. Resurgence of sodium canal channel research. **Annual Review Physiology**, **63**: 871-894.

GONG, J.; BEZANILLA, M.; HUIZEN, R.V.; DERIN, R.; LIM, M. 1999. Differential stimulation of PKC phosphorylation of potassium channels by ZIP1 and ZIP2. **Science**, **285(5433)**: 1565-1569.

GRAHAM, M.E.; FISHER, R.J.; BURGOYNE, R.D. 2000. Measurement of exocytosis by amperometry in adrenal chromaffin cells: effects of clostridial neurotoxins and activation of protein kinase C on fusion pore kinetics. **Biochimie**, **82(5)**: 469-479.

GRANADOS, G.; GARAY-SEVILLA, M.E.; MALACARA, J.M.; WRÓBEL-ZASADA, K.; RIVIERA-CISNEROS, A. 2000. Plasma epinephrine and norepinephrine response to stimuli in autonomic neuropathy of type 2 diabetes mellitus. **Acta diabetologica**, **37(2)**: 55-60.

GRANESS, A.; ADOMEIT, A.; LUDWING, B.; MULLER, W.D.; KAUFMANN, R.; LIEBMANN, C. 1997. Novel bradykinin signalling in PC-12 cells: stimulation of the cAMP pathway leads to cAMP-mediated translocation of protein kinase C epsilon. **The biochemical Journal**, **327(Pt 1)**: 147-154.

GREENE, D.A.; SIMA, A.A.F.; STEVENS, M.J. FELDMAN, E.L.; LATTIMER, S.A. 1992. Complications: neuropathy, pathogenetic considerations. **Diabetes Care**, **15(12)**: 1902-1925.

GULBIS, J. M.; ZHOU, M.; MANN, S.; MACKINNON, R. 2000. Structure of the cytoplasmic beta subunit-T1 assembly of voltage-dependent K⁺ channels. **Science**, **289(5476)**: 123 – 127.

GUYTON, A.C.; HALL, J. E. 2006. **Tratado de fisiologia médica**, 11^a edição, Rio de Janeiro, Editora Elsevier, 2006.

HA, Y.C.; BARTER, P.J. 1982. Differences in plasma cholesteryl ester transfer activity in sixteen vertebrate species. **Comparative Biochemistry and Physiology**, **71(2)**: 265-269.

HAGEMANN, C.; RAPP, U.R. 1999. Isozyme-specific functions of Raf kinases. **Experimental Cell Research**, **253(1)**: 34-46.

HAMADA, Y.; NAKAMURA, J.; NARUSE, K.; KOMORI, T.; KATO, K.; KASUYA, Y.; NAGAI, R.; HORIUCHI, S. and HOTTA, N. 2000. Epalrestat, an aldose reductase inhibitor, reduces the levels of N-epsilon-(carboxymethyl)lysine protein adducts and their precursors in erythrocytes from diabetic patients. **Diabetes Care** **23(10)**: 1539-1544.

HAMELINK, C.; TJURMINA, O.; DAMADZIC, R.; YOUNG, W.S.; WEIHE, E.; LEE, L. E. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a sympathoadrenal neurotransmitter involved in catecholamine regulation and glucohomeostasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **99(1)**: 461-466.

HART, J.T., FREAS, W.; MCKENZIE, M.E.; MULDOON, S.M. 1988. Adrenergic nerve function and contractile activity of the caudal artery of the streptozotocin diabetic rat. **Journal of the Autonomic Nervous System**, **25(1)**: 49-57.

HAYASHI, A.; SEKI, N.; HATTORI, A.; KOZUMA, S.; SAITO, T. 1999. PKC ν , a new member of the protein kinase C family, composes a fourth subfamily with PKC μ . **Biochimica et Biophysica Acta**, **1450(1)**: 99-106.

HILSTED, J. 1995. Catecholamine and diabetic autonomic neuropathy. **Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association**, **12(4)**: 296-297.

HIRAI, T.; CHIDA, K. Protein kinase C ζ (PKC ζ): Activation mechanisms and cellular functions. 2003. **Journal of Biochemistry**, **133 (1)**: 1- 7

HUMBERT, J.P.; MATTER, N.; ARTAULT, J.C.; KÖPPLER, P.; MALVIYAS. A.N. 1996. Inositol 1,4,5-Trisphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane vindicating regulation of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-trisphosphate. **The Journal of Biological Chemistry**, **271(1)**: 478-485.

HUWILWER, A.; FABBRO, D.; PFEILSCHIFTER, J. 1998. Selective ceramide binding to protein kinase C- α and - δ isozymes in retinal mesangial cells. **Biochemistry**, **37**: 14556-14562.

INOBUCHI, T.; BATTI, R.; HANDLER, E.; SPORTSMAN, J.R.; HEATH, W.; KING, G.L. 1992. Preferential elevation of protein kinase C isoform β II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: Differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. **Proceedings of the National Academy of the United States of the American**, **89(22)**: 11059-11063.

