

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

**Anderson Dutra de Melo**

**A REDUÇÃO DA SÍNTESE E DA SECREÇÃO DE CATECOLAMINAS  
OBSERVADA EM DIABÉTICOS É CONSEQUÊNCIA DA  
HIPERGLICEMIA?**

Juiz de Fora  
2008

**ANDERSON DUTRA DE MELO**

**A REDUÇÃO DA SÍNTESE E DA SECREÇÃO DE CATECOLAMINAS  
OBSERVADA EM DIABÉTICOS É CONSEQUÊNCIA DA  
HIPERGLICEMIA?**

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

Orientador:

**Raúl Marcel González Garcia**

Juiz de Fora

2008

## FICHA CATALOGRÁFICA

Melo, Anderson Dutra de

A redução da síntese e da secreção de catecolaminas observada em diabéticos é consequência da hiperglicemia? /

Anderson Dutra de Melo. – 2008.

76 f. :il.

Dissertação (Mestrado em Imunologia, Genética e Biotecnologia)-Universidade federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2008.

1. Diabetes Mellitus. 2. Ratos. 3. Tirosina I. Título

CDU 616.379-008.64

“O conhecimento amplia a vida.  
Conhecer é viver uma realidade que  
a ignorância impede desfrutar”.

Do livro Exegese Logosófica

À minha família e a todos que contribuíram para a realização  
deste trabalho, principalmente à minha esposa Eliane.  
Eliane, obrigado por ter realizado este projeto comigo,  
pela motivação para enfrentar os desafios  
e por não ter me faltado nas horas difíceis.  
Obrigado também pelo seu amor,  
compreensão pelas ausências e pelos  
sonhos que compartilhamos.

## Agradecimentos

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por ter iluminado o meu caminho;

À minha família, aos meus amigos e à minha esposa Eliane, pelo apoio e compreensão;

Ao professor Dr. Raúl Garcia, pela orientação deste trabalho e pela amizade;

Aos alunos de Iniciação Científica e à mestranda do Laboratório de Biologia Celular, pela contribuição essencial no desenvolvimento deste trabalho, especialmente à mestranda Liliane Pinheiro e ao graduando Luiz Caíres que, em períodos diferentes, foram o meu braço direito;

Ao casal Ana Eliza e Silvioney pela amizade e colaboração;

À professora Dra. Rossana C. N. Melo pela generosidade em compartilhar o seu laboratório com o nosso grupo de pesquisa;

À professora Dra. Nádia Rezende Barbosa, por disponibilizar o laboratório NIQUA para a realização das dosagens de catecolaminas;

À professora Dra. Mônica Barros Costa por participar da discussão do estabelecimento do tratamento com insulina;

À professora Dra. Eveline Gomes Vasconcelos, por disponibilizar o laboratório de Bioquímica para dosagens e análises de Western Blot;

Ao Laboratório Cortes Villela, pela análise bioquímica;

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

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

À direção, supervisão e aos professores das instituições Abelard Pereira e Patrús de Sousa pelo apoio e colaboração.

Meus sinceros agradecimentos!

## Resumo

O diabetes reduz a secreção de catecolaminas em resposta a variações glicêmicas, acentuando o quadro de descontrole metabólico dos indivíduos doentes. Diversos estudos têm demonstrado que a hiperglicemia é a principal causa dos problemas decorrentes da instalação do diabetes. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito do diabetes sobre o processo de síntese e secreção de catecolaminas e se o tratamento com insulina reverte as modificações causadas pela doença. Métodos e Resultados: Foram usados ratos Wistar, machos, com 60 dias. O diabetes foi induzido pela injeção intravenosa de estreptozotocina na proporção de 50 mg/Kg de animal. O grupo controle recebeu injeção de solução tampão. Para determinar o protocolo de tratamento com insulina, estudamos o padrão de ingestão alimentar e de variações glicêmicas durante um dia, medindo estes dois parâmetros de hora em hora, durante 24h consecutivas. Foi estabelecido o tratamento com insulina NPH humana na dose de 5U diárias, 1 U às 13 h e 4 U às 19h. Após 15 dias da indução, os animais foram sacrificados e as glândulas adrenais foram retiradas. Com a intenção de caracterizar o efeito do diabetes sobre alguns parâmetros bioquímicos correntemente utilizados como marcadores da doença, foram medidos os níveis de frutossamina, triglicerídeos e colesterol e suas frações. Foi quantificado o conteúdo total de catecolaminas e a secreção basal e a estimulada por altas concentrações de potássio, carbamilcolina e cafeína. As catecolaminas foram dosadas por método fluorimétrico. A expressão de tirosina hidroxilase (TH), enzima reguladora da via de síntese de catecolaminas, foi avaliada por Western Blot. A glicemia foi de  $82,82 \pm 1,24$  mg/dl,  $405,74 \pm 23,35$  mg/dl e  $103,72 \pm 6,79$  mg/dl nos animais controle, diabéticos e diabéticos tratados com insulina (DTI). A variação na massa corporal durante o período experimental foi negativa nos ratos diabéticos, ou seja, eles emagreceram  $6,1 \pm 3,84$  g, enquanto que os animais controles e os diabéticos tratados, aumentaram seus pesos, em média,  $36,34 \pm 1,8$  g e  $43,32 \pm 3,79$  g, respectivamente. O diabetes modificou os níveis de colesterol total, LDL e VLDL, modificações que foram corrigidas pelo tratamento com insulina. Não houve diferença, entre controles e diabéticos, nos níveis de triglicérides, frutossamina e LDH. O tratamento com insulina reduziu significativamente os níveis de frutossamina. O conteúdo total de catecolaminas foi 21,14% menor nos diabéticos sem tratamento, quando comparado aos controles ( $p < 0,05$ ). O tratamento com insulina recuperou os estoques de catecolaminas dos ratos diabéticos. A expressão de TH foi similar em todos os grupos experimentais. A secreção basal e a estimulada por altas concentrações de  $K^+$  e por carbamilcolina foi reduzida pelo diabetes em 24,3%, 42,28% e 28,9%, respectivamente. Este efeito não foi corrigido pelo tratamento com insulina. A secreção estimulada pela mobilização de  $Ca^{2+}$  de pools intracelulares sensíveis à cafeína não é afetada pelo diabetes. Os nossos resultados nos permitem concluir que o diabetes afeta a secreção basal de catecolaminas e a estimulada via membrana plasmática e que isto não é determinado pela redução dos estoques de catecolaminas, nem é revertido pelo tratamento com insulina exógena.

**Palavras-chave:** Diabetes, síntese e secreção de catecolaminas, tirosina hidroxilase, insulina, ratos

**Abstract:**

The diabetes reduces the catecholamine secretion with hypoglycemic episodes, to turning worse the metabolic disorder of diabetic people. Several studies have shown that hyperglycemia has pivotal role in diabetic complication development. This work studied the effect of diabetes on catecholamine synthesis and secretion and the effects of insulin treatment. Methods and results: 60 days old, male Wistar rats were used. The diabetes was induced by a single intravenous injection of streptozotocin (50mg/Kg body weight). The control group received buffer injection. To establish the protocol of insulin treatment the food consumption and the blood glucose levels were measured during 24h from hour to hour. The insulin-treated diabetic rats received human NPH insulin at 1pm (1U) and 7pm (4U). After 15 days of the streptozotocin injection, the rats were sacrificed and the adrenal glands withdrew. To evaluate the effect of diabetes and the insulin treatment, fructosamine, triglycerides, total cholesterol, HDL, LDL and VLDL were measured. The total catecholamine content of adrenal gland and the basal and stimulated catecholamine secretion was quantified. The experiments of stimulated catecholamine secretion were performed with high potassium, carbachol and caffeine. The catecholamines measurement was done by fluorimetric method. The expression of tyrosine hydroxylase (TH), the rate-limiting enzyme of catecholamine synthesis, was analyzed by western blotting. The glycemia was  $82.82 \pm 1.24$  mg/dl,  $405.74 \pm 23.35$  mg/dl and  $103.72 \pm 6.79$  mg/dl in control, diabetic and insulin-treated diabetic groups, respectively. The body mass of diabetic rats was reduced in  $6.1 \pm 3.84$ g and increased on control and insulin-treated diabetic rats, in  $36.34 \pm 1.8$ g and  $43.32 \pm 3.79$ g, respectively. The diabetes changed total cholesterol, LDL and VLDL plasma levels, alteration reversed by insulin treatment. The triglycerides, fructosamine and LDH levels were not affected by diabetes. The insulin-treated rats showed significant reduction of fructosamine levels. The diabetic rats presented a significant reduction, 21.14% on the catecholamine content when compared to the control group,  $p < 0.05$ . The insulin treatment recovered the catecholamine stores. The TH expression was similar in all three experimental groups. The diabetes reduced the basal and stimulated catecholamine secretion by 24.3%, 42.28% (high  $K^+$ ) e 28.9% (carbachol). The catecholamine secretion stimulated by mobilization of intracellular  $Ca^{2+}$  pools was not affected by diabetes or insulin treatment. Our results show that diabetes reduces the catecholamine secretion, and this is not consequence of reduction on cell catecholamine stores and it is not reversed by insulin therapy.

**Keywords:** Diabetes, catecholamine synthesis and secretion, tyrosine hydroxylase, insulin, rats.

## Lista de Figuras

FIGURA		PÁGINA
FIGURA 1:	Variação glicêmica (triângulos pretos, n=9) e da ingestão de ração (triângulos brancos, n=9) de ratos Wistar controles durante o período de 24h. 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 do fotoperíodo, de claro para escuro. As linhas verticais representam o EPM.	37
FIGURA 2:	Variação glicêmica (círculos pretos, n=10) e da ingestão de ração (círculos brancos, n=12) de ratos Wistar diabéticos durante o período de 24h. 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 do fotoperíodo, de claro para escuro. As linhas verticais representam o EPM.	39
FIGURA 3:	Efeito do tratamento de ratos diabéticos por STZ utilizando 5U de insulina NPH, sendo 1U injetada às 13h e as 4U restantes as 19h. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. * p < 0,05, ao comparar com os ratos controle e diabéticos tratados com insulina (DTI).	41
FIGURA 4:	Desenho experimental estabelecido após a determinação do protocolo de tratamento com insulina.	42
FIGURA 5:	Comparação das glicemias dos ratos no 2° dia após a indução do diabetes e 1° dia do tratamento com insulina. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. * p < 0,05, ao comparar com os controles.	43
FIGURA 6:	Comparação das glicemias dos animais no 15° dia após a indução do diabetes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. *p<0,05, ao comparar com ratos controles e diabéticos tratados com insulina (DTI).	44
FIGURA 7:	Massa corporal após 15 dias de indução do diabetes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. *p<0,05, ao comparar com controles e diabéticos tratados com insulina (DTI).	45
FIGURA 8:	Variação da massa corporal após 15 dias da indução do diabetes de ratos controle, diabéticos e diabéticos tratados com insulina (DTI). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. *p<0,05, ao comparar com ratos controles e diabéticos tratados com insulina (DTI)	46
FIGURA 9:	Massa das glândulas adrenais (glândulas direitas +	

	esquerdas) após 15 dias da indução do diabetes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. * $p < 0,05$ , ao comparar com ratos com controles e diabéticos.	46
FIGURA 10:	Comparação da massa das glândulas adrenais direitas (GD) e esquerdas (GE), entre os ratos controles (A), ratos diabéticos (B) e ratos diabéticos que receberam tratamento com insulina (C). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média.	48
FIGURA 11:	Efeito do diabetes sobre o conteúdo total de catecolaminas após 15 dias da indução da doença. Os valores são expressos com média $\pm$ erro padrão da média. * $p < 0,05$ , comparando com ratos controles e DTI.	54
FIGURA 12:	Efeito do diabetes e do tratamento com insulina exógena sobre a expressão de tirosina hidroxilase (TH). Dados expressos com média $\pm$ erro padrão da média.	56
FIGURA 13:	Comparação da secreção basal dos grupos experimentais. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. * $p < 0,05$ , em relação aos outros grupos experimentais; # $p < 0,05$ em relação aos ratos DTI.	57
FIGURA 14:	Efeito do diabetes e do tratamento com insulina sobre a secreção estimulada por 30 mM de potássio após 15 dias da indução do diabetes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. * $p < 0,05$ , ao comparar com os ratos controles.	58
FIGURA 15:	Efeito do diabetes e do tratamento com insulina sobre a secreção estimulada por 50 $\mu$ M de carbamilcolina após 15 dias da indução do diabetes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. * $p < 0,05$ , ao comparar com os ratos controles.	59
FIGURA 16:	Efeito do diabetes e do tratamento com insulina sobre a secreção estimulada por 25 mM de cafeína após 15 dias da indução do diabetes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média.	59

### Tabela

TABELA 1:	O efeito do diabetes sobre os níveis séricos de frutossamina, triglicerídeos e do colesterol e suas frações. Os valores são expressos como média $\pm$ erro padrão da média e em mg/dl. * $p < 0,05$ ao comparar com os animais controles; ** $p < 0,05$ ao comparar com os ratos DTI; # $p < 0,05$ ao comparar com os demais grupos experimentais.	49
-----------	---	----

### Lista de siglas e abreviaturas

AADC	Aminoácido descarboxilase
Ach	Acetilcolina
ATP	Trifosfato de adenosina
CCh	Carbamilcolina
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
DBH	Dopamina beta hidroxilase
DTI	Ratos diabéticos que receberam tratamento com insulina NPH humana
GLUT	Transportador de glicose
HLA	Antígeno leucocitário humano
HPA	Eixo hipotámo-pituitária-hipófise
IGF	“Insulin-like growth factors” (fator de crescimento de insulina)
IP <sub>3</sub>	Fosfatidilinositol trifosfato
Mody	maturity onset diabetes of the young
PNMT	Feniletanolamina-N-metil-transferase
POMC	Pró-opiomelanocortina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
STZ	Estreptozotocina
TH	Tirosina hidroxilase
TNF - $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa

## Sumário

	<b>Página</b>
1 INTRODUÇÃO .....	12
2 OBJETIVOS .....	28
3 MATERIAL e MÉTODOS .....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	
4.1 Comportamento alimentar e variação dos níveis glicêmicos de ratos controles e com diabetes induzido por estreptozotocina .....	35
4.2 Tratamento de ratos Wistar diabéticos por estreptozotocina utilizando insulina exógena NPH humana .....	41
4.3 Níveis glicêmicos, massa corporal e massa glandular .....	42
4.4 Determinação dos níveis séricos de frutossamina, triglicerídeos e do colesterol e suas frações .....	49
4.5 Análise da síntese de catecolaminas: conteúdo total e expressão de tirosina hidroxilase .....	54
4.6 Análise da secreção de catecolaminas .....	56
5 CONCLUSÕES .....	64
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	65

# 1 Introdução

## 1.1 *Diabetes mellitus* – caracterização e classificação

O *diabetes mellitus* é uma doença que tem se tornado um sério e crescente problema de saúde pública. Estima-se que no Brasil haja mais de 8 milhões de pacientes diabéticos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, projeta-se um aumento significativo no número de indivíduos com *diabetes mellitus* até o ano de 2030, em torno de 300 milhões de pessoas em todo o mundo (GOMES, 2006; PAULINO et al., 2006).

Esta enfermidade diminui a qualidade de vida dos pacientes em decorrência das suas complicações micro (retinopatias, nefropatias) e macrovasculares (doenças coronárias, doenças vasculares periféricas), entre outros, sendo que o diabetes está entre as dez maiores causas de mortalidade no país, de acordo com o Sistema Único de Saúde (CRYER, DAVIS e SHAMOON, 2003; GOMES, 2006; CHAN, et al., 2005; PAULINO et al., 2006).

Esta síndrome se caracteriza por falhas na síntese e/ou secreção de insulina e/ou diminuição da sensibilidade dos tecidos a ela, tendo como resultado uma hiperglicemia tanto em períodos pós-prandial e/ou de jejum que, em sua forma mais grave, é acompanhada de cetose e proteólise (TURNER e NEIL, 1992).

Atualmente o diabetes mellitus classifica-se em:

### I. *Diabetes mellitus* tipo 1

No diabetes tipo 1, observado principalmente na população jovem, a síntese de insulina é drasticamente reduzida ou inexistente, em consequência da destruição das células  $\beta$  do pâncreas. Para controlar os níveis glicêmicos, utiliza-se insulina exógena (TURNER E NEIL, 1992; DIB, 2006).

A destruição das células  $\beta$  do pâncreas ocorre por um processo auto-imune (tipo A) ou por causa desconhecida (forma idiopática ou tipo B). Na forma auto-imune que é a mais comum, ocorre um processo de insulite e a presença de auto-anticorpos (antidescarboxilase do ácido glutâmico, anti-células  $\beta$  do pâncreas e anti-insulina), enquanto a forma idiopática caracteriza-se pela ausência de insulite e de auto-anticorpos. O fato de haver ausência absoluta de insulina no diabetes tipo 1, resulta em manifestações clínicas evidentes, possibilitando rápido diagnóstico

quando comparada com o diabetes tipo 2 (GROSS et al., 2002; American Diabetes Association, 2007).

Esta doença também tem uma forte associação com HLA (antígeno leucocitário humano), com linkage nos genes DQA e DQB e é influenciado pelos genes DRB (GROSS et al., 2002; American Diabetes Association, 2007).

Apesar da contribuição dos fatores genéticos, a transmissão direta do diabetes de pais para filhos é surpreendentemente baixa. Se um dos pais tem diabetes tipo 1, o risco da prole desenvolver a doença é da ordem de 2 a 5%. Se uma criança tem diabetes tipo 1, o risco médio para um outro irmão é de 5 a 10%. O risco será muito maior, porém, se o segundo irmão possuir HLA idêntico ao primeiro (WYNGAARDEN e SMITH, 1990).

## II. *Diabetes mellitus* tipo 2

Ocorre em maior proporção em indivíduos na faixa etária de 30 a 69 anos. É uma doença multifatorial, sendo resultado de uma combinação de fatores ambientais e de genes (“diabetogenes”). Sabe-se que não há associação com HLA (WYNGAARDEN e SMITH, 1990) e o papel e regulação destes “diabetogenes” ainda não são claros (KAHN, 1994; American Diabetes Association, 2007).

Em contraste com o diabetes tipo 1, o diabetes tipo 2 está associado ao aumento da concentração plasmática de insulina. Esse aumento ocorre como resposta compensatória das células  $\beta$  do pâncreas, devido à diminuição da utilização e armazenamento dos carboidratos, e à conseqüente elevação do nível glicêmico. Entretanto, mesmo os níveis aumentados de insulina não são suficientes para manter a regulação normal da glicose, devido à acentuada redução da sensibilidade dos tecidos periféricos à insulina. Como conseqüência, verifica-se o desenvolvimento de hiperglicemia leve após ingestão de carboidratos nos estágios iniciais da doença.

Nos estágios avançados do diabetes tipo 2, as células  $\beta$  do pâncreas se tornam incapazes de produzir insulina em quantidade suficiente para impedir o desenvolvimento de hiperglicemia mais acentuada (GUYTON e HALL, 2002).

Modificações no estilo de vida, tais como controle dietoterápico e prática de atividades físicas são intervenções que poderão diminuir a incidência de diabetes

tipo 2, já que com estas intervenções, evita-se a obesidade, que predispõe a esse tipo de diabetes (LYRA et al., 2006).

### III. *Diabetes mellitus* gestacional

No diabetes gestacional ocorre tolerância diminuída aos carboidratos, podendo esta tolerância persistir, ou não, após o parto. Os fatores de risco associados ao diabetes gestacional são semelhantes aos descritos para o diabetes tipo 2, incluindo, ainda, idade superior a 25 anos, ganho excessivo de peso na gravidez atual, deposição central excessiva de gordura corporal, crescimento fetal excessivo, hipertensão ou pré-eclâmpsia na gravidez atual, antecedentes obstétricos de morte fetal ou neonatal (GROSS et al., 2002; American Diabetes Association, 2007).

### IV. Outros tipos específicos

#### a) Defeitos genéticos que afetam a função das células $\beta$ :

- Tipos de MODY (maturity onset diabetes of the young); DNA mitocondrial; entre outros.

#### b) Defeitos genéticos que causam resistência à insulina:

- Resistência insulínica tipo A; diabetes lipoatrófico, entre outros.

#### c) Doenças do pâncreas exócrino:

- Pancreatites (alcoolismo); hemocromatose; fibrose cística; pancreatopatia fibrocalculosa; outras.

#### d) Endocrinopatias:

- Síndrome Cushing; Acromegalia; Feocromocitoma; Hipertireoidismo, entre outras.

#### e) Induzido por drogas ou agentes químicos:

- Glicocorticóides; Agonistas  $\beta$ -adrenérgicos; tiazídicos; interferon; ácido nicotínico; difenilhidantoína; outros.

#### f) Associado, às vezes, a síndromes genéticas:

- Síndrome de Down; Síndrome de Klinefelter; Síndrome de Turner; Síndrome de Laurence-Moon-Biedl; Síndrome de Prader-Willi; outras (GROSS et al., 2002; American Diabetes Association, 2007).

Entre os tipos de diabetes descritos acima, destacam-se o diabetes tipo 1 e o tipo 2 que, juntos, representam mais de 90% de todos os casos de diabetes.

## **1.2 O pâncreas**

O pâncreas é um órgão de natureza glandular, mas sua atividade secretória é dupla; por um lado, secreta o suco pancreático que tem ação nos processos digestivos (função exócrina); por outro, possui uma associação de células com atividade endócrina que, em conjunto, denomina-se ilhota de Langerhans (GREENSPAN e STREWLER, 2000).

