

RICARDO KEY YAMAZAKI

**REDUÇÃO DA GLICEMIA EM RATOS DIABÉTICOS
TRATADOS COM SAIS DE VANÁDIO PEROXIDADOS**

IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS INTRACELULARES ENVOLVIDAS NO MECANISMO
DE AÇÃO EM MÚSCULO SÓLEO

CURITIBA

2004

RICARDO KEY YAMAZAKI

**REDUÇÃO DA GLICEMIA EM RATOS DIABÉTICOS
TRATADOS COM SAIS DE VANÁDIO PEROXIDADOS**

IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS INTRACELULARES ENVOLVIDAS NO MECANISMO
DE AÇÃO EM MÚSCULO SÓLEO

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (área de Concentração em fisiologia), Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes

CURITIBA

2004

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes pelo seu apoio e amizade.

Aos meus queridos amigos de laboratório Claudinha, Júlia, Everson, Ricardo, Nathália, Maurício, Rogéria, Evelise, Dalva, Maressa, Dani, Rodrigo, Fábio, Irlena, e Sandro pela ajuda nos experimentos e pelo adorável ambiente de trabalho.

Aos amigos Osvaldo Tchaikovski, Sandro Hirabara e Alessandra Folador pelos ensinamentos transmitidos no início da minha formação acadêmica.

Aos funcionários do Biotério Luizão, Cândido, Dona Teresa e Márcia pela ajuda no manuseio dos animais.

Aos técnicos do Hospital de Clínicas José e Gerson pela ajuda na revelação dos filmes.

SUMÁRIO

<u>1 INTRODUÇÃO:</u>	I
1.1 <u>DIABETES MELLITUS:</u>	1
1.1.1 <u>Classificação</u>	2
1.1.2 <u>Etiologia:</u>	3
1.1.3 <u>Terapias</u>	4
1.2 <u>INSULINA:</u>	6
1.2.1 <u>Estrutura e liberação:</u>	6
1.2.3 <u>Ação e sinalização intracelular:</u>	7
1.2.4 <u>Proteínas intracelulares:</u>	9
1.3 <u>SAIS DE VANÁDIO:</u>	12
1.3.1 <u>Histórico:</u>	12
1.3.2 <u>Propriedades químicas e bioquímicas:</u>	13
1.3.3 <u>Mecanismo de ação “insulin-like”:</u>	14
1.3.4 <u>Outros efeitos:</u>	16
1.3.5 <u>Toxicidade:</u>	16
1.3.6 <u>Aplicação clínica:</u>	18
<u>2 OBJETIVOS:</u>	19
<u>3 MATERIAL E MÉTODOS:</u>	20
3.1 <u>ANIMAIS</u>	20
3.2 <u>MATERIAL</u>	20
3.3 <u>PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS:</u>	20
<u>4 RESULTADOS:</u>	24
<u>5 DISCUSSÃO</u>	32
<u>6 CONCLUSÃO</u>	37
<u>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:</u>	38

LISTA DE ABREVIATURAS

c-Myc	<i>Cellular homologue of avian myelocytomatosis virus oncogene</i>
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
Elk-1	<i>Ets domain protein</i>
Erk	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
GLUT-4	Transportador de glicose 4
GRB2	<i>Growth factor receptor bound protein 2</i>
IR-β	Subunidade β do receptor de insulina
IRS	Substrato para receptor de insulina
Jak	<i>Janus-family tyrosine kinase</i>
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MEK	MAPK/Erk quinase
MKP	MAP kinase phosphatase
MyoD	Fator de determinação miogênica
NF-κB	<i>Fator nuclear kappa B</i>
p53	<i>Tumor suppressor protein that protects from DNA damage</i>
p90RSK	<i>90 kDa ribosomal S6 kinase</i>
PI3K	Fosfoinositídeo 3 quinase
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato
PKB ou Akt	Proteína quinase B
PKC	Proteína quinase C
POV	Peróxido de Ortovanadato de Sódio
PSV	Peróxido de Sulfato de Vanadil
PPARγ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
SAPK	Proteína quinase ativada por Stress
Sos	<i>Son of sevenless guanine nucleotide exchange factor</i>
STZ	Estreptozotocina
TNF	Fator de necrose tumoral