INOUE, K.E.; CHAN, O.; YUE, J.T.Y.; MATTHEWS, S.G.; VRANIC, M. 2005. Effects of diabetes and recurrent hypoglycemia on the regulation of the sympathoadrenal system and hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, **288(2)**: E422-429

JAKEN, S. 1996. Protein kinase C isozymes and substrates. **Current Opinion in Cell Biology**, **8(2)**: 168-173.

JAKUS, V.; RIETBROCK, N. 2004. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. **Physiological Research**, **53(2)**: 131-142.

JOBAGY, Z.; OLAH, Z.; PETROVICS, G.; EIDEN, M.V.; LEVERETT, B.D.; DEAN, N.M.; ADERSON, W.B. 1999. Up-regulation of the Pit-2 phosphate transport/retrovirus receptor by protein kinase C epsilon. **The Journal of Biological Chemistry**, **274(11)**: 7067-7071.

JOHNSON, R. F.; JOHNSON, A. K. 1990. Light/Dark cycle modulates food to water intake ratios in rats. **Physiology & Behavior**, **48(5)**, 707-711.

JOHNSON, R.N.; METCALF, P.A.; BAKER, J.R. 1983. Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. **Clinica Chimica acta**, **12(1)**: 87-95.

KAJIMOTO, T.; OHMORI, S.; SHIRAI, Y.; SAKAI, N.; SAITO, N. 2001. Subtype-specific translocation of the δ subtype of protein kinase C and its tyrosine phosphorylation induced by ceramide in HeLa cells. **Molecular and Cellular Biology**, **21(5)**: 1769-1783.

KALMAN D.; WONG, B.; HORVAL, A. E.; CLINE, M. J.; O'LAGUE, P. H. 1990. Nerve growth factor acts through cAMP-dependent protein kinase to increase the number of sodium channels in PC12 cells. **Neuro**, **4(3)**: 355 - 366.

KANG, N.; ALEXANDER, G.; PARK, J.K.; MAASCH, C.; BUCHWALOW, I.; LUFT, F.C. and HALLER, H. 1999. Differential expression of protein kinase C isoforms in streptozotocin-induced diabetic rats. **Kidney International**, **56(5)**: 1737-1750.

KASHIWAGI, K.; SHIRAI, Y.; SAKAI, N.; KURIYAMA, M.; SAITO, N. 2002. Importance of C1B domain for lipid messenger-induced targeting of protein kinase C. **The Journal of Biological Chemistry**, **277(20)**: 18037-18045.

KAWANO, Y.; RINCON, J.; SOLER, A.; RYDER, J.W.; NOLTE, L.A.; ZIERATH, J.R.; WALLBERG-HENRIKSSON, H. 1999. Changes in glucose transport and protein kinase C beta 2 in rat skeletal muscle induced by hyperglycaemia. **Diabetologia**, **42(9)**: 1071-1079.

KHIROUG, L.; SOKOLOVA, E.; GINIATULLIN, R.; AFZALOV, R.; NISTRİ, A. 1998. Recovery from desensitization of neuronal nicotinic acetylcholine receptors of rat chromaffin cells is modulated by intracellular calcium through distinct second messengers. **Journal of Neuroscience**, **18(7)**: 2458-2466.

KIM, K.T.; PARK, D.H.; JOH, T.H. 1993. Parallel up-regulation of catecholamine biosynthetic enzymes by dexamethasone in PC12 cells. **Journal of Neurochemistry**, **60**: 946-951.

KIM, Y.; PARK, M.K.; UHM, D.Y.; SHIN, J.; CHUNG, S. 2003. Modulation of delayed rectifier potassium channels by protein kinase C ζ -containing signaling complex in pheochromocytoma cells. **Neuroscience**, **125(2)**: 359-368.

KIM, Y.; PARK, M.K.; UHM, D.Y.; SHIN, J.; CHUNG, S. 2005. Modulation of delayed rectifier potassium channels by α_1 -adrenergic activation via protein kinase C ζ and p62 in PC 12 cells. **Neuroscience Letters(1)**, **387**: 43- 48.

KIMBERLY, M.M.; LEARY, E.T.; COLE, T.G.; WAYMACK, P.P. 1999. Selection, validation, standardization, and performance of a designated comparison method for HDL-cholesterol for use in the cholesterol reference method laboratory network. **Clinical Chemistry**, **45(10)**: 1803-1812.

KOBAYASHI, H.; SHIRAISHI, S.; YANAGITA, T.; YOKOO, H.; YAMAMOTO, R.; MINAMI, S.C.; SAITOH, T.; WADA, A. 2002. Regulation of voltage-dependent sodium channel expression in adrenal chromaffin cells: Involvement of multiple calcium signaling pathways. **Annals of New York Academy of Science**, **971**: 127-134.

KOBAYASHI, T.; OISHI, K.; HAYASHI, Y.; MATSUMOTO, T.; KAMATA, K. 2006. Changes in aortic endothelial gene expression and relaxation responses following chronic short-term insulin treatment in diabetic rats. **Atherosclerosis**, **185(1)**: 47-57.

KONRAD, R.J.; MIKOLAENKO, I.; TOLAR, J.F.; LIU, K; KUDLOW, J.E. 2001. The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: Inhibition of pancreatic β -cell O-GlcNAC-selective N-acetyl- β -D-glucosaminidase. **The Biochemical Journal**, **356(Pt 1)**: 31-41.