Estas ilhotas de Langerhans são constituídas pelas células  $\beta$  que secretam insulina; células  $\alpha$  que secretam glucagon; pelas células D que secretam somatostatina; pelas células G que secretam gastrina, enquanto as células F secretam polipeptídeos pancreático (PP). São as células  $\beta$  e  $\alpha$  que estão relacionadas diretamente com a regulação glicêmica (GREENSPAN e STREWLER, 2000).

### **1.2.1 O processo de secreção de insulina e o seu efeito**

A insulina é secretada de forma contínua, havendo um aumento nesta secreção em períodos pós prandiais. Existem duas fases na regulação da secreção de insulina:

Fase cefálica: a insulina é secretada por estímulos olfatórios, pela gustação ou pelo aumento da atividade estomatognática, que por via vagal, excita a secreção de insulina.

Fase humoral: o aumento da secreção de insulina ocorre por estímulo de hormônios gastrointestinais, como por exemplo, a gastrina.

Além disso, as células  $\beta$  são estimuladas principalmente pela glicose, mas também por aminoácidos, ácidos graxos livres e medicamentos, como por exemplo, as sulfoniluréias (CRYER, DAVIS e SHAMOON, 2003).

A glicose é transportada para o interior das células  $\beta$  pelo transportador de glicose (GLUT2) e imediatamente fosforilada em glicose-6P pela glicoquinase, que é considerada o sensor de glicose para as células  $\beta$ . A glicose-6P é oxidada aumentando a relação ATP/ADP com fechamento dos canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP das células  $\beta$ . Ocorre então a despolarização da membrana plasmática destas células com a posterior abertura dos canais de  $Ca^{2+}$ , aumento da concentração do  $Ca^{2+}$  citoplasmático, ativação provável de cinases, com extrusão dos grânulos secretores e liberação de insulina (FELIG, 1971; COSTA, FREITAS e MOURA, 2004; OHTSUBO, et al., 2005).

Após a liberação da insulina no sangue, este hormônio se ligará aos receptores de insulina das membranas celulares. Estes receptores são constituídos por quatro subunidades ligadas por pontes de dissulfeto: duas estão situadas totalmente fora da membrana plasmática, denominadas alfa, enquanto as subunidades beta penetram através da membrana (CARVALHEIRA, ZECCHIN e SAAD, 2002).

A insulina liga-se às subunidades alfa de seu receptor, o que determina a autofosforilação da subunidade beta e a fosforilação, em resíduos de tirosina, de diversas enzimas intracelulares, o que modifica a atividade destas enzimas (TURNER e NEIL, 1992).

Uma das proteínas fosforiladas são os transportadores de glicose. São denominados GLUTs e pertencem a uma família de 14 membros, os quais permitem a difusão facilitada de glicose através da membrana plasmática das células, já que o estímulo insulínico determina a translocação destas proteínas em direção à membrana plasmática, aumentando a captação de glicose, participando de forma importante no controle da homeostase glicêmica em nível tecidual e plasmático. Uma vez dentro da célula, a glicose é metabolizada por glicólise (IDRIS, GRAY e DONNELLY, 2001; SCHEEPERS, JOOST e SCHURMAN, 2004; ALANIZ et al., 2006; MACHADO, SCHAAN e SEAPHIM, 2006).

Essas isoformas de transportadores de glicose diferenciam-se tanto na sua localização, como o valor de seu  $K_m$  (constante de afinidade à glicose). As principais são:

- GLUT 1 – Encontrado no cérebro, eritrócitos, placenta e tecido fetal. Possui baixo Km (~ 1 mM). Permite transporte de glicose relativamente constante independente da concentração extracelular (4 ~ 6 mM).
- GLUT 2 – Encontrado no intestino, rim, fígado e nas células  $\beta$  pancreáticas. Permite um equilíbrio dos níveis de glicose, tanto no meio intra ou extracelular através da membrana plasmática.
- GLUT 3 – Encontrado no cérebro e no músculo fetal. Possui baixo Km (<1 mM) quando comparado com o GLUT2. Utilizado principalmente em períodos hipoglicêmicos.
- GLUT 4 – Encontrado nos músculos e no tecido adiposo. Possui Km intermediário (2,5 – 5 mM). A insulina recruta esta isoforma para aumentar os níveis de glicose no meio intracelular.
- GLUT 5 – Encontrado no jejuno, músculo esquelético e adipócitos. Possui Km intermediário e é responsável em conduzir a frutose (BROWN e WAHL,1993; GOULD e HOLMAN, 1993; KLIP et al.,1994; NUSSEY e WHITEHEAD, 2001).

A insulina além de regular o transporte de glicose para o interior das células, promove a conversão da glicose em excesso a ácidos graxos, inibe a gliconeogênese no fígado, atua no metabolismo de gorduras e proteínas.

Observa-se que os diabéticos perdem peso, já que a gordura serve de via secundária para obtenção de energia. Além disso, é comum ocorrer a acidose (pH dos líquidos orgânicos tornam-se mais ácidos), podendo levar o indivíduo ao coma e à morte (GUYTON e HALL, 2002).

### **1.2.1.1 Resistência insulínica x obesidade e insulina x leptina**

Em relação à resistência à insulina, tem como mais importante contribuinte o excesso de ácidos graxos livres circulantes, os quais se originam do tecido adiposo e das lipoproteínas ricas em triglicerídeos. No músculo, os ácidos graxos livres reduzem a sensibilidade à insulina, inibindo a captação de glicose insulino-mediada. O aumento da glicose e dos ácidos graxos circulantes aumenta a secreção de insulina, resultando em hiperinsulinemia (PANKOW, et al., 2004; DANDONA, et al., 2005).

No caso da obesidade, por exemplo, a expressão e a secreção de TNF- $\alpha$  estão aumentadas em animais e humanos obesos. O TNF- $\alpha$  é uma citocina que age diretamente no adipócito regulando acúmulo de gordura e interferindo diretamente em diversos processos dependentes de insulina, como a homeostase glicêmica e o metabolismo de lipídios. Em ratos obesos, a neutralização do TNF- $\alpha$  causou melhora significativa na captação de glicose em resposta à insulina, revelando sua relação com resistência insulínica na obesidade (HOTAMISLIGIL, SHARGILL e SPIEGELMAN, 1993; ALANIZ et al., 2006; WAKI e TONTONOZ, 2007).

Em humanos obesos, existe uma forte correlação inversa entre TNF- $\alpha$  e metabolismo de glicose, devido à supressão pelo TNF- $\alpha$  da sinalização da insulina, modificando o receptor para a insulina e redução da síntese e translocação do GLUT4 para a membrana, e conseqüentemente diminuição na captação de glicose mediada pela insulina (ARNER, 1995; ALANIZ et al., 2006).

Dessa forma, as células do tecido adiposo aumentam a liberação de TNF-alfa, de Interleucina-6, de leptina, e diminuem a liberação de adiponectina (hormônio adipocitário que melhora a sensibilidade à insulina, a oxidação dos ácidos graxos e diminui a apoptose das células beta pancreática), fatos estes que diminuem a sensibilidade à insulina (FERRANNINI, NATALI e BELL, 1997).

Sabe-se que diabéticos com resistência insulínica, por estimularem hipersecreção de insulina, induzem, a longo prazo, redução na capacidade secretória das células  $\beta$  pancreática. A perda da capacidade secretória das células  $\beta$  de insulina ocorre principalmente em resposta à glicose, e redução na expressão do GLUT2 em ilhotas pancreáticas dos diabéticos (MARTINEZ, 2003; PANKOW et al., 2004).

Além disso, existe a participação da leptina, que é um hormônio produzido principalmente pelo tecido adiposo que tem papel na regulação do metabolismo energético (AHIMA, 2005). Em condições normais, inibe a secreção de insulina, mas com a dessensibilização das células  $\beta$  à leptina, ocorre o aumento da secreção de insulina. Dessa forma, indivíduos obesos apresentam hiperleptinemia (LUSTIG, 2001), inibindo à secreção de insulina e, conseqüentemente aumentando os níveis glicêmicos.

Dessa forma, percebe-se que a resistência insulínica é um importante elo entre o diabetes tipo 2 e a obesidade (LYRA, et al., 2006).

### 1.2.2 O glucagon

O glucagon é um hormônio polipeptídico secretado pelo pâncreas quando o nível da glicemia diminui, tendo ação inversa à da insulina. A mais importante de suas funções consiste em aumentar a concentração de glicose, evitando episódios de hipoglicemia. Dessa forma, não permite a falta de energia para o sistema nervoso (CRYER, 2001; GUY, et al. 2005).

A regulação da secreção de glucagon ocorre por três vias:

- **Metabólica:** a hiperglicemia reduz a secreção de glucagon, enquanto a hipoglicemia claramente a aumenta. Os aminoácidos plasmáticos estimulam também a secreção de glucagon, entre eles, destacam-se a arginina e alanina, cuja taxa sanguínea se eleva após a ingestão de proteínas, provocando, secundariamente, aumento da taxa de glicose, pelo efeito do glucagon secretado (GREENSPAN e STREWLER, 2000).
- **Hormonal:** Os hormônios gastro-intestinais parecem ser importantes fatores estimulantes da secreção de glucagon, destacando-se a colecistocinina, e a gastrina. Através destes hormônios inicia-se uma resposta das células  $\alpha$  a concentração plasmáticas crescentes de aminoácidos, à medida que eles vão sendo absorvidos pelo trato gastrointestinal (GREENSPAN e STREWLER, 2000).
- **Nervosa:** Tanto o sistema simpático como o parassimpático estimulam a secreção de glucagon; o transmissor parassimpático estimula a secreção de glucagon através de receptores colinérgicos muscarínicos. O sistema simpático estimula a liberação de glucagon através de receptores  $\beta$  adrenérgicos (GREENSPAN e STREWLER, 2000).

O tecido alvo mais importante do glucagon é o fígado, onde estimula a glicogenólise e promove a gliconeogênese, proteólise e cetogênese provocando o aumento dos níveis glicêmicos (GREENSPAN e STREWLER, 2000).

### **1.3 As glândulas adrenais**

A medula e o córtex adrenal constituem as glândulas supra-renais. São tecidos totalmente diferentes quanto à histologia, à origem embrionária, à bioquímica e às características funcionais (GUYTON e HALL, 2002).

O córtex deriva do mesoderme, constituindo aproximadamente 80% da glândula adrenal. Sua função é controlar diferentes aspectos do metabolismo através de hormônios diversos, de natureza esteroidal. Estes hormônios são sintetizados pelas três regiões que constituem o córtex, a saber:

- Zona glomerulosa ou externa – Nesta região são produzidos os corticosteróides de ação mineralocorticóide, isto é, cuja ação gravita sobre o metabolismo hidro-eletrolítico, retendo sódio e excretando potássio no túbulo renal. Entre eles, o mais importante é a aldosterona.

- Zona fascicular ou camada média – Representa a parte mais volumosa do córtex. Secreta-se um grupo de hormônios conhecidos como glicocorticóides, pela sua ação no metabolismo glicídico, aumentando a glicemia. Destacam-se o cortisol, que é o glicocorticóide mais relevante, e a corticosterona, que também apresenta ação mineralocorticóide, porém com menor ação do que a aldosterona.

- Zona reticular ou interna – Nesta região, secretam-se fundamentalmente hormônios androgênicos, além de certa quantidade de glicocorticóides e mineralocorticóides (GREENSPAN e STREWLER, 2000).

Por outro lado, a medula adrenal é originária das células da crista neural da região do tronco que migram ventralmente em direção ao espaço entre o somito e o tubo neural, onde se diferenciam em células cromafins (BROWDER, ERICKSON e JEFFERY, 1991).

#### **1.3.1 A síntese e secreção das catecolaminas**

As células cromafins da medula adrenal são as responsáveis pela síntese e secreção das catecolaminas, que têm ação hormonal.

O termo catecolaminas, na glândula supra-renal se refere à adrenalina e noradrenalina, embora a dopamina também seja uma catecolamina, isto é, possui a estrutura do anel diidroxifenil (“catecol”) e uma cadeia lateral amina, mas que não é

secretada, ao menos em níveis significativos, pela medula adrenal (POLLARD et al., 1985).

A formação das catecolaminas se inicia com o aminoácido tirosina, que pode ser captado do sangue. É convertido em Di – hidroxifenilalanina (DOPA) pela ação da enzima tirosina hidroxilase (TH) - enzima chave do processo (já que é a enzima limitadora da velocidade na biossíntese das catecolaminas). A conversão de DOPA em dopamina é catalisada pela enzima aminoácido descarboxilase (AADC). Em seguida, a noradrenalina é formada pela ação da dopamina  $\beta$ -hidroxilase (DBH). Estas etapas são comuns às células cromafins e aos neurônios adrenérgicos. A partir da noradrenalina, forma-se a adrenalina pela ação da enzima feniletanolamina-N-metil-transferase (PNMT). Na ausência da tirosina, existe uma via alternativa que inicia com o aminoácido fenilalanina que é convertido em tirosina (GARCIA, 1998; MARTINS et al., 2004, INOUE et al., 2006).

As catecolaminas são armazenadas em grânulos citoplasmáticos e liberadas da célula por exocitose em resposta à estimulação neural.

As catecolaminas produzem vários efeitos hemodinâmicos e metabólicos. Estes são consequência da associação das catecolaminas aos receptores adrenérgicos na superfície das células alvo e de uma consequente série de eventos bioquímicos intramembrana e intracelulares. Os receptores adrenérgicos são divididos em receptores  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos (WYNGAARDEN e SMITH, 1990).

As catecolaminas aumentam a frequência e a força da contração miocárdica ( $\beta_1$ ) e produzem vasoconstrição ( $\alpha$ ) na maioria dos leitos vasculares, embora a vasodilatação ( $\beta_2$ ) ocorra em alguns leitos vasculares, por exemplo, do músculo esquelético. A noradrenalina causa aumento da resistência vascular e da pressão arterial (sistólica e diastólica); o aumento da pressão arterial reflexivamente limita o aumento da frequência cardíaca. Provavelmente porque possui uma maior afinidade que a noradrenalina pelos receptores  $\beta_2$  adrenérgicos, a adrenalina normalmente produz um padrão um pouco diferente: aumento da pressão arterial sistólica, mas não da diastólica, e aumento da frequência cardíaca (WYNGAARDEN e SMITH, 1990).

As catecolaminas aumentam a concentração plasmática de glicose através de ações complexas. Estas envolvem tanto a estimulação da produção hepática de

glicose quanto a limitação da utilização de glicose e são mediadas por mecanismos diretos e indiretos. O primeiro entre os mecanismos indiretos é a limitação da secreção de insulina ( $\alpha$ ). As ações diretas são amplamente mediadas por receptores  $\beta$ . As catecolaminas também estimulam a lipólise, a cetogênese, a glicólise e a mobilização de aminoácidos como a alanina. Também aumentam a termogênese (WYNGAARDEN e SMITH, 1990; GARCIA et al., 2006).

A via efetora para estimular a secreção de catecolaminas da medula adrenal, consiste em fibras pré e pós - ganglionares simpáticas colinérgicas do nervo esplâncnico, que liberam a acetilcolina (ACh) – principal estimulador fisiológico das catecolaminas. Com a liberação da acetilcolina, ocorre a despolarização da membrana das células cromafins, aumentando a permeabilidade ao sódio. Em consequência, induz a abertura de canais de cálcio sensíveis à voltagem e o influxo deste íon, que estimula a fusão dos grânulos de secreção à membrana plasmática e posterior secreção dos hormônios (POLLARD et al., 1985; GARCIA et al., 2006).

A acetilcolina ativa principalmente dois tipos de receptores, os muscarínicos e os nicotínicos.

Os receptores muscarínicos são encontrados em todas as células efectoras estimuladas pelos neurônios pós-ganglionares do sistema nervoso parassimpático, bem como os estimulados pelos neurônios pós-ganglionares colinérgicos do sistema simpático (GUYTON e HALL, 2002).

A estimulação muscarínica induz a ativação da fosfolipase C que quebra fosfatidilinositois de membrana formando inositol 1,4,5 trifosfato ( $IP_3$ ) e diacilglicerol. O  $IP_3$  induz a liberação de estoque intracelular de cálcio podendo também promover a entrada de cálcio pela membrana através de canais de cálcio não dependentes de voltagem (MOCHIZUKI-ODA et al., 1991).

Já os receptores nicotínicos são encontrados nas sinapses entre os neurônios pré-ganglionares e pós-ganglionares dos sistemas simpático e parassimpático (GUYTON e HALL, 2002).

A ativação dos receptores nicotínicos resulta na entrada de cálcio tanto por canais de cálcio sensíveis à voltagem quanto por mecanismos que independem da despolarização da membrana plasmática (ZHANG, COGGAN e BERG, 1996; HARKINS e FOX, 1998).

Além do estimulador fisiológico das catecolaminas, existem outras formas de estimular a liberação destes hormônios.

Sabe-se que a cafeína é uma droga que induz a liberação de cálcio em células musculares, ligando-se a receptores do retículo endoplasmático (ENDO, 1977; GARCIA et al., 2006).

Outra forma é a estimulação das células da medula supra-renal com altas concentrações de potássio. Ele provoca a despolarização da membrana plasmática, o que permite a entrada de íons cálcio via canais de cálcio dependentes de voltagem, favorecendo à exocitose de catecolaminas (CALLEWAERT, JOHNSON, e MORAD, 1991).

#### **1.4 Mecanismos que controlam a glicemia**

Em situações normais, a secreção de glucagon, de catecolaminas e de insulina é constante. Após períodos prandiais, há um incremento na secreção de insulina, permitindo que parte da glicose pós prandial seja transportada para as células e o restante armazenado no fígado e nas células musculares, sob a forma de glicogênio (WILKE e HILLARD, 1994; GREENSPAN e STREWLER, 2000).

Porém, em situações de jejum, entram em ação o glucagon e as catecolaminas, tendo como principais alvos, respectivamente, o fígado (induzindo o aumento da liberação de glicose pelo incremento da gliconeogênese e a quebra de glicogênio) e as células musculares (aumentam a taxa de quebra do glicogênio e inibem a captação de glicose). Além disso, agem também, por exemplo, sobre adipócitos. Juntos, o glucagon e as catecolaminas exercem um papel determinante no controle do metabolismo energético com o intuito de evitar a hipoglicemia, impedindo, portanto a falta de energia para o organismo, principalmente para o sistema nervoso (GREENSPAN e STREWLER, 2000; CHAN et al., 2002; INOUE, et al., 2006).

#### **1.4.1 Descontrole metabólico observado em diabéticos tipo 1**

O controle glicêmico é comprometido nos indivíduos diabéticos. Com o passar do tempo, os mecanismos contrareguladores são cada vez mais afetados, agravando ainda mais o quadro de descontrole metabólico desses indivíduos (CLARKE et al., 1991; CRYER, 1992; CRYER, 1994; INOUE, et al., 2006).

As alterações metabólicas observadas nos diabéticos têm diversas origens. Foi demonstrado que glicorreceptores do sistema nervoso central perdem a capacidade de reconhecer oscilações glicêmicas (RYDER et al., 1990; HOELDTKE e BODEN, 1994), a sensibilidade dos tecidos às catecolaminas diminui (CRYER, 1989, KORYTKOWSK et al., 1998), assim como a secreção de hormônios contra-reguladores (PATEL, 1983; CRYER, 1992; WILKE et al., 1993; CRYER, 1994).

Com relação à diminuição dos hormônios contra-regulatórios, é observada diminuição na secreção de glucagon nos estágios iniciais da doença, sendo uma característica comum aos diabéticos com o passar dos anos (CRYER e GERICH, 1985; CHAN, et al., 2002). A princípio, a adrenalina torna-se o principal hormônio contra-regulador; porém este hormônio também é afetado com o desenvolvimento da doença, impedindo a homeostase glicêmica (HOELDTKE et al., 1982; CRYER e GERICH, 1985; CHAN, et al., 2002).

À administração diária de insulina nos diabéticos do tipo 1 não simula exatamente as variações das secreções de insulina nos indivíduos normais, uma vez que os níveis de glicose sanguínea variam de pessoa para pessoa e podem oscilar bastante no decorrer de um dia (GANONG, 1989). Tal tratamento pode levar o indivíduo a situações de hipoglicemia que, em indivíduos normais, são precedidas pela ocorrência de taquicardia e aumento da sudorese causadas pela secreção de catecolaminas (CRYER, 1994; BORG et al., 1999). Porém, com o desenvolvimento da doença, há redução na secreção de catecolaminas, eliminando tais sintomas. Desta forma, o indivíduo passa a viver episódios de hipoglicemia sem percebê-los e, dependendo do caso, levando o indivíduo à morte (CRYER, DAVIS e SHAMOON, 2003).

A secreção de glucagon normalmente é aumentada em casos de diabetes descontrolado. Em 2001, CHAN e seus colaboradores observaram que o tratamento com insulina em ratos diabéticos diminuiu significativamente os níveis plasmáticos

de glucagon, quando comparado a ratos controle e diabéticos sem tratamento. Isto pode ter ocorrido pela ação direta da insulina exógena sobre a secreção de glucagon.

As causas das falhas na secreção das catecolaminas da glândula adrenal são diversas. Já foi reportado que o diabetes provoca alterações vasculares que causam neuropatias e outras alterações celulares e que ocorre a atrofia da inervação simpática que chega à medula supra-renal (BROWN et al., 1990; WILKE et al., 1993; ZANONE et al., 1993).

Foram descritas modificações no limiar de disparo da resposta à hipoglicemia, diminuição da sensibilidade dos tecidos às catecolaminas e redução da sensibilidade das células cromafins da medula supra-renal à acetilcolina (PATEL, 1983; WILKE e HILLARD, 1994).