KOREC, R. 1989. Spontaneous and experimental models of human juvenile diabetes mellitus. **Ceskoslovenská Pediatrie**, **44(5)**: 263-267.

KOYA, D.; JIROUSEK, M.R.; LIN, Y.W.; ISHII, H.; KUBOKI, K.; KING, G.L. 1997. Characterization of protein kinase C β isoform activation on the gene expression of transforming growth factor- β , extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. **The Journal of Clinical Investigation**, **100(1)**: 115-126.

KOYA, D.; KING, G.L. 1998. Protein Kinase C activation and the development of diabetic complications. **Diabetes**, **47(6)**: 859-866.

KVETNANSKY, R.; FUKUHARA, K.; PACAK, K.; CIZZA, G. GOLDSTEIN, D.S.; KOPIN, I.J. 1993. Endogenous glucocorticoids restrain catecholamine synthesis and release at rest and during immobilization stress in rats. **Endocrinology**, **133(3)**: 1411-1419.

KVETRANSKY, R.; RUSNAK, M.; GASPERIKOVA, D.; JELOKOVA, J.; ZORAD, S.; VIETOR, I.; PACAK, K.; SEBOKOVA, E.; MACHO, L.; SABBAN, E.L; KLIMES, I. 1997. Hyperinsulinemia and sympathoadrenal system activity in the rat. **Annals of New York Academy of Sciences**, **827(1)**: 118-134.

LANGLEY, K.; AUNIS, D. 1984. Ultrastructural immunocytochemical demonstration of D2-protein in adrenal medulla. **Cell and Tissue Research**, **238(3)**: 497-502.

LAWRENCE, M.C.; JIVAN, A.; SHAO, C.; DUAN, L.; GOAD, D.; ZANGANJOR, E.; OSBORNE, J.; McGLYNN, K.; STIPPEC, S.; EARNEST, S.; CHEN, W.; COBB, M.H. 2008. The roles of MAPKs in disease. **Cell Research**, **18(4)**: 436-442.

LEE, J.D.; ULEVITCH, R.J.; HAN, J. 1995. Primary structure of BMK1: a new mammalian MAP kinase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **213(2)**: 715-724.

LEE, J. Y.; HANNUM, Y.A.; OBEID, L.M. 1996. Ceramide inactivates cellular protein kinase C α . **The Journal of Biological Chemistry**, **271(22)**: 13169- 13174.

LENORMAND, P.; SARDET, C.; PAGES, C.; L'ALLEMAIN, C.; BRUNET, A.; POUYSSEGUR, J. 1993. Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinase (p42^{mapk} and p44^{mapk}) but not of their activator MAP kinase kinase (p45^{mapk}) in fibroblasts. **The Journal of Cell Biology**, **122(5)**: 1079-1088.

LEON, C.; GRANT, N.J.; AUNIS, D.; LANGLEY, K. 1992. Expression of cell adhesion molecules and catecholamine synthesizing enzymes in the developing rat adrenal gland. **Developmental Brain Research**, **70(1)**: 109-121.

LEVENSON, J.M.; O'RIORDAN, K.J.; BROWN, K.D.; TRINH, M.A.; MOLFESE, D.L.; SWATT, J.D. 2004. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. **Journal of Biological Chemistry**, **279(39)**: 40545-40559.

LI, M.; WEST, J.W.; NUMANN, R.; MURPHY, B.J.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W.A. 1993. Convergent regulation of sodium channels by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. **Science**, **261(5127)**:1439-1442.

LIM, Y.S.; STALEY, M.J. 1985. Measurement of plasma fructosamine evaluated for monitoring diabetes. **Clinical Chemistry**, **31(5)**: 731-733.

LIPTAKOVA, A.; CARSKY, J.; ULICNA, O.; VANCOVA, O.; BOZEK, P.; DURACKOVA, Z. Influence of β -resorcylic acid aminoguanidine on selected metabolic parameters and antioxidant status of rats with diabetes mellitus. **Physiological Research**, **51**:277-284.

LLINAS, R. R. 1998. The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insight into central nervous system functions. **Science**, **242**: 1654 – 1664.

LIU, K.; PATERSON, A.J.; CHIN, E.; KUDLOW, J.E. 2000. Glucose stimulates protein modification by O linked GlcNAc in pancreatic β cells: linkage of O linked GlcNAc to β cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America**, **97(6)**: 2820-2825.

LIU, X.; WANG, J.; TAKEDA, N.; BINAGLIA, L.; PANAGIA, V.; DHALLA, N.S. 1999. Changes in cardiac protein kinase C activities and isozymes in streptozotocin-induced diabetes. **American Journal of Physiology**, **277(5 PT 1)**: E798-E804.

MACCARTY, M.F. 1998. A central role for protein kinase C overactivity in diabetic glomerulosclerosis: implications for prevention with antioxidants, fish oil, and ACE inhibitors. **Nutrition**, **21(2)**: 155-165.

MAHMUD, I.; HOSSAIN, A.; HOSSAIN, S.; HANNAN, A.; LIAQUAT, A.; HASHIMOTO, M. 2004. Effect of *Hilsa ilisa* fish on the atherogenic lipid profile and glycaemic status of streptozotocin-treated type 1 diabetic rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, **31**: 76-81.

MALERBI, D. A.; FRANCO, L. J. 1992. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban brazilian population aged 30 – 69 years. **Diabetes Care**, **15(11)**: 1509-1516

MALHOTRA, K.R.; WAKADE, T.D.; WAKADE, A.R.; 1989. Cross-communication between acetylcholine and VIP in controlling catecholamine secretion by affecting cAMP, inositol triphosphate, protein kinase C, and calcium in rat adrenal medulla. **The Journal of Neuroscience**, **9(12)**: 4150-4157.

MARCHOVECCHIO, M.; MOHN, A.; CHIARELLI, F. 2005. Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. **Journal of endocrinological investigation**, **28(9)**: 853-863.

MARTENS, J. R.; KWAK, Y. G.; TAMKUN, M. M. 1999. Modulation of K_v channel α/β subunit interactions. **Trends of Cardiovasc Medicine**, **9(8)**: 253 – 258.

MARTINEZ, T. L.R. 2003. **Manual de condutas clínicas em Dislipidemias**. Editora Diagraphic.

MENDONZA, I.E.; SCHMACHTENBERG, O.; TONK, E.; FUENTEALBA, J.; DÍAZ-RAYA, P.; LAGOS, V.L.; GARCÍA, A.G.; CÁRDENAS, A.M. 2003. Depolarization-induced ERK phosphorylation depends on the cytosolic Ca²⁺ level rather than on the Ca²⁺ channel subtype of chromaffin cells. **Journal of Neurochemistry**, **86(6)**: 1477-1486.

MISONOU, H.; TRIMMER, J. S. 2004. Determinants of voltage-gated potassium channel surface expression and localization in mammalian neurons. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, **39(3)**: 125 – 145.

MOCHIZUKI-ODA N.; MORI K.; NEGISHI, M.; ITO, S. 1991. Prostaglandin E2 activates Ca²⁺ channels in bovine adrenal chromaffin cells. **Journal of Neurochemistry**, **56 (2)**: 541-547.

MORGAN, A.; BURGOYNE, R.D.; BARCLAY, J.W.; CRAIG, T.J.; PRESCOTT, G.R.; CIUFO, L.F.; EVANS, G.J.O.; GRAHAM, M.E. 2005. Regulation of exocytosis by protein kinase C. **Biochemical Society Transactions**, **33(Pt 6)**: 1341-1344.

NAKAMURA, J.; KATO, K.; HAMADA, Y.; NAKAYAMA, M.; CHAYA, S.; NAKASHIMA, E.; NARUSE, K.; KASUYA, Y.; MIZUBAYASHI, R.; MIWA, K.; YASUDA, Y.; KAMIYA, H.; IENAGA, K.; SAKAKIBARA, F. KOH, N.; HOTTA, N. 1999. A protein kinase C- β -selective inhibitor ameliorates neural dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes**, **48(10)**: 2090-2095.

NAKASHIMA, S. 2002. Protein kinase C α (PKC α): Regulation and biological function. **Journal of Biochemistry**, **132(5)**: 669- 675.

NANMOKU, T.; TAKEKOSHI, K.; FUKUDA, T. ISHII, K.; ISOBE, K. 2005. Stimulation of catecholamine biosynthesis via the PKC pathway by prolactin-releasing peptide in PC12 rat pheochromocytoma cells. **The Journal of Endocrinology**, **186(1)**: 233-239.

NEUMAN, R.G.; HUD, E.; COHEN, M.P. 1994. Glycated albumin: a marker of glycaemic status in rats with experimental diabetes. **Laboratory animals**, **28(1)**:63-9.

NEWTON, A.C. 1997. Regulation of protein kinase C. **Current Opinion in Cell Biology**, **9(2)**: 161-167.

NEWTON, A.C. 2001. Protein kinase C: Structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. **Chemical Reviews**, **101(8)**: 2353-2364.

NIIJIMA, A. 1975. The effect of glucose on the activity of the adrenal nerve and pancreatic branch of the vagus nerve in the rabbit. **Neuroscience Letters**, **1**: 159-162.

NISHIZUKA, Y. 1995. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. **The FASEB Journal: Official Publications of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, **9(7)**: 484-496.

NOONEY, J.M; PETERS, J.A.; LAMBERT, J.J. 1992. A patch clamp study of the nicotinic acetylcholine receptor of bovine adrenomedullary chromaffin cells in culture. **Journal of Physiology**, **455**: 503-527.

OHNO, S.; AKITA, Y.; KONNO, Y.; IMAJOB, S.; SUZUKI, K. (1988). A novel phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC, distantly related to the protein kinase C family. **Cell**, **53(5)**: 731-741.

ONKAMO, P.; VAANANEN, S.; KARVONEN, M.; TUOMILEHTO, J. 1999 Worldwide increase in incidence of type 1 diabetes – the analysis of the data on published incidence trends. **Diabetologia**, **42(12)**: 1395-1403.