Nijima (1975) relatou a influência da glicemia sobre a liberação de acetilcolina nos terminais simpáticos que inervam a medula adrenal: em situações de hiperglicemia, eram reduzidos os níveis de acetilcolina. Além disso, a secreção também é comprometida em 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. Recentemente foi sugerido que ocorre redução da síntese de catecolaminas pelos indivíduos doentes (CRYER, 1994; GALAN et al., 2004).

Já foi demonstrado que em ratos geneticamente diabéticos há uma redução na secreção de catecolaminas induzida por acetilcolina e estimulação elétrica após duas semanas de instalação da doença (WILKE e HILLARD, 1994).

Wilke e Hillard (1994) também mostraram que em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina, não há modificação no padrão de secreção. Resultados divergentes a estes foram apresentados por Patel (1983) que mostrou que em ratos diabéticos por estreptozotocina ocorre redução da secreção de catecolaminas.

Em seres humanos, diversos trabalhos mostram que a secreção de catecolaminas pela medula supra-renal é reduzida pelo diabetes (CLARKE et al., 1991; MUHLHAUSER et al., 1991; CRYER, 1992; CRYER, 1994; DAGOGO-JACK, RATTARASARN e CRYER, 1994; GALAN et al.; 2004).

Os nossos resultados prévios mostram que ocorre redução na secreção de catecolaminas nestas células em animais diabéticos, induzidos por estreptozotocina, sem administração de insulina e dão indicações de que isto pode ser consequência da redução da síntese destes hormônios, da modificação de receptores e/ou dos processos de sinalização intracelular.

Foi demonstrado através de experimentos de *clamp* de glicose, provocando hiperinsulinemia e hipoglicemia, que não há diferença significativa nos níveis de glucagon, de adrenalina e de noradrenalina em ratos controle e diabéticos por estreptozotocina que receberam tratamento com insulina, indicando que este tratamento pode ser responsável pelo restabelecimento dos níveis normais destes hormônios (INOUYE, et al., 2006).

Além disso, Inouye et al. (2006) observaram que em resposta a hipoglicemia *clamp*, não há diferença significativa nos níveis de tirosina hidroxilase (TH) entre os grupos experimentais, porém os níveis de dopamina beta hidroxilase (D $\beta$ H) e feniletanolamina-N-metiltransferase (PNMT) dos ratos diabéticos tratados com insulina foram significativamente maiores quando se compara com os ratos controles. Neste trabalho não foi analisada a secreção de catecolaminas.

Em 2001, CHAN e colaboradores observaram a concentração plasmática de adrenalina, noradrenalina e glucagon nos seus grupos experimentais (ratos controle, diabéticos sem tratamento e diabéticos tratados com insulina). O resultado de noradrenalina foi similar em todos os grupos experimentais, porém a concentração de adrenalina nos diabéticos sem tratamento foi estatisticamente menor que os controles. Por outro lado, houve aumento significativo de adrenalina nos ratos tratados com insulina.

Em 2002, CHAN e colaboradores analisaram em seus grupos experimentais (os mesmos do trabalho anterior) níveis plasmáticos de vários hormônios sob o efeito da hipoglicemia. Não houve diferença significativa nos níveis de noradrenalina entre os grupos experimentais. Entretanto, os níveis de adrenalina foram significativamente menores nos ratos diabéticos sem tratamento e maiores nos ratos tratados com insulina ao comparar com ratos controles.

Inouye e colaboradores concluíram que o tratamento com insulina previne falhas no processo contraregulatório, mas não em falhas no eixo hipotálamo –

hipófise – adrenal (HPA). Esta prevenção pode estar relacionada com o aumento da via de síntese de catecolaminas em ratos diabéticos que receberam tratamento com insulina NPH (DTI). Seus dados levantam a possibilidade de que a contrarregulação na hipoglicemia em diabéticos tipo 1 se deve à via de síntese de catecolaminas.

Por outro lado, Chan e colaboradores concluíram que o diabetes em um período curto, ativa de forma expressiva o eixo HPA, diminuindo significativamente a resposta à hipoglicemia. Isto pode ser devido a vários fatores, incluindo a incapacidade de aumentar hormônio liberador de corticotropina (CRH) e pró – opiomelanocortina (POMC) em resposta ao baixo nível de glicose plasmática.

Para entendermos melhor as causas da deficiência nos mecanismos contrarregulatórios que ocorre no *diabetes mellitus* e a importância das catecolaminas neste contexto, hipotetizamos que a redução da síntese e da secreção de catecolaminas observada em diabéticos é consequência da hiperglicemia. O trabalho foi desenvolvido utilizando o modelo de diabetes induzido por estreptozotocina, no qual foi avaliado o efeito do diabetes e do tratamento com insulina sobre a síntese e secreção de catecolaminas da glândula supra-renal.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Contribuir para a compreensão do efeito do *diabetes mellitus* sobre a fisiologia das células cromafins da glândula supra-renal e os processos de contrarregulação dos níveis glicêmicos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Determinar se o controle dos níveis glicêmicos reverte as modificações causadas pelo diabetes na síntese e secreção de catecolaminas;
- Determinar se a redução na síntese de catecolaminas é conseqüência da redução da expressão da enzima reguladora da via de síntese destes hormônios.

### **3 Material e Métodos**

#### **3.1 Obtenção, grupos experimentais, indução do diabetes e sacrifício dos animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos, com 60 dias, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de  $23 \pm 2^\circ \text{C}$  e fotoperíodo de 12 h (claro entre 07 h e 19 h).

Os animais foram divididos em três grupos: 1) controle (C); 2) diabéticos sem tratamento (D) e 3) diabéticos que receberam insulina (DTI).

O diabetes foi induzido pela injeção intravenosa da citotoxina estreptozotocina diluída em tampão citrato 0,05 M na dose 50 mg por kg de peso do animal. Os controles receberam injeções de tampão citrato sem estreptozotocina. As análises foram realizadas após 15 dias de injetada a citotoxina.

Durante estes 15 dias, os animais foram pesados e no final deste período, foram sacrificados por deslocamento cervical. No ato do sacrifício, foi coletado sangue para medir a glicemia, o que foi feito usando glucômetro clínico que tem como princípio o método da glicose oxidase (BERGMEYER e BERNT, 1974). A medida da glicemia foi precedida por jejum de 10 horas.

#### **3.2 Determinação do comportamento alimentar, da variação dos níveis glicêmicos e do tratamento dos animais diabéticos com insulina**

A finalidade deste experimento foi analisar o comportamento alimentar dos animais, associando à variação glicêmica e, com estes resultados, determinar o período e a quantidade adequada de insulina injetada no grupo diabético específico (DTI), estabelecendo o nosso protocolo experimental.

Para isso, os ratos controle e diabéticos foram mantidos em gaiolas separadas, com acesso a água e ração; e no período de 24 h, foi medida a glicemia e pesada a ração de hora em hora.

Obtidos estes resultados, foram realizados experimentos para estabelecer o tratamento com insulina que um dos grupos de animais diabéticos receberia.

Iniciamos estes testes injetando insulina NPH (neutral protamine hagedorm) humana nos picos de ingestão alimentar. As doses de insulina foram ajustadas a cada três dias. Após estabelecido o protocolo de tratamento, ele foi testado durante 15 dias após a indução do diabetes, tempo de duração de nossos experimentos.

### **3.3 Análise dos níveis de triglicerídeos, colesterol e suas frações e frutossamina**

Foram analisados o perfil lipídico dos ratos controle, diabéticos e DTI, verificando os níveis de triglicerídeos e as frações do colesterol HDL, LDL e VLDL, bem como o colesterol total.

Foram quantificados também os níveis de frutossamina. Este termo é um nome genérico dado a todas as proteínas glicadas (glicoproteínas), das quais a maior parte é albumina, que constitui a maior massa protéica depois da hemoglobina (GROSS, et al., 2002). Esta glicosilação é decorrente de modificação não enzimática pós-translacional, dependente dos níveis glicêmicos (JOHNSON, METCALF e BAKER, 1983). 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 (JOHNSON, METCALF e BAKER, 1983; LIM e STALEY, 1985). Os níveis de albumina glicada refletem os níveis glicêmicos dos indivíduos e pode ser utilizado como um método de avaliação do estado glicêmico dos diabéticos (NEUMAN et al, 1994).

Os níveis de colesterol e LDL foram determinados por técnica enzimática (hidrólise enzimática e oxidação), sendo que HDL foi determinada por inibição seletiva e VLDL pela técnica enzimática colorimétrica. Para determinação dos níveis de frutossamina, foi utilizada a técnica cinético – colorimétrico e para os níveis de triglicerídeos, o método enzimático colorimétrico (hidrólise enzimática com lípases). Todas estas medidas foram realizadas no laboratório de análises clínicas Cortez Villela, de Juiz de Fora.

O objetivo destas análises foi avaliar o efeito do diabetes sobre estes parâmetros e verificar se o tratamento reverte as modificações causadas pela doença.

### **3.4 Análise da síntese de catecolaminas: conteúdo total e a expressão de tirosina hidroxilase**

Foi avaliados o efeito do diabetes e do tratamento com insulina sobre a síntese de catecolaminas. Estas análises foram feitas medindo o conteúdo total de catecolaminas e a expressão da enzima reguladora da via de síntese de catecolaminas, Tirosina Hidroxilase (TH, EC 1.14.16.2), enzima que demonstramos previamente se afetada pela hiperglicemia (GARCIA, 1998) e em modelo experimental de obesidade (MARTINS et al, 2004).

Após o sacrifício dos animais, as glândulas adrenais esquerdas e direitas são imediatamente retiradas, recebendo tratamentos diferentes, uma vez que as esquerdas foram utilizadas para a dosagem do conteúdo total de catecolaminas e as direitas para analisar a expressão de TH.

As glândulas utilizadas para medir o conteúdo de catecolaminas foram imediatamente congeladas em 500 µl de ácido acético 10% após a sua retirada para posterior dosagem

Por outro lado, as glândulas adrenais direitas foram imediatamente congeladas em tampão fosfato pH 7,4. Posteriormente, as suas células foram lisadas por congelamento/descongelamento e esmagadas com bastão de vidro, na presença de 2 mM de ortovanato de sódio e inibidor de proteases. Os homogeneizados foram centrifugados por 15 minutos a 10000 rpm e o sobrenadante coletado para posterior utilização das proteínas.

O efeito do diabetes sobre a expressão de TH foi estudado fazendo a separação de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida e posterior análise por Western Blot.

Amostras com 10 µg de proteínas foram solubilizadas em tampão SDS (dodecil sulfato de sódio) desnaturante, na presença de β mercaptoetanol e aquecidas a 95° C por cinco minutos. A seguir separou-se às proteínas em gel 10%, junto com marcadores de peso molecular pré-corados e posterior eletrotransferência para membrana de nitrocelulose.

Após a transferência, a membrana foi lavada com tampão Tris (TBS), pH 7,6 e incubada em TBS com 5% de leite em pó caseiro desnatado e 0,15% de Tween

20, durante uma hora. Depois a membrana foi lavada por três vezes de cinco minutos com TBS. Após as lavagens, a membrana foi incubada (em TBS com 0,15% de Tween 20 e 1% de leite) com anticorpos monoespecíficos contra TH na diluição de 1:2000. O tempo de incubação no primeiro anticorpo foi durante uma noite. Depois a membrana foi lavada três vezes com TBS e incubada, por uma hora, com segundo anticorpo conjugado a peroxidase na diluição 1:2000.

A seguir, a membrana foi lavada três vezes com TBS e incubada por cinco a 20 minutos com kit ECL (Enhanced Chemiluminescence). As proteínas imunorreativas foram digitalizadas e a avaliação/quantificação foi feita com o auxílio do programa de computador ImagePro (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD).

### **3.5 Estudo in vitro da secreção de catecolaminas**

Avaliamos o efeito dos tratamentos sobre a secreção de catecolaminas basal e a estimulada. Nestes experimentos, após a retirada e pesagem das glândulas, elas foram mantidas em tampão Krebs-Hepes, pH 7,2, até o momento da dissecação.

Nos experimentos de estimulação da secreção de catecolaminas, ela foi avaliada sob três abordagens:

- 1- Em resposta à indução da despolarização da membrana plasmática com altas concentrações de potássio;
- 2- Em resposta à estimulação via receptores. Neste caso utilizou-se a carbamilcolina, um análogo sintético da acetilcolina, o estimulador fisiológico da secreção de catecolaminas;
- 3 - Em consequência da mobilização de  $Ca^{2+}$  de "pools" intracelulares. Neste caso foi utilizada cafeína, um reconhecido mobilizador de  $Ca^{2+}$  do retículo endoplasmático (ENDO, 1977).

Para dissecar as glândulas adrenais, utilizaram-se microscópio estereoscópico, pinças e tesouras oftalmológicas. Depois de dissecadas, as medulas foram mantidas em solução salina Krebs-Hepes com 0,5% de albumina e composta por (em mM):  $Cl^-$  154,26;  $Na^+$  143,4;  $Ca^{2+}$  2,5;  $Mg^{2+}$  1,18;  $SO_4^{2-}$  1,2;  $K^+$  5,9; e Hepes 25. Faz parte da solução salina padrão a glicose, que teve concentração variável de acordo com a glicemia de cada rato. A razão desta

manobra é manter na solução salina uma concentração similar à glicemia, observada no animal vivo. O pH das soluções foi 7,2.

As estimulações foram realizadas em placas para cultivo de células do tipo Costar com 96 poços. Em cada poço foram colocados 200 µl de solução salina com ou sem secretagogo, de acordo com o protocolo experimental. O tempo de estimulação foi de 5 minutos por poço.

A secreção basal foi determinada pela incubação das medulas supra-renais em solução salina padrão na ausência de estimulador. A secreção foi estimulada pela incubação das medulas em solução salina Krebs-Hepes com 30 mM de K<sup>+</sup> ou 50 µM de carbamilcolina ou 25 mM de cafeína. Nos experimentos de estimulação com altas concentrações de K<sup>+</sup> e cafeína foi retirada quantidade equivalente de Na<sup>+</sup> para manter a osmolaridade da solução.

Ao final da estimulação, as medulas foram acondicionadas em tubos de eppendorf com 220 µl de ácido acético 10%. Às soluções de incubação foram adicionados 20 µl de ácido acético concentrado e guardadas em tubos de eppendorf. As medulas e as soluções de incubação foram armazenadas em *freezer* para posterior dosagem das catecolaminas.

### **3.6 Dosagem de catecolaminas**

As catecolaminas foram dosadas pelo método fluorimétrico do trihidroxiindol (KELNER et al, 1985). Para avaliar o processo de secreção, foram medidas as catecolaminas secretadas e as remanescentes nas células da medula, permitindo avaliar o processo em termos de percentual de catecolaminas secretadas.

As medulas foram congeladas e descongeladas por três vezes, para posteriormente serem maceradas e o material centrifugado a 14000 rpm por cinco minutos, para a utilização do sobrenadante. As glândulas receberam o mesmo tratamento das medulas.

Foram utilizados 50 µl de cada amostra, tanto das glândulas como das catecolaminas secretadas e remanescentes das medulas. A este volume foram adicionados 250 µl de tampão fosfato 0,5 M, pH 7,0 e, a seguir, 25 µl de ferricianeto de potássio 0,5%. A solução foi misturada e incubada por 20 minutos.

A reação foi paralisada com a adição de 500  $\mu$ l de ácido ascórbico/NaOH 10 N, na proporção 1:19. Após este passo foram adicionados 2,0 ml de água destilada, a solução foi misturada e procedeu-se à leitura da fluorescência. Os comprimentos de onda usados para a leitura em fluorímetro foram 420 nm de excitação e 510 nm de emissão.

Paralelamente à dosagem de catecolaminas foi feita curva padrão de adrenalina.

Todas as dosagens foram feitas em duplicatas e com os tubos em banho de gelo durante todo o procedimento.

Os resultados das análises da secreção de catecolaminas são expressos como percentual de secreção em relação ao total de catecolaminas da medula supra-renal.

### **3.7 Análise estatística**

Os dados são apresentados como média e erro padrão da média e as comparações feitas usando o teste t de Student, considerando significativos os valores de  $p < 0,05$ .

## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 Comportamento alimentar e variação dos níveis glicêmicos de ratos controle e com diabetes induzido por estreptozotocina

Após levantamento bibliográfico com o objetivo de estabelecer o tratamento para ratos diabéticos utilizando insulina exógena, vários artigos foram encontrados, porém a maioria não descreve detalhadamente o seu protocolo.

O modelo animal, o tipo de insulina empregada nos tratamentos e os horários de sua aplicação são variados entre os trabalhos.

Sivitz et al. (1998) induziram ratos Sprague-Dawley com 125 mg de estreptozotocina por quilo do animal. Os ratos diabéticos foram tratados com insulina humana regular e NPH (neutral protamine hagedorm), sendo 2 U de insulina regular no momento do diagnóstico do diabetes e diariamente 1 U de insulina regular associada a 3 U de insulina NPH às 18 h e 1 U da insulina regular associada a 1 U da insulina NPH às 9 h.

Saito, Weiss e Latifpour (1999) utilizaram de 5 a 8 U de insulina zíncica protamina diariamente para tratar ratos Sprague-Dawley diabéticos induzidos por 65 mg de estreptozotocina, porém não citaram os horários de aplicação da insulina.

Yono et al. (2005) utilizaram ratos BB (BBDR/WOR) em três condições: ratos espontaneamente diabéticos, diabéticos por estreptozotocina e linhagem resistente ao diabetes. Trataram o diabetes com uma dose diária de insulina zíncica protamina, sendo que a dose era ajustada no momento da aplicação da insulina.

Hardin, Dominguez e Garvey (1993) induziram o diabetes em ratos Sprague-Dawley com 60 mg/Kg de estreptozotocina. Fizeram o tratamento com apenas uma dose diária de insulina zíncica protamina (40U/Kg), não citando o horário da sua injeção.

Shimomura et al. (1990), utilizaram ratos Wistar induzidos por estreptozotocina (60 mg/Kg de peso do animal) e realizaram o tratamento injetando 3 U às 18 h e 2 U às 6 h de insulina NPH, com resultados satisfatórios (158,0 ± 27,2 mg/dl às 3h e 130,0 ± 16,1 mg/dl às 15 h). Apesar deste artigo utilizar o mesmo modelo animal e a mesma insulina utilizada em nossos experimentos, não utilizamos o seu protocolo devido a diferenças experimentais, tais como: (A) a quantidade de

estreptozotocina. Os autores utilizaram 60 mg/Kg para induzir o diabetes e nós utilizamos 50 mg/dl; (B) aceitamos somente ratos com glicemia acima de 250mg/dl para iniciar o tratamento com insulina, enquanto Shimomura e colaboradores aceitaram valores glicêmicos acima de 200 mg/dl; (C) o protocolo experimental destes autores foi de quatro semanas. Durante este período, fizeram quatro reajustes nas doses administradas nos ratos diabéticos, até chegarem na dose ideal; (D) a coleta do sangue foi através de uma cânula inserida na veia cava; (E) não informam se os níveis glicêmicos encontrados com o protocolo estabelecido são pós-prandiais ou em jejum (para nós, em jejum, a glicemia não deveria ser superior a 150 mg/dl).

Portanto decidimos avaliar o comportamento alimentar e a variação dos níveis glicêmicos dos nossos animais (ratos Wistar) durante 24 h consecutivas, para posteriormente estabelecer um protocolo de tratamento com insulina exógena por via subcutânea em ratos diabéticos induzido por estreptozotocina.

A Figura 1 mostra que a ingestão de ração pelos ratos controle aumenta, predominantemente, 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 16 h até o apagar da luz, às 19 h. Essa elevação na ingestão se refletiu em um aumento mais acentuado nos níveis glicêmicos dos animais durante esses intervalos de tempo. Apenas uma queda acentuada do nível glicêmico foi vista às 9 e 10 h, o que pode ser entendido como resultado da baixa ingestão de ração nas últimas horas da fase escura e as duas primeiras horas da fase clara.

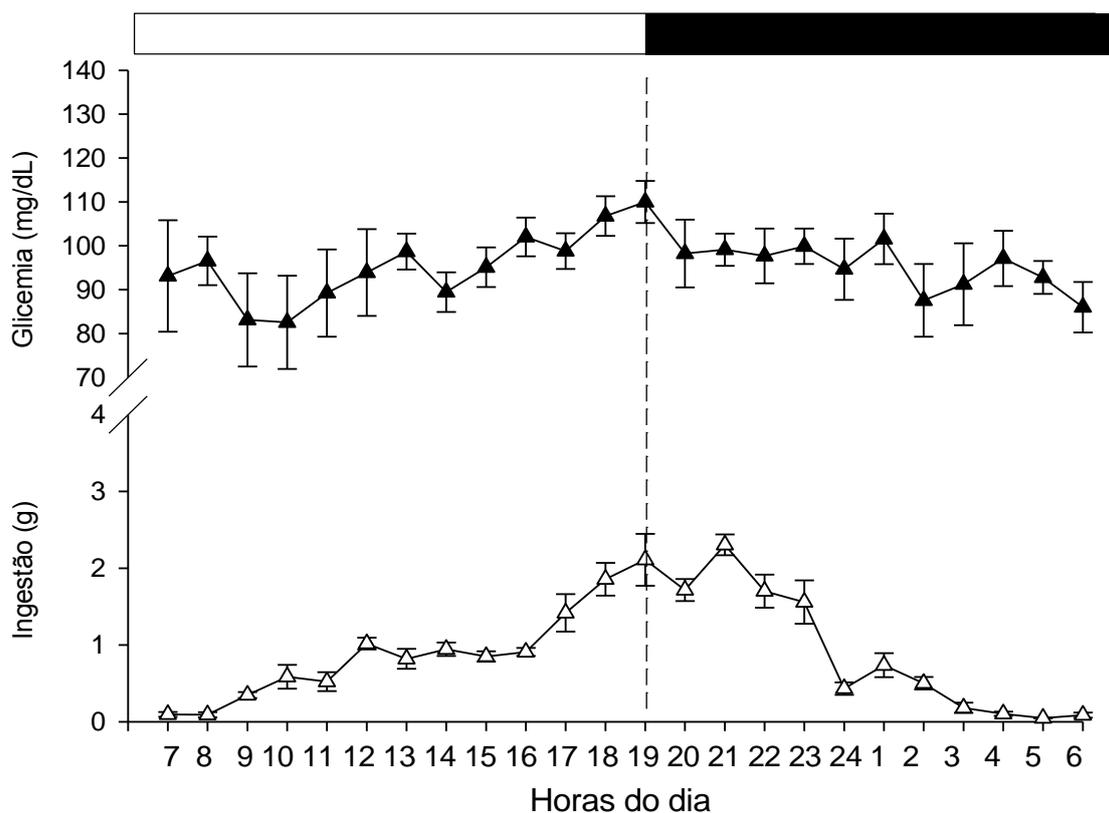


Figura 1: Variação glicêmica (triângulos pretos, n = 9) e da ingestão de ração (triângulos brancos, n = 9) de ratos Wistar controles durante o período de 24 horas. No topo da figura está indicado o fotoperíodo: a barra branca representa a fase clara e a barra preta representa a fase escura. A linha vertical tracejada indica a mudança do fotoperíodo, de claro para escuro. As linhas verticais representam o EPM.

Por outro lado, percebe-se que os ratos diabéticos tiveram oscilações na ingestão de ração (Fig. 2). Durante a fase clara, houve aumentos de ingestão de ração nos intervalos 8-9 h; 11-12 h; 15-16 h e de 17 às 19 h. Entre estes intervalos, sempre ocorreu declínio na ingestão de ração. Porém, com relação à glicemia, a partir das 12 h os níveis glicêmicos apresentaram pouca variação. Oscilações mais acentuadas durante a fase clara foram vistas do início dessa fase até o meio dia.

Há semelhanças no comportamento alimentar entre os ratos controles e diabéticos na fase clara, quando comparamos o período de 12 h às 15 h (sem variações acentuadas na ingestão de ração), e de 17 h às 19 h (aumento acentuado na ingestão, porém houve diferença significativa,  $p < 0,01$ , somente na ingestão dos ratos diabéticos). A glicemia aumentou em ambos os grupos experimentais, porém sem diferença significativa, no período de 17 às 19 h, quando houve também aumento da ingestão de ração.

Durante a fase escura do fotoperíodo, 19 às 7 h, os ratos controles (Fig.1) e diabéticos (Fig.2) apresentaram dois picos alimentares, o primeiro às 21 h nos dois grupos e o segundo à 1 h nos animais controle e às 2 h nos animais diabéticos. Para os dois grupos de animais, esses dois picos foram separados por um declínio da ingestão que se iniciou às 22 h, alcançando uma redução máxima de ingestão às 24 h.

Outra semelhança observada entre o padrão alimentar dos ratos controle e diabéticos foi à queda acentuada na ingestão nas quatro últimas horas da fase escura. Os ratos diabéticos elevaram a ingestão logo após o início da fase clara, porém diminuiu entre 9 h e 10 h ( $p < 0,05$ ) e aumentou expressivamente no intervalo de 11 h e 12 h ( $p < 0,01$ ). Já os ratos controle elevaram a ingestão apenas a partir das 9 h ( $p < 0,05$ ).

Já foi demonstrado que ratos diabéticos por estreptozotocina apresentam maior ingestão de alimentos quando comparados com ratos controles. (BOOTH, 1972; CASTRO e BALAGURA, 1975; PLAZA, GRANDA e CACHERO, 1993; PAL, PAL e MADANMOHAN, 2002). Isso foi observado no nosso trabalho, porém esta diferença não foi significativa.

Pal, Pal e Madanmohan (2002), reportaram que após induzir diabetes em ratos Wistar machos utilizando uma dose única de 75mg/Kg de estreptozotocina verificaram que os ratos controles ingeriram  $14,30 \pm 0,26$ g/dia enquanto os ratos diabéticos ingeriram  $18,24 \pm 0,27$ g/dia.

Ao comparar os resultados de Pal, Pal e Madanmohan (2002) com os dados do nosso trabalho, verifica-se que os nossos ratos tiveram uma maior média na ingestão de ração (controles ingeriram  $20,93 \pm 0,99$ g/dia e diabéticos ingeriram  $22,14 \pm 0,84$ g/dia). Há várias explicações possíveis para esta diferença.

- O diabetes induzido por nós foi mais brando. Utilizamos 50mg/Kg de animal da droga diabetogênica, enquanto Pal, Pal e Madanmohan (2002) utilizaram 75mg/Kg de animal;

- Acondicionamento dos animais: nós mantivemos três ratos por gaiola, enquanto Pal, Pal e Madanmohan (2002) acondicionaram os ratos isoladamente.

- Adotamos um ciclo de claro/escuro, sendo a fase clara de 7h às 19h e a escura de 19h às 7h, enquanto Pal, Pal e Madanmohan (2002) utilizaram iluminação natural.

- Ao manipular os animais de hora em hora para coletar sangue (verificação da glicemia) e pesagem da ração durante o experimento, isto poderia aumentar a ingestão, pois no período que estes ratos deveriam estar dormindo, após manipulá-los, é provável que eles ingiram ração. Nos experimentos de Pal, Pal e Madanmohan (2002) os animais não foram submetidos a esta manipulação.

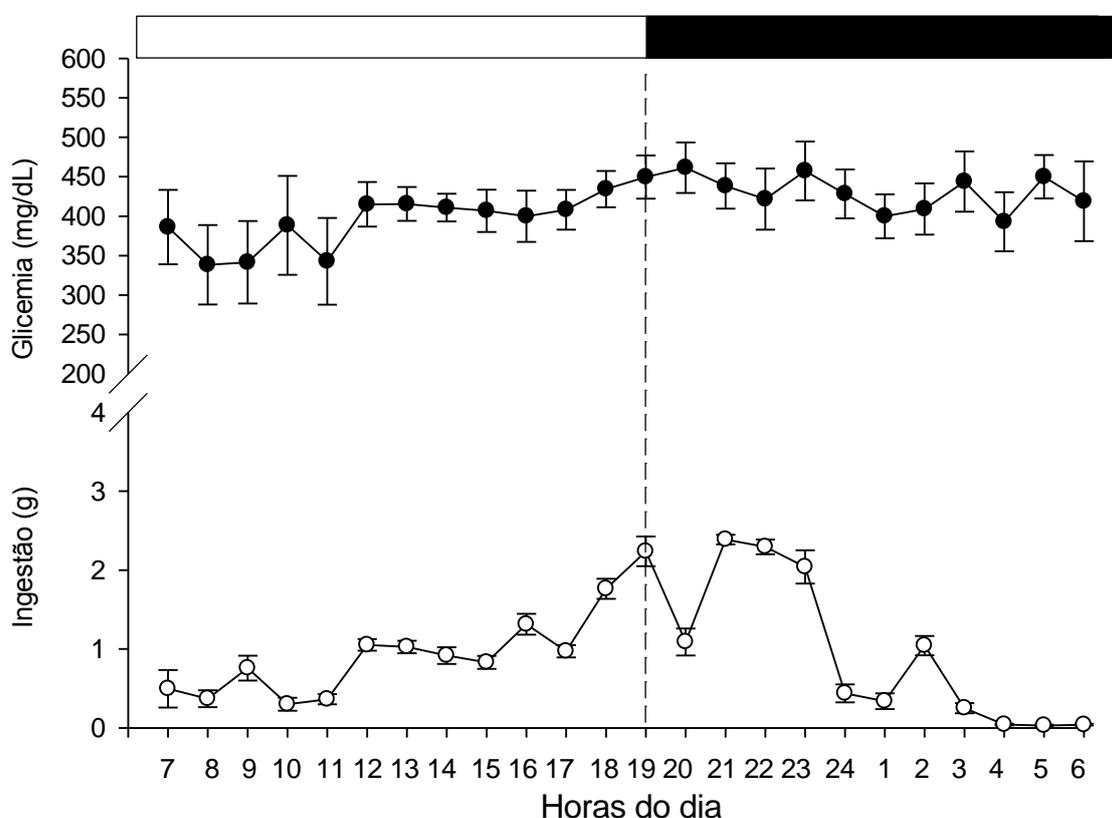


Figura 2: Variação glicêmica (círculos pretos, n = 10) e da ingestão de ração (círculos brancos, n= 12) de ratos Wistar diabéticos durante o período de 24h. No topo da figura está indicado o fotoperíodo: a barra branca representa a fase clara e a barra preta representa a fase escura. A linha vertical tracejada indica a mudança do fotoperíodo, de claro para escuro. As linhas verticais representam o EPM.

Os fatores citados acima influenciam o padrão de alimentação dos animais (DEMARIA-PESCE e NICOLAIDIS, 1998). A idade dos animais utilizados e o tempo decorrido de diabetes no momento da realização dos experimentos também influenciam nessa diferença, porém esses dados não foram mencionados no trabalho.

Booth (1972) relatou que em ratos Spreague Dawley diabéticos por 50mg ou mais de estreptozotocina por quilograma de peso do animal, a ingestão de ração foi moderadamente deprimida no primeiro dia após a indução do diabetes. No segundo e terceiro dia após a indução da doença, o consumo de ração dos ratos diabéticos e controles era estatisticamente igual. O consumo de ração foi significativamente superior ao dos controles nos dias subsequentes (quarto ao sexto).

Em nossos experimentos, avaliamos o consumo após três dias da indução do diabetes. Não houve diferença estatística no consumo da ração, confirmando o que foi dito por Both (1972). Apesar desta confirmação, a linhagem de ratos utilizados por Both (1972) é diferente da linhagem de nossos ratos. Já foi reportado que o comportamento alimentar pode diferir entre as várias linhagens de ratos de laboratório (GLENDDINNING e SMITH, 1994).

Apesar do consenso de que ratos diabéticos apresentam aumento da ingestão de alimento, existem divergências quanto ao padrão alimentar exibido pelos ratos doentes. Há um trabalho que demonstra que ratos diabéticos por estreptozotocina apresentam o tempo de duração da refeição, quantidade de alimento ingerido durante a refeição e duração da saciedade marcadamente menor que o apresentado por animais normais (Booth, 1972) enquanto outro mostra que após a injeção de estreptozotocina em ratos, o aumento na alimentação por esses animais é devido à ocorrência de refeições de longa duração (CASTRO e BALAGURA, 1975).

Já foi relatado que ratos sadios apresentam alimentação predominantemente noturna (JOHNSON e JOHNSON, 1990; PLAZA, GRANDA e CACHERO, 1993; DEMARIA-PESCE e NICOLAIDIS, 1998), o que foi confirmado em nossos experimentos. Além disso, verificamos que os ratos diabéticos mantiveram o ritmo circadiano de alimentação, ou seja, também apresentaram alimentação predominantemente noturna (PLAZA, GRANDA e CACHERO, 1993). Ratos diabéticos, apesar da polifagia, mantêm o ritmo circadiano de alimentação (PLAZA, GRANDA e CACHERO, 1993; CASTRO e BALAGURA, 1975) embora a diferença entre a ingestão durante o dia e a noite seja diminuída (PLAZA, GRANDA e CACHERO, 1993).

## 4.2 Tratamento de ratos Wistar diabéticos por estreptozotocina utilizando insulina exógena NPH humana

Com os resultados do comportamento alimentar e variações glicêmicas, iniciou-se o trabalho para estabelecer um protocolo de tratamento dos animais diabéticos com insulina.

Os horários da aplicação de injeções subcutâneas de insulina foram estabelecidos de acordo com os intervalos de tempo em que os animais ingerem maior quantidade de ração, o que conseqüentemente acentua a hiperglicemia. Esses horários são: 10, 13 e 19 h. Após vários reajustes nas doses de insulina injetadas nos ratos diabéticos, iniciamos o trabalho utilizando a insulina NPH humana, um tipo de insulina de ação intermediária, com a dose de 5 U/dia sendo 1 U às 13 h e as 4 U restantes às 19 h.

A Figura 3 mostra os níveis glicêmicos dos grupos experimentais no período de 15 dias, indicando o sucesso no controle da glicemia dos ratos diabéticos que receberam tratamento com insulina.

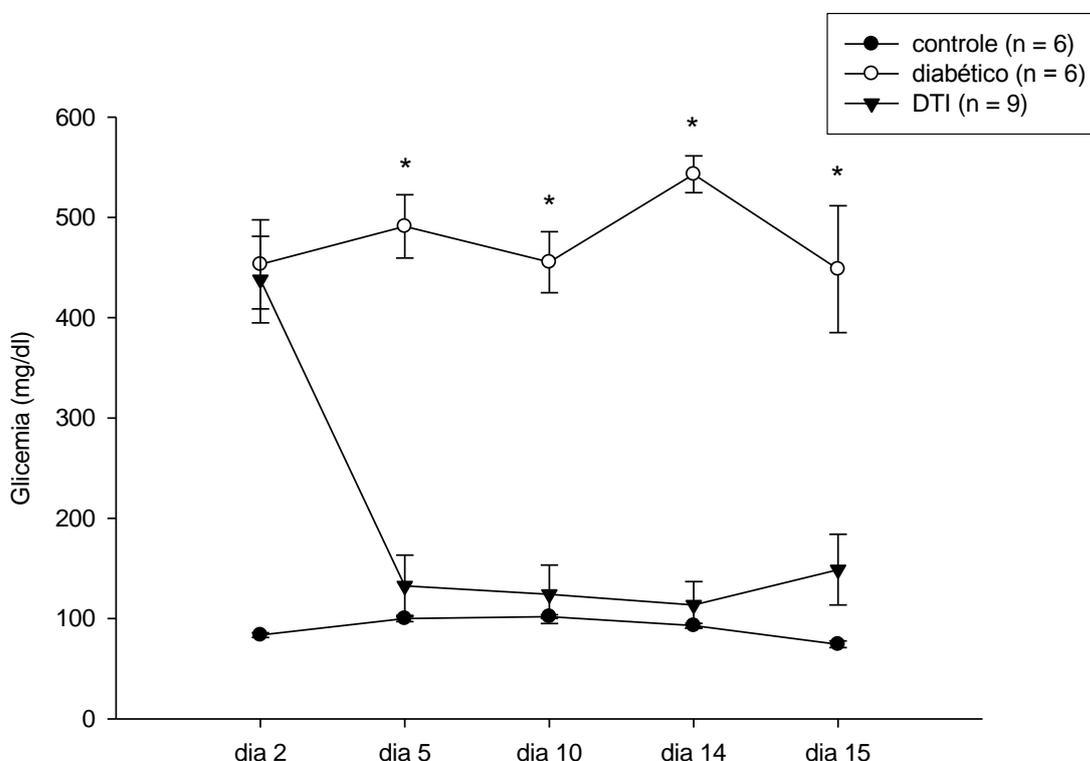


Figura 3 - Efeito do tratamento de ratos diabéticos por STZ utilizando 5U de insulina NPH, sendo 1U injetada às 13h e as 4U restantes as 19h. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*  $p < 0,05$ , ao comparar com os ratos controle e diabéticos tratados com insulina (DTI).

Após verificar o sucesso do controle glicêmico (Fig. 3), foi estabelecido o protocolo de tratamento (Fig 4).

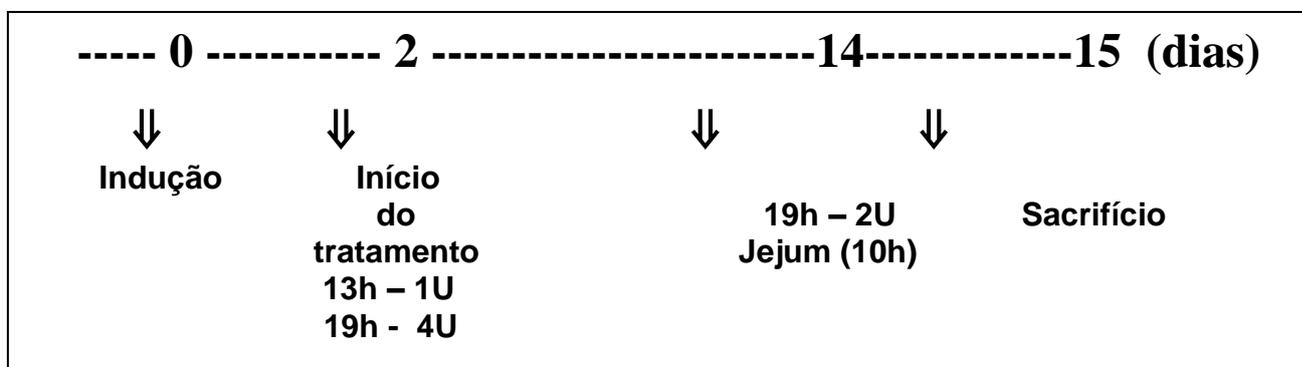


Figura 4 – Desenho do protocolo de tratamento dos ratos diabéticos com insulina.

#### 4.3 Níveis glicêmicos, massa corporal e massa glandular

A Figura 5 mostra a glicemia em jejum dos animais no 2º dia após a indução do diabetes, que corresponde ao início do tratamento com a insulina (controles,  $96,47 \pm 1,81$  mg/dl; diabéticos,  $438,91 \pm 17,10$  mg/dl; diabéticos que receberão insulina,  $415,68 \pm 14,86$  mg/dl). A glicemia dos ratos diabéticos acima de 400 mg/dl indica o sucesso da indução com a estreptozotocina e não há diferença significativa entre os dois grupos de diabéticos.

De acordo com a American Diabetes Association, 2007, são consideradas normoglicêmicas, as pessoas que possuem glicemia plasmática de 60 a 99 mg/dl em jejum. Indivíduos são considerados diabéticos quando ao fazer o exame em jejum, e este é repetido pelo menos duas vezes, apresentam glicemia acima de 126 mg/dl ou glicemia acima de 200 mg/dl em qualquer hora do dia, acompanhado por sintomas.

Neste trabalho, a divisão dos animais em grupos experimentais, foi baseada na glicemia capilar em jejum, sendo considerado controles, os ratos com glicemia entre 60 a 100 mg/dl, ratos diabéticos com glicemia acima de 250 mg/dl e diabéticos que receberam tratamento com insulina, no intervalo de 60 a 150 mg/dl. Os animais que não estavam dentro deste padrão estabelecido, foram descartados do estudo.

A Figura 6 mostra os níveis glicêmicos dos ratos após 15 dias de experimento (controles,  $82,82 \pm 1,24$  mg/dl; diabéticos,  $405,74 \pm 23,35$  mg/dl; diabéticos tratados

com insulina,  $103,72 \pm 6,79$  mg/dl), evidenciando o sucesso do protocolo estabelecido. Lembrando que, no início do tratamento, os ratos DTI tinham glicemia de  $415,68 \pm 14,86$  mg/dl (Fig.5).

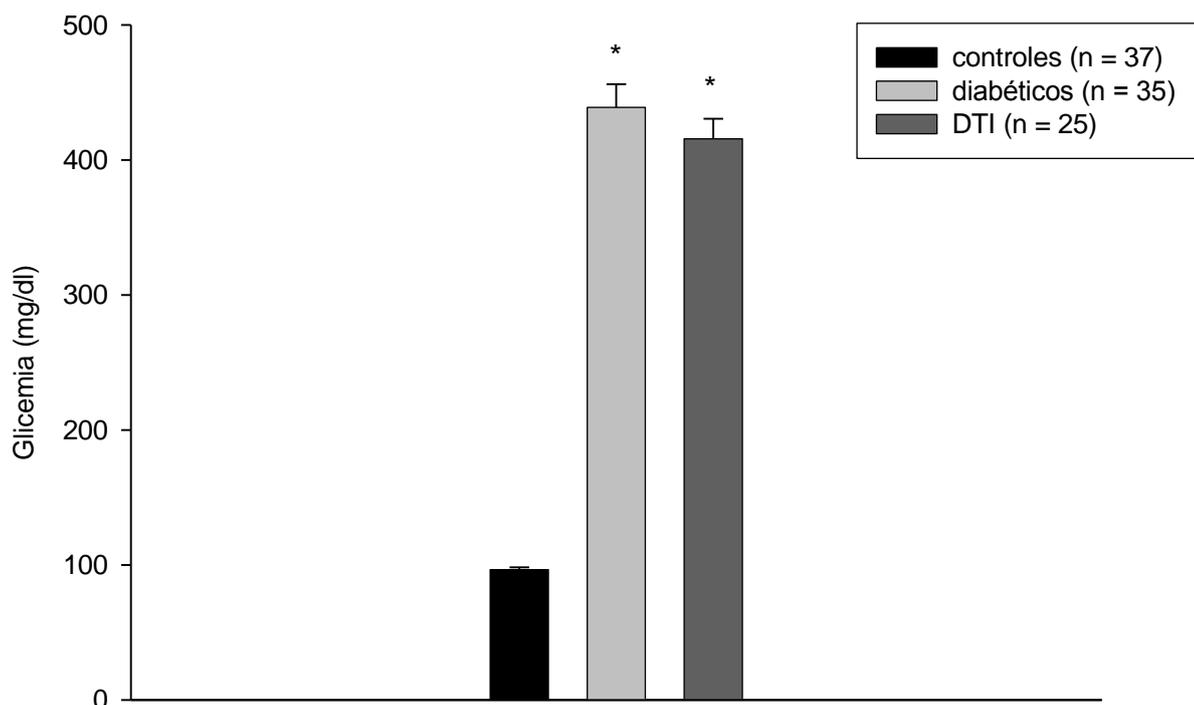


Figura 5 - Comparação das glicemias dos ratos no 2º dia após a indução do diabetes e 1º dia do tratamento com a insulina. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$  ao comparar com o controle.