O`SULLIVAN, A.J.; C HECK, T.R.; MORETON, R.B.; BERRIDGE, M.J.; BURGOYNE, R.D. 1989. Localization and heterogeneity of agonist-induced changes in cytosolic calcium concentration in single bovine adrenal chromaffin cells from video imaging of fura-2. **EMBO journal**, **8 (2)**: 401-411.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE 2005. Acesso em abril/2008. <www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/>

PAL, G. K.; PAL, P.; MADANMOHAN. 2002. Alteration of ingestive behaviours by nucleus accumbens in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, **40(5)**: 536-540.

PARK, Y.S.; HUR, E.M.; CHOI, B.H.; KWAK, E.; JUN, D.J.; PARK, S.J.; KIM, K.T. 2006. Involvement of protein kinase C- ϵ in activity-dependent potentiation of large dense-core vesicle exocytosis in chromaffin cells. **The Journal of Neuroscience**, **26(35)**: 8999-9005.

PATEL, D.G. 1983. Lack of glucagons response to hypoglycemia in long-term experimental diabetic rats. **Diabetes**, **32(1)**: 55-60.

PEARSON, G.; ROBINSON, F.; GIBSON, T.B.; XU, B.E.; KARANDIKAR, M.; BERMAN, K.; COBB, M.H. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocrine Reviews**, **22(2)**, 153-158.

PEPATO, M.T.; KELLER, E.H.; BAVIERA, A.M.; KETTELHUT, R.C.; VENDRAMINI, R.C.; BRUNETTI, I.L. 2002. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, **81**: 191-197.

PEYROUX, J.; STERNBERG, M. Advanced glycation endproducts (AGEs): Pharmacological inhibition in diabetes. **Pathologie Biologie**, **54(7)**: 405-419, 2006.

PHILLIPS, A.O.; MORRISEY, K.; STEADMAN, R.; WILLIAMS, J.D. 1999. Decreased degradation of collagen and fibronectin following exposure of proximal cells to glucose. **Experimental Nephrology**, **7(5-6)**: 449-462.

PLAZA, A.V.; GRANDA, T. G.; CACHERO, M. T. G. 1993. Circadian rhythms of food and water intake and urine excretion in diabetic rats. **Physiology and Behavior**, **54(4)**, 665-670.

PONGS, O.; LEICHER, T.; BERGER, M.; ROEPER, J.; BAHRING, R.; WRAY, D.; GIESE, K. P.; SILVA, A. J.; STORM, J. F. 1999. Functional and molecular aspects of voltage-gated K⁺ channel beta subunits. **Annals of the New York Academy of Science**, **868**: 344 – 355.

RACKE, F. K.; WANG, D.; ZAIDI, Z.; KELLEY, J. VISVADER, J. SOH, J.W. 2001. A potential role for protein kinase C-epsilon in regulation megakaryocytic lineage commitment. **The Journal of Biological Chemistry**, **276(1)**: 522- 528

REAVEN, E.P.; REAVEN, G.M. 1974. Mechanisms for development of diabetic hypertriglyceridemia in streptozotocin-treated rats. Effect of diet and duration of insulin deficiency. **The Journal of Clinical Investigation**, **54(5)**: 1167-1178.

RYDER, R.E.J.; OWENS, D.R.; HAYES, T.M.; GHATEI, M.A.; BLOOM, S.R. 1990. Unawareness of hypoglycaemia and inadequate hypoglycaemic counterregulation: No causal relation with diabetic autonomic neuropathy. **British Medical Journal**, **301(6755)**: 783-787.

SAKAI, N.; SASAKI, K.; IKEGAKI, N.; SHIRAI, Y.; ONO, Y.; SAITO, N. 1997. Direct visualization of the translocation of the γ -subspecies of protein kinase C in living cells using fusion proteins with green fluorescent protein. **The Journal of Cell Biology**, **139(6)**: 1456-1476.

SANZ, L.; DIAZ-MECO, M.T.; NAKANO, H.; MOSCAT, J. 2000. The atypical PKC-interacting protein p 62 channel NF- κ B activation by the IL-1 TRAF6 pathway. **EMBO Journal**, **19**: 1576-1586.

SCHENA, F.P.; GESUALDO, L. 2005. Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. **Journal of the American Society of Nephrology**, **16(s1)**: S30-S33.

SCHÖNWASSER, D. C.; MARAIS, R. M.; MARSHALL, C. J.; PARKER, P. J. 1998. Activation of the mitogen-activated protein kinase/ extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. **Molecular and Cell Biology**, **18(2)**: 790-798.

SEGER, R.; KREBS, E.G. 1995. The MAPK signaling cascade. **FASEB Journal**, **9(9)**: 726-735.

SENA, C.M.; ROSARIO, L.M.; PARKER, P.J.; PATEL, V.; BOARDER, M.R. 1996. Differential regulation of histamine- and bradykinin-stimulated phospholipase C in adrenal chromaffin cells: evidence for involvement of different protein kinase C isoforms. **Journal of Neurochemistry**, **66(3)**: 1086-1094.