Há vários trabalhos que citam as médias glicêmicas de seus modelos experimentais, porém o modelo animal, o tipo e a quantidade da droga diabetogênica, entre outras características, são diferentes. Soltani, Keshavarz e Dehpour (2007), observaram que seus ratos Wistar controle tinham glicemia de 126 mg/dl e o grupo de ratos considerados diabéticos (por estreptozotocina, após dez dias da indução) apresentaram média glicêmica de 297 mg/dl. Plaza, 1993, considerou diabéticos os ratos com glicemia superior a 400 mg/dl.

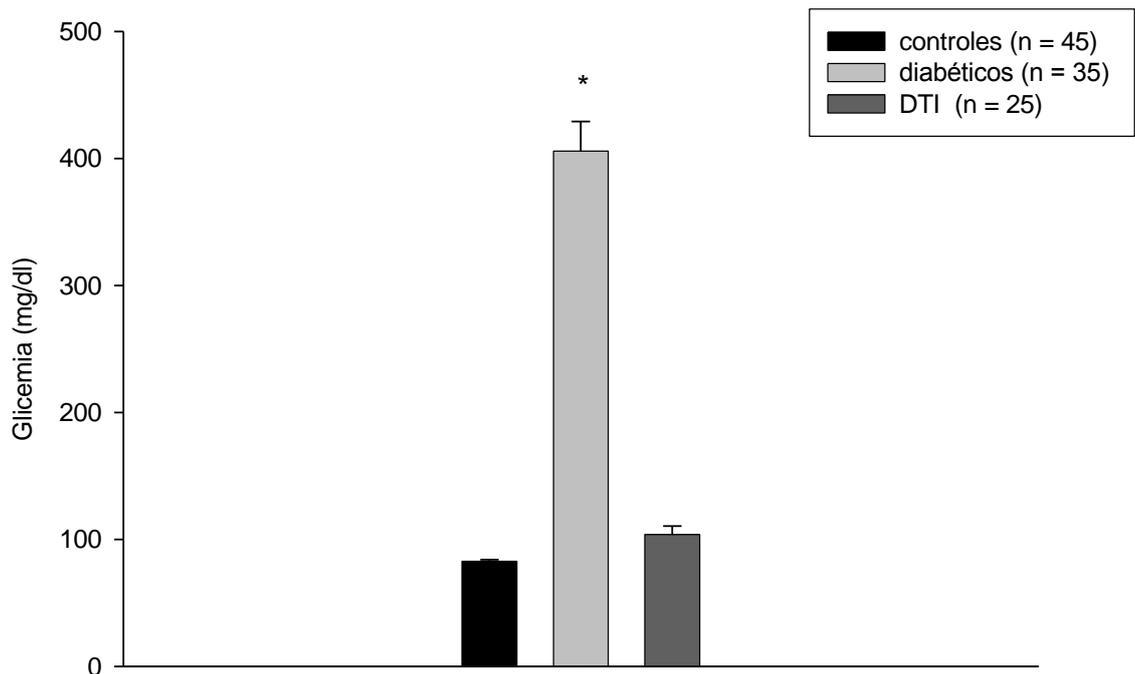


Figura 6 - Comparação da glicemia dos animais no 15º dia após a indução do diabetes. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*  $p < 0,05$  ao comparar com controles e diabéticos tratados com insulina (DTI).

Pal, Pal e Madanmohan (2002) utilizaram em seus estudos ratos Wistar e obtiveram glicemias de  $64,9 \pm 1,72$  mg/dl em ratos saudáveis, e de  $331,4 \pm 3,47$  mg/dl em ratos diabéticos..

Devido à dificuldade de encontrar um artigo que estabeleça o intervalo glicêmico para ratos Wistar controles e diabéticos, baseamos as glicemias dos animais utilizados neste trabalho, em glicemias humanas.

As Figuras 7 e 8 mostram, respectivamente, a massa corporal dos ratos após 15 dias de experimento e a variação da massa corporal durante o período experimental.

Enquanto a massa corporal dos diabéticos, ao final do experimento, foi de  $184,33 \pm 3,45$ g, os animais controles e os diabéticos tratados com insulina apresentaram massa corporal de  $233,96 \pm 3,23$ g e  $248,15 \pm 4,65$ g, respectivamente (Fig. 7).

A avaliação da variação da massa corporal durante o período experimental mostra que os ratos diabéticos emagreceram, em média,  $6,1 \pm 3,84$ g. Os animais

controle e os diabéticos tratados com insulina, aumentaram suas massas em  $36,34 \pm 1,8g$  e  $43,32 \pm 3,79g$ , respectivamente. (Fig. 8).

Já foi citado na literatura que os animais diabéticos apresentam menor ganho de massa corporal quando comparados a animais controle (PATEL, 1983; WILKE e HILLARD, 1994; CHAN et al, 2002; CHAN et al, 2005), o que foi confirmado em nossos experimentos. A massa corporal dos ratos diabéticos foi significativamente menor, 21,21%, enquanto que nos ratos diabéticos que receberam tratamento com insulina ela foi 6,07% maior (diferença não significativa).

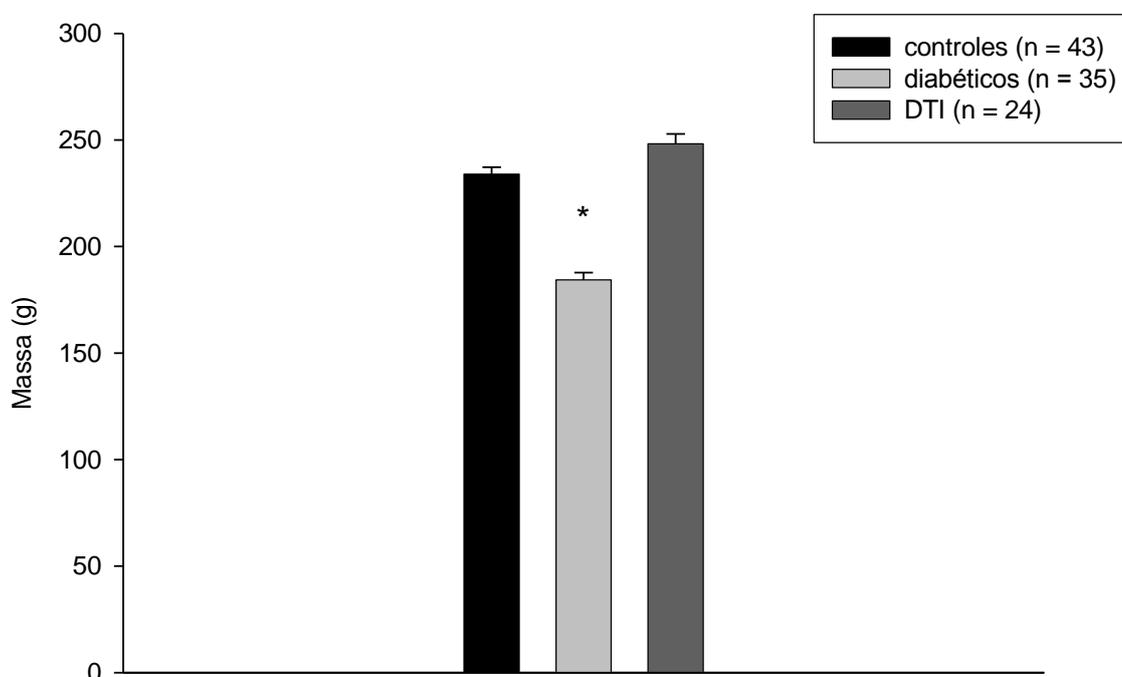


Figura 7 - Massa corporal após 15 dias de indução do diabetes. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*  $p < 0,05$  ao comparar com controles e diabéticos tratados com insulina (DTI).

A Figura 9 mostra a comparação das massas das glândulas adrenais (somatório das massas das glândulas direitas - GD e esquerdas - GE).

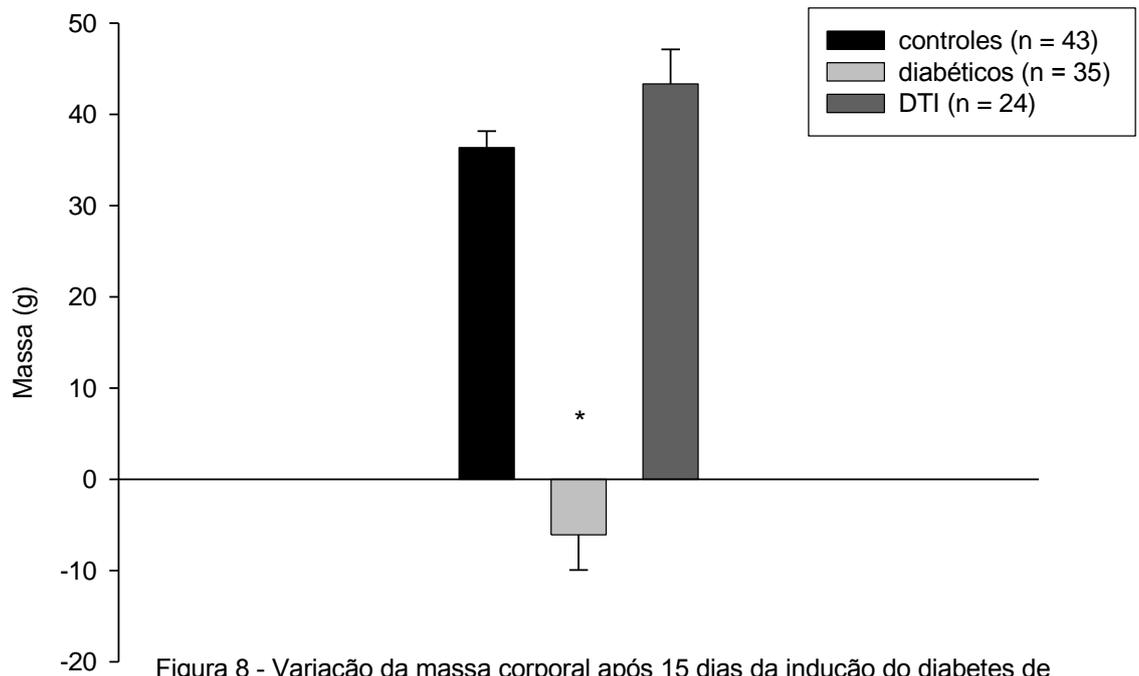


Figura 8 - Variação da massa corporal após 15 dias da indução do diabetes de ratos controles, diabéticos, diabéticos/insulina (DI). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$  ao comparar com controles e diabéticos tratados com insulina (DTI).

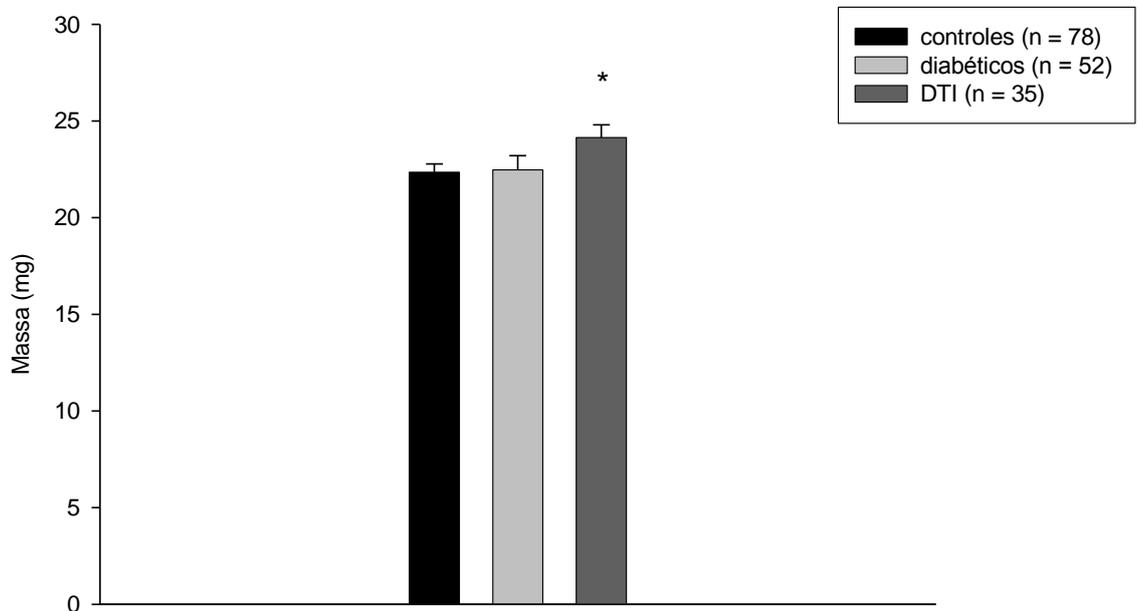


Figura 9 - Massa das glândulas adrenais (glândulas direitas + glândulas esquerdas) após 15 dias da indução do diabetes. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$  ao comparar com controles e diabéticos.

Observa-se que não há diferença significativa na massa das glândulas adrenais dos ratos controles e ratos diabéticos,  $22,35 \pm 0,43\text{g}$  e  $22,68 \pm 0,66\text{g}$ , respectivamente. Por outro lado, houve aumento significativo da massa glandular nos ratos diabéticos que receberam tratamento com insulina,  $24,14 \pm 0,67\text{g}$ .

Comparando as massas das glândulas esquerda e direita, não foi observada diferença significativa entre elas (Fig 10).

Já foi relatado por Kunjara et al. (1992), que em ratos Wistar diabéticos induzidos por estreptozotocina, ocorre a hipertrofia das glândulas supra-renais. Por outro lado, Inouye e colaboradores, 2004, mostraram que o diabetes não afeta a massa supra-renal de ratos Sprague-Dawley. Nas nossas condições experimentais, o diabetes não afetou a massa das glândulas supra-renais.

O aumento significativo das glândulas adrenais dos ratos DTI pode ter ocorrido devido a diversos fatores. Já foi demonstrado que as células cromafins da glândula supra-renal possuem receptores para fatores de crescimento similares à insulina e insulina (DAHMER e PERLMAN, 1988; KVETNANSKY et al., 1997). Os fatores de crescimento similares à insulina, IGFs (insulin-like growth factors), são hormônios polipeptídeos relacionados com a estrutura e função da insulina. *In vitro*, a atividade mitogênica da IGF I e IGF II são similares a insulina. *In vivo*, IGF I mimetiza o efeito do hormônio de crescimento (HASELBACHER et al, 1986). Burner, et al. (2002) também afirma que a insulina tem efeito mitogênico semelhante a IGF.

Ross et al. (2007) demonstraram que a injeção de IGF durante o período fetal, não provocou aumento no feto, porém aumentou significativamente às suas glândulas adrenais. Frodin e Gammeltoft (1994) também observaram que IGF está relacionado com o crescimento das células cromafins.

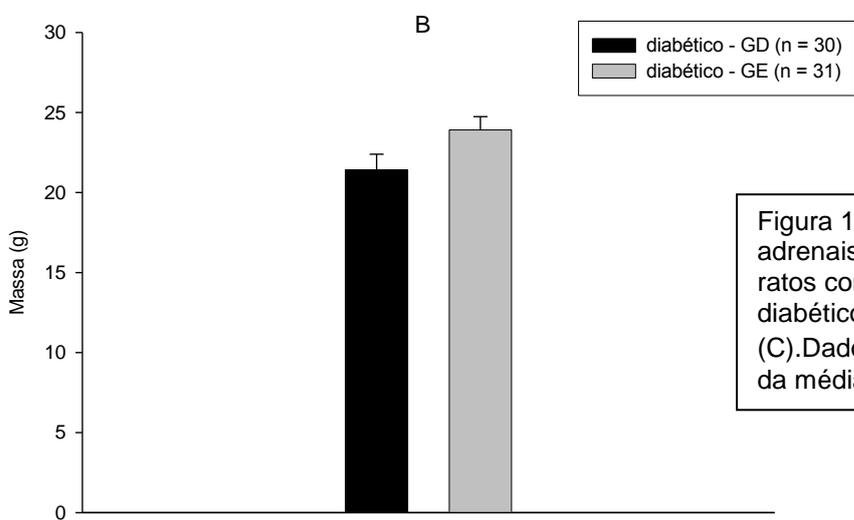
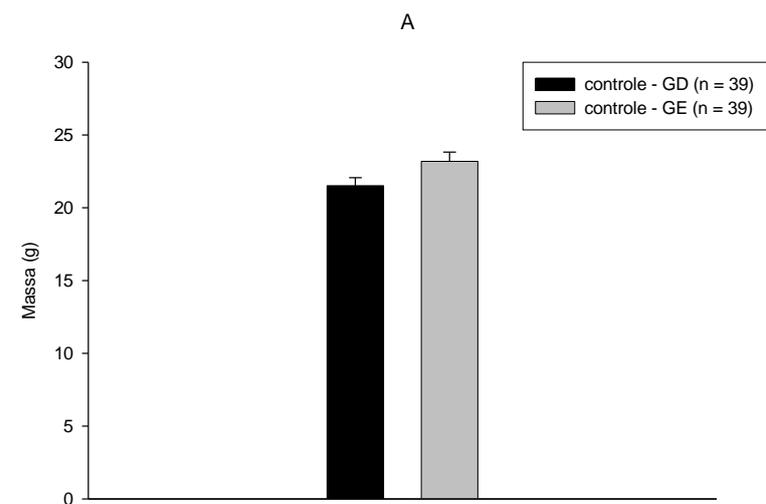
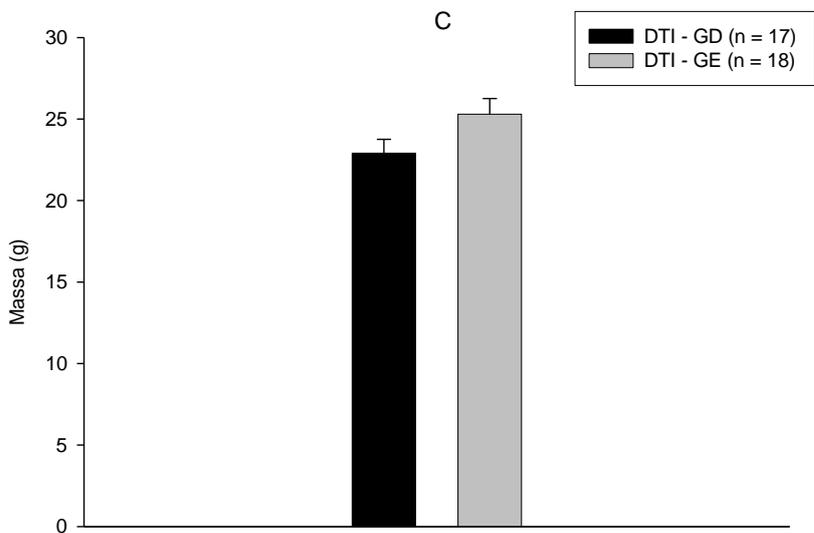


Figura 10 – Comparação da massa das glândulas adrenais direitas (GD) e esquerdas (GE), entre os ratos controles (A), ratos diabéticos (B) e ratos diabéticos que receberam tratamento com insulina (C). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.



Além disso, Dijik, Tanswell e Challis (1988) mostraram em células fetais adrenais *in vitro* que IGF II associado à insulina, promove atividade mitogênica da glândula adrenal e, que IGF II na ausência da insulina, perde a função mitogênica. Isso nos permite supor que o aumento significativo das glândulas adrenais dos ratos diabéticos que receberam tratamento com a insulina pode ter ocorrido devido à ação mitogênica da insulina.

#### 4.4 Determinação dos níveis séricos de frutossamina, triglicerídeos e do colesterol e suas frações

As dosagens dos níveis séricos de frutossamina, triglicerídeos e do colesterol e suas frações, foram feitas para avaliar o efeito do diabetes sobre estes parâmetros e a eficácia do tratamento com insulina para reverter as possíveis mudanças causadas pela doença.

A Tabela 1 apresenta os valores médios e o erro padrão da média do perfil lipídico e níveis de frutossamina de ratos Wistar no final do período experimental (15 dias e, no grupo DTI, 13 dias de tratamento com insulina NPH humana).

	<b>Ratos controles (n = 8)</b>	<b>Ratos diabéticos (n = 8)</b>	<b>Ratos DTI (n = 8)</b>
Colesterol total	73,13 ± 3,35	60,13 ± 3,62 *	70,88 ± 4,09
HDL	29,50 ± 2,24	24,50 ± 1,64 **	34,13 ± 3,36
LDL	24,75 ± 2,13	11,63 ± 1,90 *	17,50 ± 4,30
VLDL	18,88 ± 1,38	24,00 ± 1,45 #	19,13 ± 1,17
Triglicerídeos	95,88 ± 6,93	115,38 ± 7,91	97,75 ± 6,10
Frutossamina	299,50 ± 20,33	307,38 ± 20,92	234,63 ± 20,77 #

Tabela 1: O efeito do diabetes sobre os níveis séricos de frutossamina, triglicerídeos e do colesterol e suas frações. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média e em mg/dl. \* p < 0,05 ao comparar com os animais controles; \*\* p < 0,05 ao comparar com os ratos DTI; # p < 0,05 ao comparar com os demais grupos experimentais.

Os níveis de colesterol total, VLDL e triglicerídeos do grupo controle são muito parecidos 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  $62,8 \pm 13$  mg/dl (os nossos  $73,13 \pm 3,35$  mg/dl), VLDL de  $19,9 \pm 5,1$  mg/dl (os nossos  $18,88 \pm 1,38$  mg/dl) e triglicerídeos de  $83,7 \pm 11$  mg/dl (os nossos  $95,88 \pm 6,93$ mg/dl). Já os níveis de HDL e LDL são mais baixos do que os dos nossos animais, respectivamente,  $16,2 \pm 4,9$  mg/dl e  $15,3 \pm 8,3$  mg/dl nos animais da Unifesp e  $29,50 \pm 2,24$  mg/dl e  $24,75 \pm 2,13$  mg/dl nos nossos. Eles obtiveram estes resultados com ratos machos de 90 dias e os nossos resultados foram obtidos com ratos machos de 75 dias.

Comparando os nossos diferentes grupos experimentais, os resultados mostram que dos seis parâmetros avaliados, três deles foram significativamente modificados pelo diabetes (colesterol total, LDL e VLDL). O diabetes reduziu em 17,78% os níveis de colesterol total e em 53,01% os níveis de LDL e aumentou em 27,12% os níveis de VLDL. Estas variações foram revertidas pelo tratamento com insulina. O tratamento com insulina afetou os níveis de frutossamina, reduzindo-os significativamente. Os animais tratados com insulina apresentaram redução de 21,66% nos níveis de proteínas glicadas.

Não houve diferença significativa nos níveis de HDL, triglicerídeos e frutossamina entre os animais controle e diabéticos.

Sabe-se que o metabolismo das lipoproteínas no diabético é influenciado pela insuficiência de insulina, uma vez que as enzimas lipoproteinolipases são dependentes de insulina. Em humanos, os pacientes com doses inferiores à sua necessidade diária de insulina vão apresentar elevações nas frações do colesterol (LDL e VLDL). Estas elevações podem ser revertidas desde que os níveis de insulina sejam normalizados por um período de pelo menos um mês (MERRIN et al., 1994; FEILLET et al., 1998).

Castro et al. (2000), verificaram em seu trabalho aumentos significativos nos níveis de LDL, HDL e de colesterol total nos pacientes diabéticos, não havendo, porém, diferenças significativas nos níveis de VLDL e de triglicerídeos quando comparado com os de pessoas saudáveis. Também foi observado um aumento significativo nos níveis de colesterol (KHAWALI, ANDRIOLO e FERREIRA, 2003) e

de LDL (SIQUEIRA, ABDALLA e FERREIRA, 2006) em pacientes diabéticos do tipo 1 descompensados.

Dados opostos aos citados acima, foram observados por Martinez (2003). Este observou uma diminuição dos níveis de HDL e um aumento dos níveis de VLDL e triglicerídeos em pacientes diabéticos.

Lerco et al. (2003) mostraram em seus experimentos com ratos alogênicos diabéticos por aloxana, um aumento significativo nos níveis de HDL, não havendo diferença significativa no perfil de triglicerídeos e colesterol total.

Nogueira-Junior et al. (2005) mostraram em seu trabalho com ratos Wistar fêmeas diabéticos por estreptozotocina, aumentos significativos nos níveis de triglicerídeos e colesterol total, quando comparados aos ratos controle.

Babaei–Jadidi et al. (2004) utilizaram ratos Sprague – Dawley diabéticos por estreptozotocina (55mg/Kg peso do animal) e observaram aumento significativo nos níveis de colesterol total e de triglicerídeos. Além disso, os níveis de HDL diminuíram significativamente.

Zhu et al. (2005) utilizaram ratos Sprague – Dawley diabéticos por estreptozotocina e observaram que não havia diferença significativa nos níveis de LDL, HDL e triglicerídeos ao comparar com ratos controle.

Newairy et al. (2002) utilizaram ratos Sprague – Dawley diabéticos por aloxana (120 mg/Kg peso do animal) durante quatro semanas e observaram que houve aumento significativo nos níveis de colesterol total, triglicerídeos, LDL e VLDL ( $p < 0,05$ ). Apenas os níveis de HDL foram reduzidos significativamente.

Kusmanova et al. (2007) utilizaram ratos Wistar diabéticos por estreptozotocina (50 mg/Kg peso do animal) e observaram que houve aumento de triglicerídeos, colesterol total e LDL, porém este aumento só foi significativo nos níveis plasmáticos de triglicerídeos. Houve também redução de HDL, mas não significativa.

Soltani, Keshavarz e Dehpour (2007) utilizaram ratos Wistar diabéticos por estreptozotocina (40 mg/Kg peso do animal). Os animais foram divididos em dois períodos experimentais, sendo um com duração de dez dias (denominado diabetes agudo) e o outro com duração de oito semanas (denominado diabetes crônico). Não

houve diferença significativa nos níveis plasmáticos de triglicerídeos, colesterol total, HDL, LDL e VLDL entre os ratos controle e os ratos com diabetes agudo. Por outro lado, nos ratos com diabetes crônico, houve aumento significativo no perfil lipídico, quando comparado aos ratos controle e ratos com diabetes agudo.

Souza (2007) utilizou ratos Wistar diabéticos por estreptozotocina (60 mg/Kg). Observou que os níveis plasmáticos de triglicerídeos dos ratos diabéticos aumentaram significativamente ao comparar com ratos controles. Por outro lado, não houve diferença nos níveis de colesterol total.

Castro et al. (2000) e Khawali, Andriolo e Ferreira (2003) mostraram aumento significativo nos níveis de colesterol total em pacientes diabéticos e Nogueira-Junior et al. (2005), Babaei-Jadidi et al. (2004) e Newairy et al. (2002) confirmam este dado, utilizando ratos diabéticos. Por outro lado, Lerco et al. (2003), Soltani, Keshavarz e Dehpour (2007) e Souza (2007) mostraram que não havia diferença significativa, neste parâmetro, entre diabéticos e não diabéticos.

Apesar das divergências entre os trabalhos, os nossos resultados estão de acordo com Zhu et al. (2005), Kusmanova et al. (2007) e Soltani, Keshavarz e Dehpour (2007), em que não há diferença significativa nos níveis de HDL entre controles e diabéticos.

Os níveis de VLDL foram significativamente maiores nos ratos diabéticos em comparação aos animais controle. Estes dados confirmam o que foi observado em pacientes diabéticos (MARTINEZ, 2003) e em ratos Sprague-Dawley (NEWAIRY et al., 2002).

Em relação aos níveis de triglicerídeos, não há diferença estatística entre os nossos grupos experimentais, corroborando os resultados obtidos por Castro et al. (2000), Lerco et al. (2003), Zhu et al. (2005) e Soltani, Keshavarz e Dehpour (2007).

Apenas no nosso trabalho houve redução significativa dos níveis de LDL. Castro et al. (2000) e Siqueira, Abdalla e Ferreira (2006) observaram aumento em pacientes diabéticos, confirmando os dados de Newairy et al. (2002) que utilizou ratos. Enquanto Kusmanova et al. (2007) e Soltani, Keshavarz e Dehpour (2007) que utilizaram ratos Wistar, não observaram diferença significativa. Por outro lado, Merrin et al. (1994) e Feillet et al. (1998) mostraram que pacientes que controlam os níveis glicêmicos com insulina exógena normalizam os níveis de LDL. Os nossos dados

confirmam este dado, pois não há diferença significativa entre ratos controles e ratos DTI.

Os nossos dados diferem da maioria dos autores também com relação ao efeito do diabetes sobre os níveis de colesterol total, que nos nossos experimentos foram reduzidos pela doença. Por outro lado, observa-se semelhança nos níveis plasmáticos do colesterol de nossos ratos diabéticos com os ratos diabéticos de Souza (2007) (utilizamos o mesmo modelo experimental, porém ela utilizou 60mg de STZ por quilo do animal). As médias foram  $60,13 \pm 3,62$  mg/dl, enquanto Souza (2007) encontrou a média de  $60 \pm 4$  mg/dl.

Não temos clareza do porquê das divergências dos nossos resultados de colesterol total e LDL. São necessários mais experimentos para esclarecer esta questão.

Estes resultados mostram que o perfil lipídico apresentado pelos animais controle é similar ao de animais utilizados por outros grupos de pesquisa e que o tratamento com insulina foi eficaz na reversão das variações causadas pelo diabetes.

A dosagem de frutossamina no soro, juntamente com a hemoglobina glicada, é empregada para monitorar o controle de tratamento dos diabéticos. Assim, quanto maior for o nível de frutossamina, maior será o descontrole glicêmico.

Considerando que altos níveis de frutossamina são um indício de descontrole metabólico, quando comparamos os ratos diabéticos e ratos DTI, percebe-se que o tratamento com insulina teve sucesso, já que os níveis de frutossamina de ratos DTI foram reduzidos significativamente ao comparar com ratos diabéticos sem tratamento. Mas, diferente do esperado, os níveis de frutossamina foram similares entre animais controle e diabéticos. Nos parece que a melhor explicação para isto é que a duração do experimento (15 dias) não é o suficiente para determinar o aumento significativo dos níveis de proteínas glicadas nos animais diabéticos. É necessário testar esta possibilidade.

A comparação dos nossos resultados mostra que, à exceção de colesterol total e LDL, estão de acordo com os obtidos por outros grupos de pesquisa.

#### 4.5 Análise da síntese de catecolaminas: conteúdo total e expressão de tirosina hidroxilase

A análise da quantidade de catecolaminas mostrou que, em termos absolutos, as glândulas supra-renais dos animais diabéticos sem tratamento com insulina contêm menos catecolaminas (redução de 21,12%,  $p < 0,05$ ) do que as glândulas do grupo controle e que isto é revertido pelo tratamento com insulina (redução de 10,9%, não significativa) (Fig 11).

Este resultado confirma resultados prévios obtidos em nosso laboratório e mostra, pela primeira vez, que o tratamento com insulina normaliza o efeito do diabetes sobre o conteúdo total de catecolaminas, ou seja, não há diferença significativa no conteúdo total de catecolaminas entre ratos controle e ratos diabéticos que receberam tratamento com a insulina. É um indício de que, em nossas condições experimentais, o diabetes reduz a síntese de catecolaminas após 15 dias da instalação da doença. Esta redução pode ser consequência de falhas na via de síntese de catecolaminas.

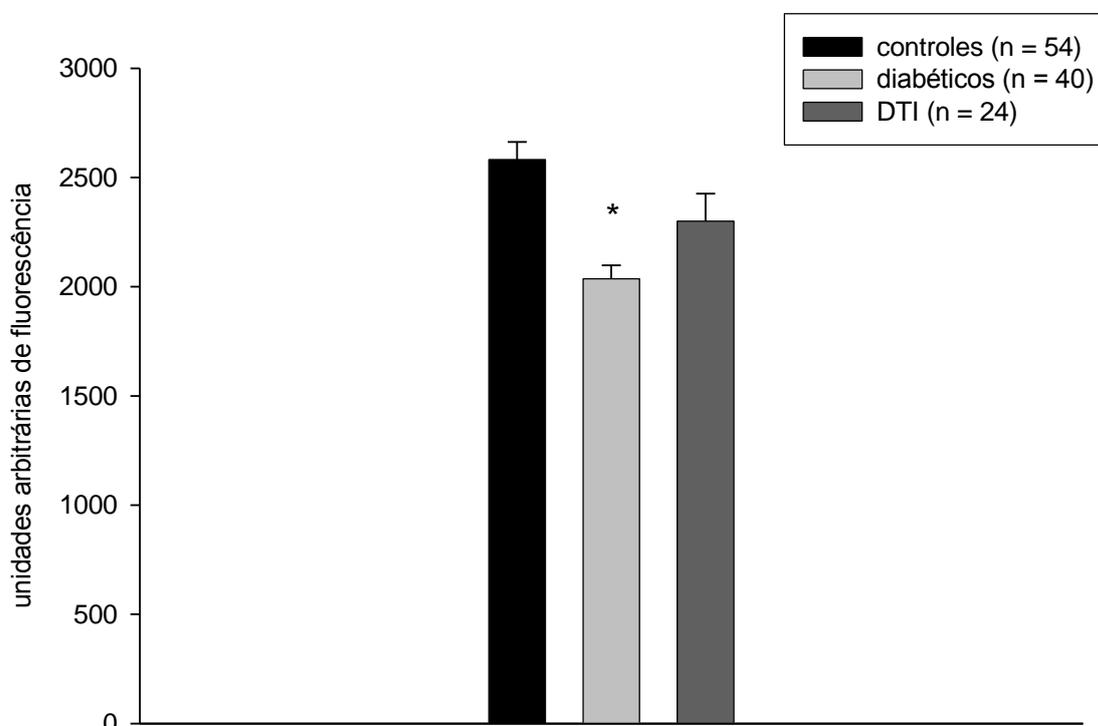


Figura 11 - Efeito do diabetes sobre o conteúdo total de catecolaminas após 15 dias da indução da doença. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$  ao comparar com os ratos controles e diabéticos que receberam tratamento com insulina (DTI).

Na tentativa de explicar o efeito do diabetes e do tratamento com insulina sobre o conteúdo de catecolaminas nas glândulas supra-renais, analisamos a expressão de tirosina hidroxilase (TH), primeira enzima da via de síntese de catecolaminas e considerada por alguns autores como a reguladora de todo o processo (MARLEY e TOMSON, 1996). Já se demonstrou anteriormente que a glicose em altas concentrações tem efeito inibidor sobre a expressão da enzima em culturas de células de medula adrenal (GARCIA, 1998). Em nosso modelo experimental, esse efeito não foi observado nos ratos diabéticos. Embora a expressão de TH tenha decaído 15,60%, esta redução não foi estatisticamente significativa (Fig. 12). Isto mostra que a redução no conteúdo de catecolaminas descrita acima não é consequência da diminuição da expressão de TH. Sugerimos, então, duas possibilidades para explicar a redução do conteúdo total de catecolaminas. Primeiro, aumento da secreção de catecolaminas, diminuindo os seus estoques. Não acreditamos que seja este o caso, já que, como discutido a seguir, tanto a secreção basal como a estimulada por altas concentrações de potássio e carbamilcolina é menor nos animais diabéticos. E isto, em condições normais, ativaria todo o processo de síntese de catecolaminas. Outra possibilidade é a modificação da atividade de TH. Tirosina hidroxilase tem vários sítios de fosforilação e a adição de grupos fosfato é determinante para a sua atividade (DUNKLEY et al., 2004). Desta forma, sugerimos que a redução do conteúdo total de catecolaminas em ratos diabéticos é causada pela diminuição da atividade de TH.

Não podemos descartar a possibilidade de alguma ação da insulina diretamente sobre as células cromafins. Há trabalhos que mostram que a insulina tem ação direta sobre as células cromafins e outros que divergem quanto a esta ação (KVETNANSKY et al., 1997; DE ARAUJO E SOUZA, GARCIA e MATHIAS, 1999). É importante repetir que já foi demonstrada a existência de receptores para a insulina nestas células (KVETNANSKY et al., 1997). Também é necessário notar que a insulina e as catecolaminas têm momentos de ação e efeitos antagônicos no metabolismo da glicose (CRYER, 2001) e, por isso, era de se esperar efeito inibitório sobre a secreção e, conseqüentemente, síntese de catecolaminas.

Os ratos diabéticos tratados com insulina, diferente dos que não foram tratados, apresentaram tendência de aumento na expressão de TH mas, também, a

diferença com a relação aos animais controle não foi significativa (+ 12,97%). Efeito similar foi observado por Inouye e colaboradores (2006).

Estes resultados demonstram que nem a redução do estoque de catecolaminas observada nos diabéticos e nem a sua recuperação pelo tratamento com insulina são reguladas pela modificação da expressão de tirosina hidroxilase.

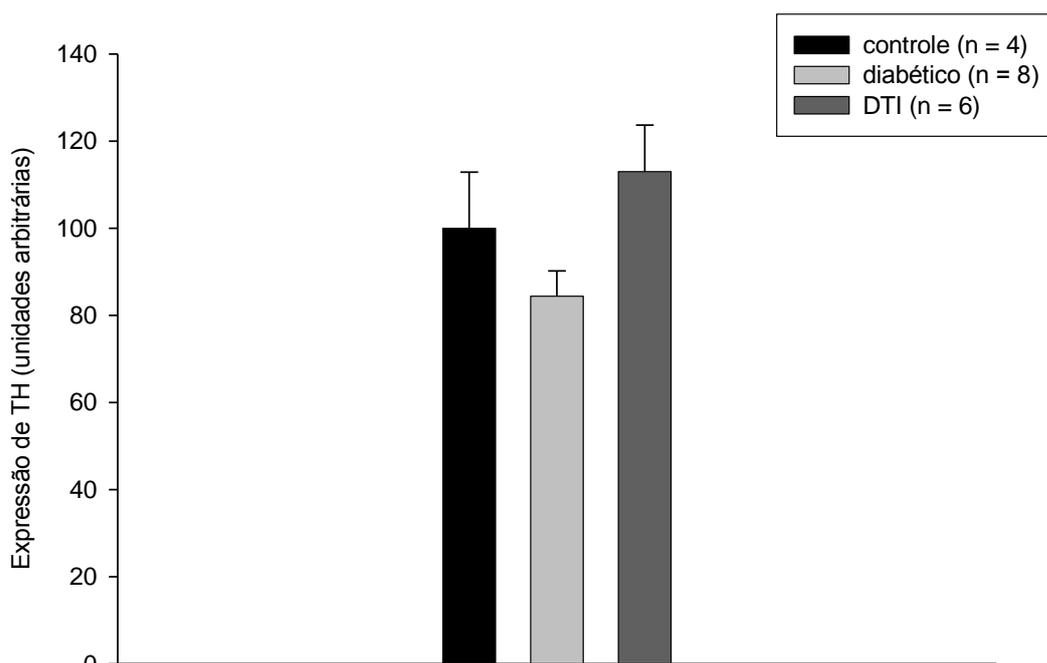


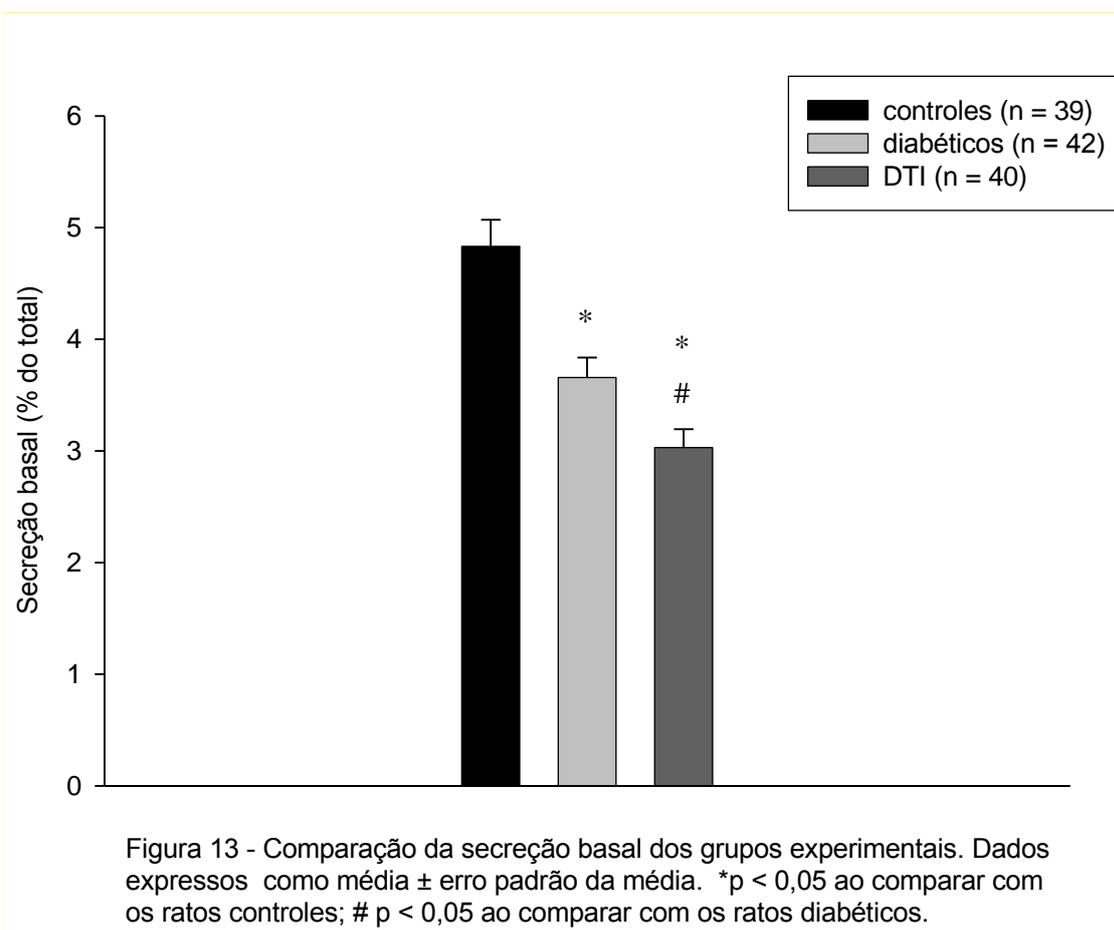
Figura 12 - Efeito do diabetes e do tratamento com insulina exógena sobre a expressão de tirosina hidroxilase (TH). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

#### 4.6 Análise da secreção de catecolaminas

A Figura 13 mostra a secreção basal de catecolaminas dos grupos experimentais após 15 dias da indução do diabetes. Os ratos diabéticos com ou sem tratamento com insulina, apresentaram redução significativa na secreção basal, que foi, respectivamente, 37,3% e 24,3% menor do que a encontrada nos animais do grupo controle. A secreção basal dos ratos DTI também foi significativamente menor do que a dos animais diabéticos sem tratamento com insulina, redução de 17,16%.