SENA, C.M.; SANTOS, R.M.; STANDEN, N.B.; BOARDER, M.R.; ROSÁRIO, L.M. 2001. Isoform-specific inhibition of voltage-sensitive Ca²⁺ channels by protein kinase C in adrenal chromaffin cells. **FEBS Letters**, **492(1-2)**: 146-150.

SERODIO, P.; VEJA-SAENZ de MIERA, E.; RUDY, B. 1996. Cloning of a novel component of A-type K⁺ channels operating at sub-threshold potentials with unique expression in heart and brain. **Journal of Neurophysiology**, **75**: 2174 – 2179.

SHINDO, H.; TAWATA, M.; AINDA, K. and ONAYA, T. 1992. The role of cyclic adenosine 3',5'- monophosphate and polyol metabolism in diabetic neuropathy. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** **74(2)**: 393-398.

SHIBA, T.; INOBUCHI, T.; SPORTSMAN, R.; HEATH, W.F.; BURSELL, S.; KING, G.L. 1993. Correlation of diacylglycerol level and protein kinase C activity in rat retina to retinal circulation. **The American Journal of Physiology**, **265(5 Pt 1)**: E783-793.

SHIMONURA, Y.; MASAKI, T. SHIMIZU, H.; SATO, N.; UEHARA, Y.; NEGISHI, M.; INUKAI, T.; KOBAYASHI, I.; KOBAYASHI, S. 1990. Abnormal feeding behavior and insulin replacement in STZ-Induced diabetic rats. **Physiology & Behavior**, **47(4)**: 731-734.

SHIMONURA, T.Y.; ASAOKA, M.; YOSHIDA, K.; NISHIZUKA, Y. 1991. Synergistic action of diacylglycerol and unsaturated fatty acid for protein kinase C activation: its possible implications. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, **88(12)**: 5149-5153.

SHIRAI, Y.; KAORI, K.; YAGI, K.; SAKAI, N.; SAITO, N. 1998. Distinct effects of fatty acids on translocation of γ and ϵ subspecies of protein kinase C. **The Journal of Cell Biology**, **143(2)**: 511-521.

SHIRAI, Y.; SAITO, N. 2002. Activation, mechanisms of protein kinase C: Maturation, catalytic activation, and targeting. **Journal of Biochemistry**, **132(5)**: 663-668.

SIVITZ, W.I.; WALSH, S.; MORGAN, D.; DONOHUE, P.; HAYNES, W.; LEIBEL, R. L. Plasma Leptin in Diabetic and Insulin-Treated Diabetic and Normal rats. **Metabolism**, **47(5)**: 584-591.

SONG, J. C.; HRNJEZ, B. J.; FAROKHZAD, O.C.; MATTHEWS, J. B. 1999. PKC-epsilon regulates basolateral endocytosis in human T84 intestinal epithelia: role of F-actin and MARCKS. **The American Journal of Physiology**, **277(6 Pt 1)**: C1239- C-1249

SONG, W.J. 2002. Genes responsible for native depolarization-activated K^+ currents in neurons. **Neuroscience Research**, **42**: 7-14.

SOLTANI, N.; KESHAVARZ, M.; DEHPOUR, A.R. 2007. Effect of oral magnesium sulfate administration on blood pressure and lipide prolife in streptozotocin diabetic rat. **European Journal of Pharmacology**, **560 (2-3)**: 201 – 205.

SONG, W. J. 2002 Genes responsible for native depolarization-activated K^+ currents in neurons. **Neuroscience Research**, **42(1)**: 7 – 14.

SÖZERI O.; VOLIMER, K.; LIYANAGE, M.; FRITH, D.; KOUR, G.; MARK, G.E.; STABE, S. 1992. Activation of the c-RAF protein kinase by protein kinase C phosphorylation. **Oncogene**, **7(11)**: 2259-2262.

STACHOWIAK, M.K.; RIGUAL, R. J.; LEE, P.H.K.; VIVEROS, O.H.; HONG, J.S. 1988. Regulation of tyrosine hydroxylase and phenylethanolamine N-methyl-transferase mRNA levels in the sympathoadrenal system by the pituitary-adrenocortical axis. **Brain Research**, **427(3)**: 275-286.

STAUDERMAN, K.A.; McKINNEY, R.A.; MURAWSKY, M.M. 1991. The role of caffeine-sensitive Ca^{2+} stores in agonist- and inositol 1,4,5- trisphosphate-induced Ca^{2+} release from bovine adrenal chromaffin cells. **Biochemical Journal**, **278(13)**: 643-650.

STEHNO-BITTEL, L.; LÜCKHOFF, A.; CLAPHAM, D.E. 1995. Calcium release from the nucleus by InsP_3 receptor channels. **Neuron**, **14(1)**: 163-167.

STEPHENS, L.; ANDERSON, K.; STOKOE, D.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; PAINTER, G.F.; HOLMES, A.B.; GAFFNEY, P.R.J.; REESE, C.B.; McCORMICK, F.; TEMPST, P.; COADWELL, J.; HAWKINS, P.T. 1998. Protein kinase B that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-thrisphosphate-dependent activation of protein kinase B. **Science**, **279**: 710-714.

SUN, X. ROTENBERG, S.A. 1999. Overexpression of protein kinase C α in MCF-10 human breast cancer cells engenders dramatic alterations in morphology, proliferation, and motility. **Cell Growth and Differentiation**, **10(5)**: 343-352.

SVENSSON, L.; ELG, P.; RASMUSSEN, M.; SKREDE, S.; BJÄRKHEM, I. 1982. A possible model for accuracy control of determination of serum cholesterol with use of reference methods. A Nordkem project. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, **42(2)**: 99-105.

SZKUDELSKI, T, KANDULSKA, M.; OKULICZ, M. 1998. Alloxan in vivo does not only exert deleterious effects on pancreatic B cells. **Physiological Research**, **47(5)**: 343-346.

SZKUDELSKI, T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research**, **50(6)**: 536-546.

TAKAGI, C.; KING, G.L.; TAKAGI, H.; LIN, Y.W; CLERMONT, A.C.; BURSELL, S.E. 1996. Endothelin-1 action via endothelin receptors is a primary mechanism modulation retinal circulatory response to hiperoxia. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, **37(10)**:2099-2109.

TAKAHASHI, K.; TOTSUNE, K.; MURAKAMI, O.; SONE, M.; NOSHIRO, T.; HAYASHI, Y.; SASANO, H.; SHIBAHARA, S. 2002. Expression of prolactin-releasing peptide and its receptor in the human adrenal glands and tumor tissues of adrenocortical tumors, pheochromocytomas and neuroblastomas. **Peptides**, **23(6)**: 1135-1140.

TAKEKOSHI, K.; MOTOOKA, M.; ISOBE, K.; NOMURA, F.; MANMOKU, T.; ISHII, K.; NAKAI, T. 1999. Leptin directly stimulates catecholamine secretion and synthesis in cultured porcine adrenal medullary chromaffin cells. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, **261(2)**: 426- 431.

TAKEKOSHI, K.; ISHII, K.; KAWAKAMI, Y.; ISOBE, K.; NANMOKU, T.; NAKAI, T. 2001. Ca^{2+} mobilization, tyrosine hydroxylase activity, and signaling mechanisms in culture porcine adrenal medullary chromaffin cells: effects of leptin. **Endocrinology**, **142(1)**: 290- 298. (a)

TAKEKOSHI, K.; ISHII, K.; NANMOKU, T.; SHIBUYA, S.; KAWAKAMI, Y.; ISOBE, K.; NAKAI, T. 2001. Leptin stimulates catecholamine synthesis in a PKC-dependent manner in cultured porcine adrenal medullary chromaffin cells. **Endocrinology**, **142(11)**: 4861- 4871. (b)

TANG, E. Y.; PARKER, P. J.; BEATTIE, J.; HOUSLAY, M. D. 1993. Diabetes induces selective alterations in the expression of protein kinase C isoforms in hepatocytes. **Federation of European Biochemical Societies**, **326(1)**: 117- 123.

TANIGUCHI, K.; MUROI, R.; KOBAYASHI-HATTORI, K.; UDA, Y.; OISHI, Y.; TAKITA, T. 2007. Differing effects of water-soluble and fat-soluble extracts from Japanese radish (*Raphanus sativus*) sprouts on carbohydrate and lipid metabolism in normal and streptozotocin-induced diabetic-rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, **53(3)**: 261-266.

TAYLOR, S. C.; GREEN, K.N.; CARPENTER, E.; PEERS, C. 2000. Protein Kinase C evokes quantal catecholamine release from PC12 cells via activation of L-type Ca^{2+} channels. **The Journal of Biological Chemistry**, **275(35)**: 26786-26791.

TERAOKA, H.; FUTTERWEIT, S. OHGA, A. 1991. Ryanodine inhibits caffeine-evoked Ca^{2+} mobilization and catecholamine secretion from cultured bovine adrenal chromaffin cells. **Journal of Neurochemistry**, **57(6)**: 1884-1890.

TORQUATO, M.T.C.G.; MONTENEGRO, R.M.; VIANA, L.A.L.; SOUZA, R.A.H.G.; LANNA, C.M.M; LUCAS, J.C.B.; BIDURIN, C. FOSS, M.C. 2003. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban population aged 30-69 years in Ribeirão Preto (São Paulo), Brazil. **São Paulo Medicine Journal**, **(121)**: 224-230.

TOWLER, DA.; HAVLIN, CE.; CRAFT.; CRYER, P. 1993. Mechanism of awareness of hypoglycemia, Perception of neurogenic (predominantly cholinergic) rather than neuroglycopenic symptoms. **Diabetes**, **42(12)**: 1791-1798.

TURNER, R.; NEIL, A. 1992. Introduction to Diabetes. In: Ashcroft, F.M. and Ashcroft, S.J.H. Ed. **Insulin: Molecular Biology to Pathology**. Oxford, EUA, Oxford University Press, 268-284.

VITALE, M.L.; SEWARD, E.P.; TIFARÓ, J.M. 1995. Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis. **Neuron**, **14(2)**: 353-363.