A secreção em resposta a altas concentrações de potássio foi significativamente menor tanto nos ratos diabéticos sem tratamento, como nos ratos que receberam tratamento com insulina. Após 15 dias da indução do diabetes a

secreção dos ratos diabéticos foi reduzida em 42,28% e a dos diabéticos tratados com insulina em 48,84% quando comparados ao controle (Fig. 14).



A secreção de catecolaminas estimulada por 50  $\mu$ M de carbamilcolina também foi menor nos ratos diabéticos sem e com tratamento com insulina. Após 15 dias da instalação da doença, a secreção dos ratos diabéticos e ratos DTI foi 28,9% e 36,8% menor que a dos ratos controle, respectivamente (Fig. 15).

Ao contrário dos experimentos de estimulação da secreção com potássio e carbamilcolina, a resposta à estimulação com cafeína foi similar nos três grupos experimentais (Fig. 16). Enquanto os ratos diabéticos sem tratamento secretaram 1,64% a menos que os controles, os ratos DTI secretaram 2,27% a mais que os controles.

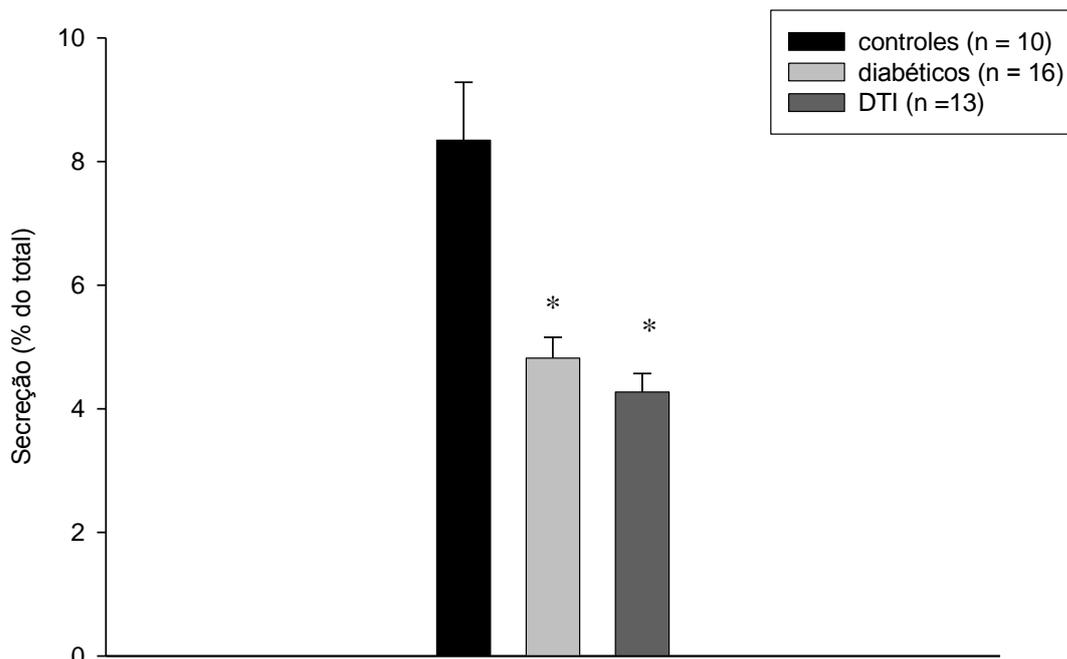


Figura 14 - Efeito do diabetes e do tratamento com insulina sobre a secreção estimulada por 30 mM de potássio após 15 dias da indução da doença. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrao da média. \*  $p < 0,05$  ao comparar com os ratos controles.

Assim, os resultados que apresentamos mostram que o diabetes, independentemente do tratamento com insulina, reduz a secreção de catecolaminas basal e a estimulada por potássio e por carbamilcolina. É importante notar que os resultados são apresentados como percentual de secreção com relação ao conteúdo total de catecolaminas das glândulas supra-renais. Isto significa que no caso dos animais diabéticos que não foram tratados com insulina, nos quais o conteúdo total foi significativamente reduzido (redução de 21,12%), a redução da secreção é ainda maior. Isto porque estes animais secretam percentualmente menos catecolaminas de um pool que já é menor.

A exceção foram os experimentos de secreção estimulada com cafeína, nos quais a resposta foi igual em todos os grupos.

Já foi mostrado que o diabetes reduz a secreção basal de catecolaminas (CHAN et al., 2001), mas é a primeira vez que é relatado o efeito do diabetes sobre a secreção de catecolaminas em resposta a estímulos diretamente sobre as células cromafins, sem a interferência de outros componentes.

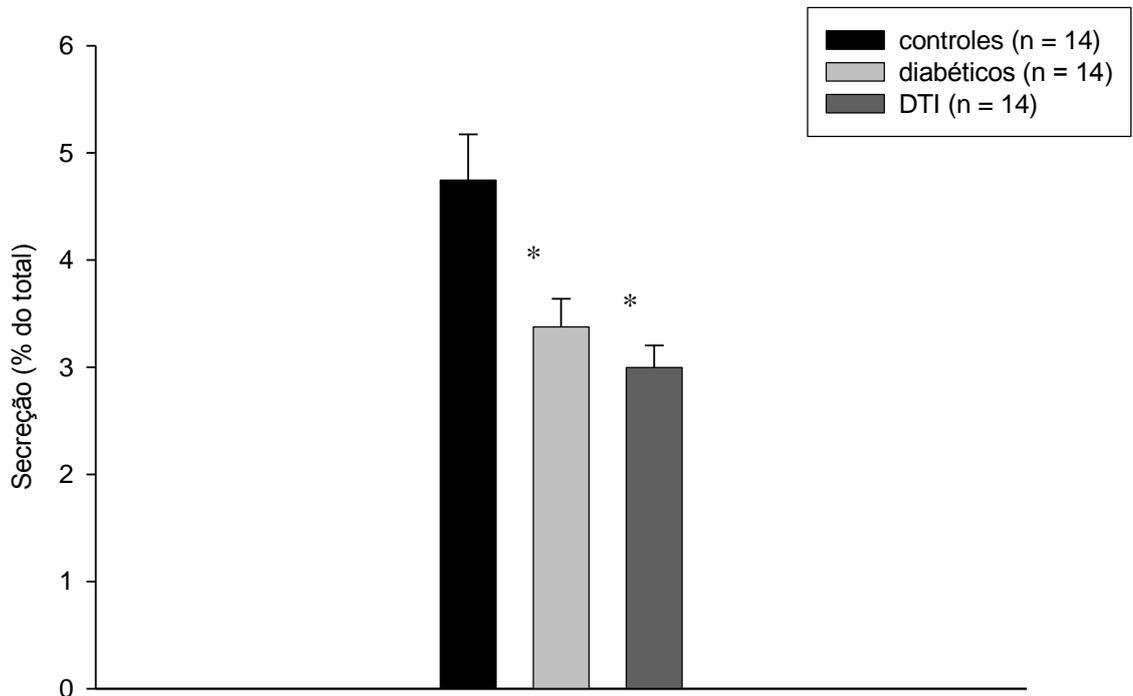


Figura 15 - Efeito do diabetes e do tratamento com insulina sobre a secreção estimulada por 50 $\mu$ M de carbamilcolina após 15 dias da indução do diabetes. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*p < 0,05 ao comparar com os ratos controles.

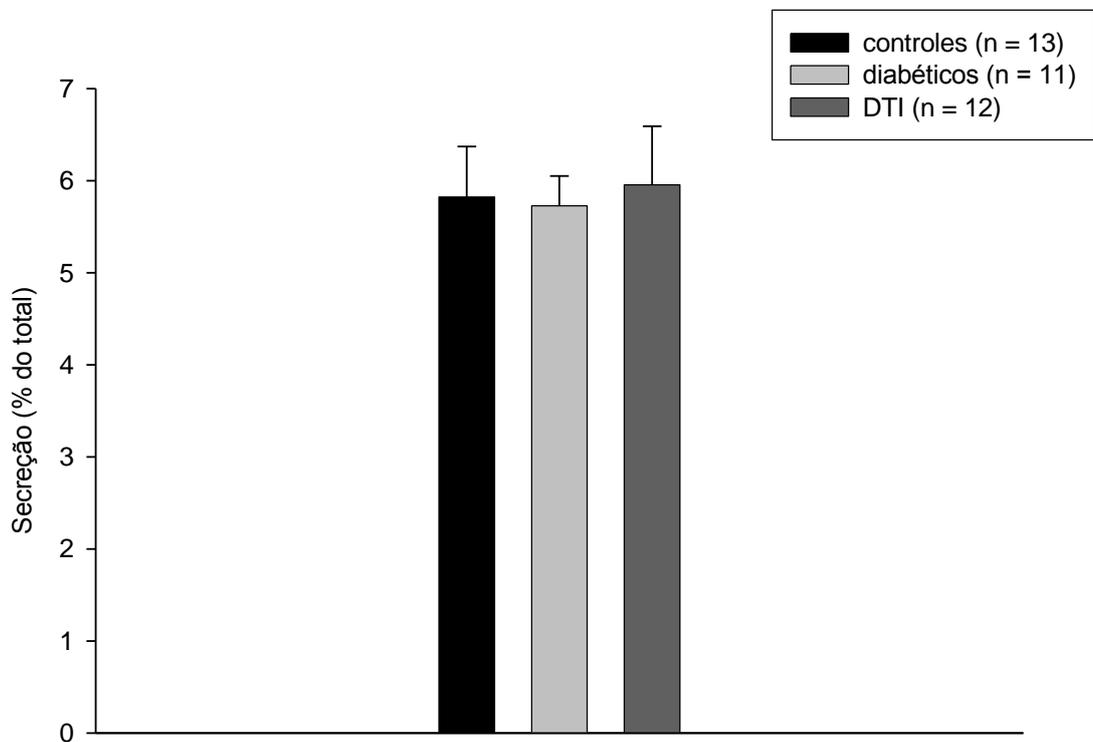


Figura 16 - Efeito do diabetes e do tratamento com insulina sobre a secreção estimulada por 25mM de cafeína após 15 dias da indução do diabetes. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrao da média.

O primeiro trabalho a demonstrar o papel chave do cálcio na secreção de catecolaminas em células cromafins foi o dos pesquisadores Douglas e Rubin (1961) em glândulas adrenais de gato estimulada por acetilcolina. A acetilcolina é o estimulador fisiológico das células cromafins e se liga a receptores nicotínicos e muscarínicos e aumenta a concentração de cálcio citoplasmático (ZAIKA et al., 2004).

As células cromafins possuem em suas membranas plasmáticas, diversos tipos e subtipos de canais de cálcio que permitem à sua entrada (ARTALEJO, 1995; GARCIA et al., 2006). A causa deste influxo de íons cálcio é, principalmente, a estimulação nicotínica que provoca a despolarização da membrana disparando um potencial de ação e posterior abertura de canais de  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem. O aumento citosólico de cálcio é um sinal para a exocitose de catecolaminas (CHEEK e BARRY, 1993; AUNIS, 1998; GARCIA et al., 2006).

Além disto, as células cromafins têm ao menos dois pools de cálcio intracelulares: um sensível ao fosfatidilinositol ( $IP_3$ ) e o outro sensível à rianodina, que se liga aos canais de cálcio do retículo sarcoplasmático da célula muscular (ENDO, 1977; CHEEK et al, 1991, STAUDERMAN, MCKINNEY e MURAWSKY, 1991).

O pool de cálcio sensível à rianodina é mobilizado por cálcio, que pode ser proveniente do meio extracelular (O'SULLIVAN et al., 1989) ou da mobilização de outro pool intracelular (STAUDERMAN, MCKINNEY e MURAWSKY, 1991). Este pool também é mobilizado por cafeína (CHEEK et al, 1991).

A cafeína induz aumento da concentração citoplasmática de cálcio, íon liberado do retículo endoplasmático (ALONSO et al, 1999; CHEEK et al, 1991).

A redução da secreção de catecolaminas nos ratos diabéticos em resposta à estimulação com potássio e carbamilcolina pode ser consequência de diversos fatores. Os nossos resultados mostram que apesar dos ratos DTI apresentarem conteúdo de catecolaminas similar ao do grupo controle, a secreção foi afetada de forma semelhante em resposta aos dois secretagogos. Assim fica claro que a redução do conteúdo total de catecolaminas não é o fator determinante para ocorrer à redução na secreção de catecolaminas. Isto também é confirmado pela redução

da secreção basal dos dois grupos de animais diabéticos. Esta redução foi bem maior do que a redução do conteúdo total de catecolaminas.

Altas concentrações de potássio induzem a secreção de catecolaminas por provocar, diretamente, a despolarização e abertura de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  da membrana plasmática e posterior influxo do íon (GARCIA et al., 1995).

A carbamilcolina é um análogo sintético da acetilcolina e age se ligando aos receptores de membrana deste neurotransmissor, que são receptores do tipo associados a canal de  $\text{Na}^+$  (ARTALEJO, 1995). A ligação de carbamilcolina provoca a abertura destes canais, posterior influxo de  $\text{Na}^+$  e conseqüente despolarização, abertura de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e entrada deste íon (ARTALEJO, 1995; GARCIA et al., 2006).

Há diversos trabalhos, em diferentes modelos animais e tipos celulares, mostrando que o diabetes afeta o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ . São reportados casos de redução e aumento da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . As causas apontadas para estes efeitos são diversas: produção de imunoglobulinas autoimunes que afetam o funcionamento de proteínas G que regulam canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , modificação dos níveis basais de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático e redução do influxo via canais do tipo L (RISTIC et al., 1998; HALL et al., 2001; ADVANI, MARSHALL e THOMAS, 2004; BRACKEN et al., 2004; ROSE, EFENDIC e RUPNIK, 2007). O fluxo de outros íons também são afetados pela doença (IMAHASHI et al., 1998; ROMANO et al., 2002).

Desta forma, considerando que os secretagogos utilizados neste trabalho têm em comum a ação despolarizante e que a redução da secreção em resposta ao potássio e ao CCh é similar, sugerimos que esta redução na secreção de catecolaminas é conseqüência de falhas nos processos elétricos associados à despolarização da membrana plasmática ou nas vias de sinalização disparadas por esta despolarização.

Os resultados obtidos nos permitem supor que o diabetes não afeta a homeostase dos pools intracelulares de cálcio mobilizados por cafeína.

É necessário, também, discutir particularmente os resultados obtidos com ratos DTI. Esperávamos que o tratamento com insulina recuperasse a capacidade secretória das células cromafins, o que não ocorreu. Isto mostra que, a despeito de restabelecer os níveis glicêmicos normais e o conteúdo de catecolaminas, o

tratamento com insulina não é suficiente para normalizar a secreção nestes animais. Isto permite algumas explicações: O diabetes provoca danos irreversíveis nas células cromafins; a estreptozotocina, droga utilizada para induzir o diabetes, provoca danos no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) ou a insulina reduz a secreção de catecolaminas.

É preciso lembrar que estes animais começam o tratamento com insulina já no segundo dia após a indução da doença. Por isso, nos parece pouco provável que a causa das falhas secretórias observadas seja consequência da instalação da doença.

Quanto à ação da insulina, como comentado acima há trabalhos que mostram seu efeito e outros o contrário (KVETNANSKY et al., 1997; DE ARAUJO E SOUZA, GARCIA e MATHIAS, 1999). De Araújo e Souza e colaboradores mostraram que a insulina não induz a secreção de catecolaminas em medula isolada de ratos Wistar normais. Kvetnansky e colaboradores, 1997, trabalhando com fatias de medula de rato mostraram que a estimulação, por 10 minutos, com baixas concentrações de insulina (0,02 a 1,0  $\mu\text{g/ml}$ ) não tinha efeito sobre a secreção de catecolaminas, enquanto que 5 e 10  $\mu\text{g/ml}$  de insulina a aumentavam significativamente. Com relação a estes resultados, são necessárias algumas considerações. A primeira, com relação às concentrações de insulina. Os próprios autores reconhecem que as concentrações com efeito estimulatório são suprafisiológicas. E, considerando que estas células possuem receptores para IGF e que a estimulação destes receptores estimula a secreção de catecolaminas, uma possibilidade de explicação para estes resultados é que o efeito insulina seja consequência da sua interação com estes receptores. Outro aspecto a ser considerado é que neste trabalho as glândulas supra-renais também foram estimuladas por 120 minutos com insulina. Nesta situação, a secreção estimulada por 5 $\mu\text{g/ml}$  foi totalmente inibida e a estimulada por 10  $\mu\text{g/ml}$  foi similar para adrenalina e reduzida para a noradrenalina (KVETNANSKY et al., 1997). Isto quer dizer que com o aumento do tempo de estimulação a insulina teve seu efeito estimulatório reduzido.

Chan et al. (2001, 2002) mostraram que o diabetes reduzia a secreção basal de adrenalina e que isto era revertido pelo tratamento com insulina. Nestes animais o tratamento foi feito com a implantação de bombas de insulina, o que permitia um controle mais refinado dos níveis glicêmicos.

Também há varias descrições do efeito da insulina sobre o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e foi demonstrado que o diabetes aumenta a sua atividade (KVETNSNSKY et al., 1997; CHAN et al., 2001, 2002, 2006; INOUE et al., 2004). Os autores sugerem que esta disfunção é a responsável pela redução na secreção de catecolaminas observada nos diabéticos; disfunção esta corrigida pelo tratamento com insulina. Mas, nos casos em que foi analisado, o tratamento com insulina restabeleceu a secreção basal de catecolaminas, mas não a resposta a situações de hipoglicemia recorrentes, ou seja, mesmo restabelecendo o funcionamento do eixo, isto não é suficiente para recuperar a resposta secretória da medula supra-renal (CHAN et al., 2002; INOUE et al., 2004). Um dos artigos mostrou que nem todos os parâmetros marcadores da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) eram corrigidos pelo tratamento com insulina (CHAN et al., 2001).

Assim, os nossos resultados sugerem que as falhas na secreção de catecolaminas causada pelo diabetes podem ser conseqüência de problemas nos processos elétricos associados à secreção e/ou no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. E a ineficácia do tratamento com insulina para reverter as disfunções observadas é conseqüência das falhas inerentes ao tratamento com injeção de insulina exógena, que provoca momentos de alta e de baixa concentração de insulina circulante e da recuperação parcial do eixo HPA. A redução do conteúdo de catecolaminas pode contribuir para o fenômeno, mas certamente não é determinante. Apesar de ser um modelo amplamente usado, e de não termos encontrado qualquer artigo que descreva algo nesse sentido, o que é reafirmado por outros autores (CHAN, 2001), não podemos descartar uma possível ação tóxica da estreptozotocina diretamente sobre o eixo HPA.

Resumindo, mostramos que o diabetes reduz o conteúdo de catecolaminas na glândula supra-renal e confirmamos que a secreção basal destes hormônios é reduzida nos indivíduos doentes. Pela primeira vez é mostrado que a resposta a secretagogos que agem via membrana plasmática também é reduzida. E, finalmente, mostramos que o tratamento com insulina não é suficiente para restabelecer a resposta secretória, o que responde a pergunta título deste trabalho e indica que o problema observado nos diabéticos pode não ser conseqüência, exclusivamente, da hiperglicemia.

## 5 Conclusões

- O tratamento com estreptozotocina foi eficiente para induzir o diabetes;
- O protocolo de tratamento com insulina é eficaz no controle glicêmico dos ratos diabéticos;
- O tratamento com insulina restabelece os níveis normais de colesterol total e frações lipoprotéicas LDL e VLDL nos animais diabéticos, corroborando a eficiência do tratamento;
- O conteúdo total de catecolaminas é reduzido pelo diabetes e é recuperado pelo tratamento com insulina;
- A secreção de catecolaminas basal e a estimulada por intermédio da membrana plasmática é reduzida pelo diabetes;
- O diabetes não afeta os “pools” intracelulares de cálcio sensíveis à cafeína;
- O tratamento com insulina não é capaz de recompor o processo secretório nestas células.

## 6 Referências Bibliográficas

ADVANI, A.; MARSHALL, S. M.; THOMAS,, T. H. 2004. Impaired neutrophil store-mediated calcium entry in Type 2 diabetes. **European Journal of Clinical Investigation**, **34**: 43–49.

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

ALANIZ, M.H.F.; TAKADA, J.; VALE, M.I.C.A.; LIMA, F.B. 2006. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, **50(2)**: 2616-229.

ALONSO, M. T.; BARRERO, M.J.; MICHELENA, P.; CARNICERO, E.; CUCHILLO, I.; GARCIA, A.G.; GARCIA-SANCHO, J.; MONTERO, M.; ALVAREZ, J. 1999. Ca<sup>2+</sup> induced Ca<sup>2+</sup> release in chromaffin cells seen from inside the ER with targeted aequorin. **Journal Cell Biology**, **144**: 241-254.

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**, 1ª edição, São Paulo, Unifesp.

ARNER, P. 1995. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. *Annals of Internal Medicine*, **27**: 435 – 438.

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

AUNIS, D. 1998. Exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. **Review Cytology**, **181**: 213-320.

BABAEI – JADIDI, R.; KARACHALIAS, N.; KUPICH, C.; AHMED, N.; THORNALLEY, P.J. 2004. High dose thiamine therapy counters dyslipidaemia in streptozotocin – induced diabetes rats. **Diabetologia**, **47**: 2235-2246.

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

BORG, M.A.; BORG, W.P.; TAMBORLANE, W.V.; BRINES, M.L.; SHULMAN, G.I.; SHERWIN, R.S. 1999. Chronic Hypoglycemia and Diabetes Impair Counterregulation Induced by localized 2-Deoxy-Glucose Perfusion of the Ventromedial Hypothalamus in Rats. **Diabetes**, **48**: 584-587.

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.

BRACKEN, N.K.; WOODALL, A.J.; HOWARTH, F.C.; SINGH, J. 2004. Voltage-dependence of contraction in streptozotocin-induced diabetic myocytes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, **261(1-2)**: 235-243.

BROWDER, L.W.; ERICKSON, C. A. and JEFFERY, W. R. Developmental Biology. 3<sup>th</sup> edição, USA, Saunders College Publishing, 1991.

BROWN, F.M.; SMITH, A.M.; LONGWAY, S.; RABINOWE, S.L. 1990. Adrenal medullitis in type 1 diabetes. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, **71**: 1491-1495.

BROWN, R.S.; WAHL, R.L. 1993. Overexpression of GLUT 1 glucose transporter in human breast cancer. An immunohistochemical study. **Cancer**, **72 (10)**: 2979 - 2985.

BURNER, A.T.; SOUTHGATE, J.; BRISON, D.R.; LEESE, H.J. 2002. regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. **Molecular Reproduction and Development**, **62 (4)**: 489 - 495.

CALLEWAERT, G.; JOHNSON, R.G.; MORAD, M. 1991. Regulation of the secretory response in bovine chromaffin cells. **American Journal Physiology Cell Physiology** **260**: 851– 860.

CARVALHEIRA, J.B.C.; ZECCHIN, H.G.; SAAD, M.J.A. 2002. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, **46 (4)**: 419 – 425.

CASTRO, J.C; GOULART, E.M.A.; CAMARGOS, A.F.; CHAGAS, A.J. 2000. Avaliação antropométrica e bioquímica de crianças e adolescentes com diabetes do tipo 1 comparados a um grupo de não diabéticos de mesmo nível sócio-econômico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, **44(6)**: 502-508.

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

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**: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**: 1382-1390.

CHEEK, T.R.; BARRY, V.A.; BERRIDGE, M.J. MISSIAEN, L. 1991. Bovine adrenal chromaffin cells contain an inositol 1,4,5-trisphosphateinsensitive but caffeine – sensitive  $Ca^{2+}$  store that can be regulated by intraluminal free  $Ca^{2+}$  . **Biochemical Journal**, **275**: 697-701.

CHEEK, T.R.; BARRY, V.A. 1993. Stimulus – secretion coupling in excitable cells: a central role for calcium. **Journal Experimental Biology**, **184**: 183-196.

CLARKE, W.L.; GONDER-FREDERICK, L.A.; RICHARDS, F.E.; CRYER, P.E. 1991. Multifactorial origin of hypoglycemic symptom unawareness in IDDM. **Diabetes**, **40**: 680-685.

COSTA, C.L.; FREITAS, M.S.; MOURA, A.S. 2004. Insulin secretion and GLUT 2 expression in undernourished neonate rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, **15 (4)**: 236-241.

CRYER, P.E. 1989. Decreased sympathochromaffin activity in IDDM. **Diabetes**, **38**: 405-409.

CRYER, P.E. 1992. Iatrogenic hypoglycemia as a cause of hypoglycemia-associated autonomic failure in IDDM: A vicious cycle. **Diabetes**, **41**: 255-260.

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

CRYER, P.E. 2001. Hypoglycemia – associated autonomic failure in diabetes. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolim**, **281**: 1115 – 1121.

CRYER, P.E.; GERICH, J.E. 1985. Glucose Counterregulation, hypoglycemia and intensive insulin therapy in Diabetes Mellitus. **New England Journal of Medicine**, **313**: 232-241.

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

DAGOGO-JACK, S.; RATTARASARN, C.; CRYER, P.E. 1994. Reversal of Hypoglycemia Unawareness, but not Defective Glucose Counterregulation, In IDDM. **Diabetes**, **43**: 1426-1434.

DAHMER, K.M.; PERLMAN, R.L. 1988. Bovine chromaffin cell have insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptors: IGF-I enhances catecholamine secretion. **Journal of Neurochemistry**, **51**: 321-323.

DANDONA, P.; ALJADA, A.; CHAUDHURI, A.; MOHANTY, P.; GARG, R. 2005. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes and inflammation. **Circulation**, **111**: 1448-1454.

DEMARIA-PESCE, V.H.; NICOLAIDIS, S. 1998. Mathematical Determination of Feeding Patterns and Its Consequence on Correlational Studies. **Physiology e Behavior**, **65(1)**: 157-170.

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.

DIB, S.A. 2006. Resistência à insulina e Síndrome Metabólica no Diabetes Melito do Tipo 1. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, **50(2)**: 250-263.

DIJIK, J.P.V.; TANSELL, A.K.; CHALLIS, J.R. 1988. Insulin – like growth factor (IGF) – II and insulin, but not IGF – I, are mitogenic for fetal rat adrenal cells in vitro. **Journal of Endocrinology**, **119(3)**: 509 – 516.

DOUGLAS, W.W.; RUBIN, R.P. 1961. The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. **Journal Physiology**, **159**: 40 -57.

DUNKLEY, P.R.; BOBROVSKAVA, L.; GRAHAM , M.E.; von NAGY-FELSOBUKI, E.I.; DICKSON, P.W. 2004. Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. **Journal of Neurochemistry**, **91**: 1025–1043.

ENDO, M. 1977. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. **Physiological Reviews**, **57**: 71-108.

FEILLET, C.; MONNIER, L.H; BARJON, J.N.; PERRIN, M.; DESECOMPS, B.; CRASTES, P.A. 1998. Evidence for a short-term stimulatory effect of insulin on cholesterol synthesis in newly insulin-treated diabetic patients. **Metabolism**, **43**: 1233-40.

FELIG, P. 1971. Pathophysiology of diabetes mellitus. **The Medical Clinics of North America**, **55(4)**: 821 – 834.

FERRANNINI, E.; NATALI, A.; BELL, P. 1997. Insulin resistance and hypersecretion in obesity. **The Journal Clinical of Investigation**, **100**: 1166 - 1173.

FRODIN, M.; GAMMELTOFT, S.1994. Insulin-like growth factors act synergistically with basic fibroblast growth factor and nerve growth factor to promote chromaffin cell proliferation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **91**: 1771- 1775.

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**: 2057-2061.

GANONG, W.F. 1989. **Fisiologia Médica** . 5º edição, São Paulo, Atheneu Editora São Paulo..

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**: 1093 - 1131.

GARCIA, R.M.G.; ATWATER, I.; MATHIAS, P.C.F. 1995. Effects of caffeine on K<sup>+</sup> and carbamylcholine-secretory response in bovine chromaffin cells. **Research Communications in Alcohol and Substances of Abuse**, **16**: 25-40.

GARCIA, R.M.G.; MATHIAS, P.C.F.; ATWATER, I.; LELKES, P.I. 1996. The inhibition of k<sup>+</sup> - secretory response by caffeine in bovine chromaffin cells is time dependent. **Research Communications in Alcohol and Substances of Abuse**, **17**: 15-21.

GARCIA, R.M.G. 1998. 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. 110p. (Tese de Doutorado em Ciências – Biologia Celular).

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

GOMES, M.B. 2006. Glitazonas e Síndrome Metabólica: Mecanismos de Ação, Fisiopatologia e Indicações Terapêuticas. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, **50 (2)**: 271-280.

GOULD, G.W.; HOLMAN, G.D. 1993. The glucose transporter family: structure, function and tissue – specific expression. **Biochemistry Journal**, **295**: 329 - 341.

GREENSPAN, F.S. e STREWLER, G.J.; Endocrinologia Básica e Clínica. 5º edição, 2000; pag 459 - 462.

GROSS, J.L.; SILVEIRO, S.P.; CAMARGO, J.L.; REICHEL, A.J.; AZEVEDO, M.J. 2002. Diabetes Mellitus: Diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, **46(1)**: 16 – 126.

GUY, D.A.; SANDOVAL, D.; RICHARDSON, M.A.; TATE, D.; DAVIS, S.N. 2005. Effects of glycemic control on target organ responses to epinephrine in type I diabetes. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, **289**: 258- 265.

GUYTON, A.C. e HALL, J. E. 2002. **Tratado de Fisiologia Médica**, 10ª edição, Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan.

HALL, K.E.; LIU, J.; SIMA, A.A.F.; WILEY, J.W. 2001. Impaired inhibitory G-protein function contributes to increased calcium currents in rat with diabetic neuropathy. **Journal of Neurophysiology**, **86**: 760-770.

HARDIN, D.S.; DOMINGUEZ, J.H.; GARVEY, W.T. 1993. Muscle Group- Specific Regulation of GLUT4 Glucose Transporters in Control, Diabetic, and Insulin- Treated Diabetic rats. **Metabolism**, **42(10)**:1310-1315.

HARKINS, A.B.; FOX, A.P. 1998. Activation of nicotinic acetylcholine receptors augments calcium channel-mediated exocytosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells. **The Journal of General Physiology**, **111**: 257-269.

HASELBACHER, G.K.; IRMINGER, J.C.; ZAPF, J.; ZIEGLER, W.H.; HUMBEL, R.E. 1986. Insulin – like growth factor II in human adrenal pheochromocytomas and Wilms tumors: Expression at the mRNA and protein level. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **84**: 1104 -1106.

HOELDTKE, R.D.; BODEN, G.; SHUMAN, C.R.; OWEN, O.E. 1982. Reduced epinephrine secretion and hypoglycemia unawareness in diabetic autonomic neuropathy. **Annals of Internal Medicine**, **96**: 459 - 462.

HOELDTKE, R.D.; BODEN, G. 1994. Epinephrine Secretion, hypoglycemia unawareness and Diabetic autonomic neuropathy. **Annals of Internal Medicine**, **120**: 512 - 517.

HOTAMISLIGIL, G.S.; SHARGILL, N.S.; SPIEGELMAN, B.M.1993. Adipose expression of tumor necrosis factor – alpha: direct role in obesity – linked insulin resistance. **Science**, **259**: 87 – 91.

IDRIS, I.; GRAY, S.; DONNELLY, R. 2001. Protein kinase C activation : isozyme – specific effects on metabolism and cardiovascular complications. **Diabetologia**, **44**: 659 – 673.

IMAHASHI, K.; HASHIMOTO, K.; YAMAGUCHI, H.; NISHIMURA, T.; KUSUOKA, H. 1998. Alteration of intracellular Na<sup>+</sup> during ischemia in diabetic rat hearts: The role of reduced activity in Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange against stunning. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, **30**: 509–517.

INOUE, K.E.; CHAN, O.; YUE, J.T.Y.; MATTHEWS, S.G.; VRANIC, M. 2004. 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** **19**:E422-E429.

INOUE, K.E.; YUE, J.T.Y.; CHAN, O.; KIM, T.; AKIRAV, E.M.; PARK, E.; RIDDELL, M.C.; BURNETT, E.; MATTHEWS, S.G.; VRANIC, M. 2006. Effects of Insulin Treatment without and with Recurrent Hypoglycemia on Hypoglycemic Counterregulation and Adrenal Catecholamine-Synthesizing Enzymes in Diabetic Rats. **Endocrinology**, **147** (4):1860 - 1870.

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**, **127**(1): 87-95.

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

KAHN, C.R. 1994. Insulin action, diabetogenesis, and the cause of type II diabetes. **Diabetes**, **43**: 1066 -1084.

KHAWALI, C.; ANDRIOLO, A.; FERREIRA, S.R.G. 2003. Benefícios da atividade física no perfil lipídico de pacientes com diabetes tipo 1. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, **47**(1):49-53.

KELNER, K.L.; LEVINE, R.A.; MORITA, K.; POLLARD, H.B. 1985. A Comparison of trihydroxyindole and HPLC/electrochemical methods for catecholamine measurement in adrenal chromaffin cells. **Neurochemistry International**, **7**: 373-376.

KLIP, A.; TSAKIRIDIS, T.; MARETTE, A.; ORTIZ, P. A. 1994. **The FASEB Journal**, **8**: 43-53.

KORYTKOWSKI, M.T.; MOKAN, M. VENEMAN, T.F.; MITRAKOU, A.; CRYER, P.E.; GERICH, J.E. 1998. Reduced beta-adrenergic sensitivity in patients with type 1 diabetes and hypoglycemia unawareness. **Diabetes Care**, **21**: 1939-1943.

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**: 118-134.

KUNJARA, S.; SOCHOR, M.; AHMED, S.; GREENBAUM, A.L.; MCLEAN, P. 1992. Phosphoribosyl pyrophosphate formation in the rat adrenal gland in relation to adrenal growth in experimental diabetes. **Diabetes**, **41**: 1429-1435.

KUSMANOVA, V. S.; KUSMANOV, K.; TANCHEVA, S.; BELCHEVA, A. 2007. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Aronia melanocarpa* fruit juice in streptozotocin induced diabetic rats. **Methods and findings in experimental and clinical pharmacology**, **29(2)**: 101 – 105.

LERCO, M.M.; SPADELLA, C.T.; MACHADO, J.L.M.; SCHELLINI, S.A.; PADOVANI, C.R. 2003. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo Clínico e laboratorial. **Acta Cirúrgica Brasileira**, **18(2)**: 132-142.

LIM, Y.S.; STALEY, M.J. 1985. Measurement of plasma fructosamine evaluated for monitoring diabetes. **Clinical Chemistry**, **31(5)**:731-3.

LYRA, R.; OLIVEIRA, M.; LINS, D.; CAVALCANTI, N. 2006. Prevenção do Diabetes Mellitus tipo 2. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, **50(2)**:239-249.

LUSTIG, R.H. 2001. The neuroendocrinology of obesity. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, **30**: 765-785.

MACHADO, U.F.; SCHAAN, B.D.; SEAPHIM, P.M. 2006. Transportadores de glucose na Síndrome Metabólica. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, **50 (2)**:177-189.

MARLEY, P.D.; THOMSON, K.A. 1996. Inhibition of nicotinic responses of bovine adrenal chromaffin cells by the protein kinase C inhibitor, Ro 31 – 8220. **British Journal of Pharmacology**, **119**: 416 – 422.

MARTINEZ, T.L.R.; Manual de condutas clínicas em Dislipidemias. 2003; 392 pag Editora Diagraphic

MARTINS, A.C.P.; de ARAUJO E SOUZA, K.L.; SHIO, M.T.; MATHIAS, P.C.F.; LELKES, P.I.; GARCIA, R.M.G. 2004. Adrenal medullary function and expression of catecholamine –synthesizing enzymes in mice with hypothalamic obesity. **Life Sciences**, **74**: 3211-3222.

MERRIN, P.K.; BAYNES, C.; HENDERSON, A.; RICHMOND, B.; ELKEKES, R. 1994. The effects of gender and type of diabetes on HDL - cholesterol. **Diabetes and Metabolism**, **20**: 320-324.

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

MÜHLHAUSER, I.; HEINEMANN, L.; FRITSCHKE, E.; von LENNEP, K.; BERGER, M. 1991. Hypoglycemic symptoms and frequency of severe hypoglycemia in patients treated with human and animal insulin preparations. **Diabetes Care**, **14**: 745-749.

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.

NEWAIRY, A.S.; MANSOUR, H.A.; YOUSEF, M. I.; SHEWEITA, S.A. 2002. Alterations of lipid profile in plasma and liver of diabetic rats: effect of hypoglycemic herbs. **Journal of environmental science and health – B**, **37(5)**: 475 – 484.

NIJIMA, 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.

NOGUERIA-JUNIOR, F.C.; COELHO, D.A.; ALMEIDA, M.M.C.; SILVA, T.C.P.; FERREIRA, E.C.S.; MACEDO, U.B.O.; NETO, F.P.F.; NETO, J.B.; ALMEIDA, M.G.; REZENDE, A.A. 2005. Efeito do tamoxifeno no perfil lipídico de ratos diabéticos por estreptozotocina. **Acta Cirúrgica Brasileira**, **20(1)**: 69-75.

NUSSEY, S. S.; WHITEHEAD, S. A. 2001. **Endocrinology: An Integrated Approach**. Bios Scientific Publishers Ltd.

O'SULLIVAN, A.J.; CHEEK, 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**: 401-411.

OHTSUBO, K.; YAKAMATSU, S.; MINOWA, M.T.; YOSHIDA, A.; TAKEUCHI, M.; MARTH, J.D. 2005. Dietary and genetic control of glucose transporter 2 glycosylation promotes secretion in suppressing diabetes. **Cell**, **123 (7)**: 1307- 1321.

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

PANKOW, J.S.; DUNCAN, B.B.; SCHMIDT, M.I.; BALLANTYNE, C.M.; COUPER, D.J.; HOOGEVEEN, R.C.; GOLDEN, S.H. 2004. Fasting plasma free fatty acids and risk of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. **Diabetes Care**, **27**: 77-82.

PAULINO, M.F.V.M.; MARINI, S.H.V.L.; JÚNIOR, G.G.; MINICUCCI, W.J.; MENDES, C.T.; MORCILLO, A.M. 2006. Crescimento e composição corporal de crianças com diabetes mellitus tipo I. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, **50(3)**: 490-498.

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

POLLARD, H.B.; ORNBERG, R.; LEVINE, M.; KELNER, K.; MORITA, K.; LEVINE, R.; FORSBERG, E.; BROCKLEHURST, K.W.; DUONG, L.; LELKES, P.I.; HELDMAN, E.; YODIM, M. 1985. Hormone secretion by exocytosis with emphasis on information from the chromaffin cell system. **Vitamins and Hormones** **42**: 109-193.

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 e Behavior**, **54(4)**: 665-670.

RISTIC, H.; SRINIVASAN, S.; HALL, K.E.; SIMA, A.A.F.; WILEY, J.W. 1998. Serum from diabetic BB/W rats enhances calcium currents in primary sensory neurons. **Journal of Neurophysiology**, **80**: 1236–1244,

ROMANO, L.; SCUTER, A.; GUGLIOTTA, T.; ROMANO, P.; DE LUCA, G.; SIDOTI, A.; AMATO, A. 2002. Sulphate influx in the erythrocytes of normotensive, diabetic and hypertensive patients. **Cell Biology International**, **26(5)**: 421–426.

ROSE, T.; EFENDIC, S.; RUPNIK, M. 2007. Ca<sup>2+</sup>-Secretion coupling is impaired in diabetic Goto Kakizaki rats. **Journal of General Physiology**, **129(6)**: 493-508.

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

ROSS, J.T.; MICMILLEN, I.C.; LOK, F.; THIEL, A.G.; OWENS, J.A.; COULTER, C.L. 2007. Intrafetal insulin-like growth factor – I infusion stimulates adrenal growth but not steroidogenesis in the sheep fetus during late gestation. **Endocrinology**, **148**: 5424-5432.

SAITO, M.; WEISS, R.M.; LATIFPOUR, J. 1999. Effects of insulin treatment on diabetes-induced alterations in endothelin receptors in rat ureter. **International Journal of Urology**, **6**: 361-368.

SCHEEPERS, A.; JOOST, H.G.; SCHURMAN, A. 2004. The glucose transporter families SGLT and GLUT : molecular basis of normal and aberrant function. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, **28**: 364-371.

SHIMOMURA, Y.; TAKAHASHI, M.; 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 e Behavior**, **47**: 731- 734.

SIQUEIRA, A.F.A.; ABDALLA, D.S.P.; FERREIRA, S.R.G. 2006. LDL: da Síndrome Metabólica à Instabilização da Placa Aterosclerótica. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, **50(2)**: 334 – 343.

SIVITZ, W.I.; WALSH, S.; MORGAN, D.; DONOHUE, P.; HAYNES, W.; LEIBEL, R.L. 1998. Plasma Leptin in Diabetic and Insulin-Treated Diabetic and Normal rats. **Metabolism**, **47(5)**: 584-591.

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.

SOUZA, C.F. 2007. Efeito do tratamento anaeróbio de saltos sobre parâmetros bioquímicos sanguíneos e funcionalidade de neutrófilos e linfócitos de ratos diabéticos. Curitiba, 105 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

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

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, 1992: 268-284.

WAKI, H.; TONTONOZ, P. 2007. Endocrine Functions of Adipose Tissue. **The Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, **2**: 31-56.

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**: 862-868.

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

WYNGAARDEN, J.B.; SMITH, L.H. 1990. **Tratado de Medicina Interna**. Editora Guanabara Koogan S.A. 18ª edição, 2141 pag.

YONO, M.; POURESMAIL, M.; TAKAHASHI, W.; FLANAGAN, J. F.; WEISS, R. M.; LATIFPOUR, J. 2005. Effect of insulin treatment on tissue size of the genitourinary tract in BB rats with spontaneously developed and streptozotocin-induced diabetes. **Naunyn-Schmiedeberg's Archive Pharmacology**, **372**: 251-255.

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**: 23 - 32.

ZHANG, Z.W.; COGGAN, J.S.; BERG, D.K. 1996. Synaptic currents generated by neuronal acetylcholine receptors sensitive to alpha – bungarotoxin. **Neuron**, **17**: 511-517.

ZHU, B.; SHEN, H.; ZHOU, J.; LIN, F.; HU, Y. 2005. Effects of simvastatin on oxidative stress in streptozotocin induced diabetic rats: a role for glomeruli protection. *Nephron Experimental Nephrology*, 101(1): 1 – 8.

ZANONE, M.M.; PEAKMAN, M.; PUREWAL, T.; WATKINS, P.J.; VERGANI, D. 1993. Autoantibodies to nervous tissue structures are associated with autonomic neuropathy in type 1 (Insulin – Dependent) Diabetes Mellitus. **Diabetologia**, **36**: 564-569.