WADA, A.; YANAGITA, T.; YOKOO, H.; KOBAYASHI, H. 2004. Regulation of cell surface expression of voltage-dependent Nav1.7 sodium channels: mRNA stability and posttranscriptional control in adrenal chromaffin cells. **Frontiers in Bioscience**, **1(9)**: 1954-1966.

WAKASAKI, H.; KOYA, D.; SCHOEN, F.J.; JIROUSEK, M.R.; WAYS, D.K., HOIT, B.D.; WALSH, R.A.; KING, G.L. 1997. Targeted overexpression of protein kinase C beta2 isoform in myocardium causes cardiomyopathy. **Proceedings of the National Academy of the United States of the American**, **94(17)**: 9320-9325.

WALLIS, S.; LOYD, S.; WISE, I.; IRELAN, G.; FLEMING, T. P.; GARROD, D. 2000. The alpha isoform of protein kinase C is involved in signaling the response of desmosomes to wounding in cultured epithelial cells. **Molecular Biology of the Cell** **11(3)**: 1077- 1092

WILD, S.; ROGLIC., G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. 2004. Global prevalence of diabetes. Estimates for year 2000 and projections for 2030. **Diabetes care**, **27(5)**: 1047-1053.

WILKE, R.A.; RILEY, D.A.; LELKES, P.I.; HILLARD, C.J. 1993 Decreased catecholamine secretion from adrenal medullae of chronically diabetic BB-wistar rats. **Diabetes**, **42 (6)**: 862-868.

WILKE, R.A.; HILLARD, C.J. 1994. Decreased adrenal medullary catecholamine release in spontaneously diabetic BB-Wistar rats. **Diabetes**, **43(6)**: 724-729.

WILSON, G.L.; LEITER, E.H. 1990. Streptozotocin interactions with pancreatic β -cells and the induction of insulin-dependent diabetes. **Current Topics of Microbiology and Immunology**, **156**: 27-54.

WU, J.; HARRISON, J.K.; VINCENT, L.A.; HAYSTEAD, C.; HAYSTEAD, T.A.J.; MICHEL, H.; HUNT, D.F.; LYNCH, K.R.; STURGILL, T.W. 1993. Molecular structure of a protein-tyrosine/threonine kinase activating p42 mitogen-activated protein (MAP)

kinase: MAP kinase kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **90(1)**: 173-177.

YAMAGUCHI, N. 1992. Sympathoadrenal system in neuroendocrine control of glucose-mechanism involved in the liver, pâncreas and gland under hemorrhagic and hypoglycemic stress. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, **70 (2)**: 167-206.

YANAGITA, T.; KOBAYASHI, H.; YAMAMOTO, R.; TAKAMI, Y.; YOKOO, H.; TOMOAKI, Y.; NAKAYAMA, T.; WADA, A. 1999. Protein kinase C and the opposite regulation of sodium channel α - and β_1 - subunit mRNA levels in adrenal chromaffin cells. **Journal of Neurochemistry**, **73(4)**: 1749-1757.

YANAGITA, T.; KOBAYASHI, H.; YAMAMOTO, R.; KATAOKA, H.; YOKOO, H.; SHIRAISHI, S.; MINAMI, S.; KOONO, M.; WADA, A. 2000. Protein kinase C- α and epsilon down-regulate cell surface sodium channels via differential mechanisms in adrenal chromaffin cells. **Journal of Neurochemistry**, **74(4)**: 1674-1684.

YANAGITA, T.; KOBAYASHI, H.; UEZONO, Y.; YOKOO, H.; SUGANO, T.; SAITOH, T.; MINAMI, S.I.; SHIRAISHI, S.; WADA, A. 2003. Destabilization of $\text{Na}_v1.7$ sodium channel α -subunit mRNA by constitutive phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase: Negative regulation of steady-state level of cell surface functional sodium channels in adrenal chromaffin cells. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**, **63(5)**:1125-1136.

YANG, Y.; UDAYASANKAR, S.; DUNNING, J.; CHEN, P.; GILLIS, K.D. 2002. A highly Ca^{2+} - sensitive pool of vesicles is regulated by protein kinase C in adrenal chromaffin cells. **PNAS**, **99(26)**: 17060-17065.

YOO, S.H.; JEON, C.J. 2000. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ Ca^{2+} channel modulatory role of chromagraninA, a Ca^{2+} storage protein of secretory granules. **The Journal of Biological Chemistry**, **275(20)**: 15067-15073.

ZAICA, O.L.; POCHYUNYUK, O.M.; KOSTYUK, P.G.; YAVORSKAYA, E.N.; LUKYANETZ, E.A. 2004. Acetylcholine induced calcium signaling in adrenaline and noradrenaline containing adrenal chromaffin cells. **Archives of Biochemistry and Biophysic**, **424(1)**: 23-32.

ZHAO, X.; MURATA, T.; OHNO, S.; DAY, N.; SONG, J.; NOMURA, N; NAKAHATA, T.; YOHOYAMA, K. K. 2001. Protein kinase C α plays a critical role in mannosylerythritol lipid-induced differentiation of melanoma B16 cells. **The Journal of Biological chemistry**, **276 (43)**: 39903- 39910.