RESUMO

A insulina é um hormônio que apresenta ação anabólica em diferentes tipos celulares. Deficiência na secreção e/ou na ação deste hormônio resulta na diabetes mellitus, doença que acomete milhões de pessoas no mundo. A busca por novas drogas que atuam na melhoria do estado diabético tem sido foco de intensos estudos, objetivando melhorar a qualidade de vida dos indivíduos diabéticos. Este trabalho investigou a ação de dois compostos de vanádio (sulfato de vanadil e ortovanadato, ambos peroxidados), sobre a glicemia e sua sinalização no músculo sóleo de ratos diabetizados com estreptozotocina (45 mg/kg). A administração do sulfato de vanadil e ortovanadato peroxidados (0,25 mM) na água de beber pelo período de uma semana, promoveu redução do consumo de água e ração, bem como redução significativa da glicemia quando comparados ao grupo diabético sem tratamento (D). A expressão das proteínas IR- β e Akt não foi diferente entre os grupos. A ERK-1 apresentou grau de fosforilação significativo maior no grupo controle estimulado com insulina (C+I). Por outro lado, em todos os grupos diabéticos sua fosforilação estava reduzida, exceto naquele tratado com POV e estimulado com insulina, cujo grau de fosforilação da ERK-1 foi similar à do grupo C+I. O grupo Diabético tratado com sulfato de vanadil peroxidado apresentou níveis de fosforilação da ERK-2 similares à do grupo Diabético estimulado com Insulina (D+I). Ambos os grupos tratados com POV ou PSV e estimulados com Insulina apresentaram aumento significativo no grau de fosforilação de, aproximadamente, 25 % quando comparados ao grupo D+I. Nossos dados mostram que a administração dos compostos de vanádio peroxidados reduzem a glicemia em aproximadamente 30% e a sinalização intracelular em músculo sóleo pelo qual o vanádio promove este fenômeno é executado através de algumas proteínas da via de sinalização da insulina.

ABSTRACT

Insulin is a hormone with anabolic effects on several cellular types. Deficiency on secretion and/or on mechanism of its action results in diabetes mellitus, a disease that threatens millions of people's health world around. Recently, new drugs which has some action on diabetic state has been focus of several studies, always aiming a better quality of life. This study investigated the effect of two vanadium compounds (peroxides of vanadyl sulphate and sodium orthovanadate) on glycemia and soleus muscle signaling mechanism in streptozotocin (STZ) diabetic rats (45 mg/kg). Oral administration of peroxides of vanadyl sulphate and sodium orthovanadate (0.25 mM) for one week treatment was able to decrease food intake and water consumption when compared to diabetic group (D). Treatment also caused a significant reduction on glycemia when compared to Diabetic group. IR- β and Akt expression did not show any significant difference between the groups. ERK-1 phosphorylation was significant higher in the control plus insulin group (C+I). ERK-1 phosphorylation, in turn, was reduced in all diabetic groups, except in the one treated with POV plus insulin, which presented ERK-1 phosphorylation similar to C+I group. Diabetic rats treated with vanadyl sulphate have ERK-2 phosphorylation similar to Diabetic group plus Insulin (D+I). Both groups treated with POV or PSV and stimulated with Insulin have an increased by 25% when compared with D+I. Our results show that administration of vanadium peroxides were able to reduce glycemia around 30%. Also, intracellular signalling which vanadium exerts its effects is through some proteins of insulin pathway.

1 INTRODUÇÃO:

A insulina é um hormônio capaz de induzir respostas anabólicas no fígado, tecido muscular e tecido adiposo, sendo importante para a homeostase de lipídios e carboidratos e, conseqüentemente, para o funcionamento do organismo. Além disso, a insulina regula vários processos fisiológicos em diferentes tipos celulares e tecidos como fluxo de íons, captação de aminoácidos, expressão gênica, proliferação celular, apoptose, rearranjo do citoesqueleto e regulação de enzimas celulares (MAASSEN; OWENS, 1997; MYERS; WHITE, 1996).

Deficiência na secreção e/ou na ação da insulina resulta, na doença Diabetes mellitus que é caracterizada, principalmente, pela presença de hiperglicemia. O Diabetes mellitus do tipo II (não dependente de insulina) é o mais comum e pode causar sérias complicações crônicas no sistema circulatório, excretório e nervoso (GROSS *et al.*, 2002).

Os compostos de vanádio fazem parte de um conjunto de novas drogas que possuem grande potencial para o tratamento da diabetes (MOLLER, 2001; BAILEY, 2000; EMILIEN *et al.*, 1999).

1.1 Diabetes mellitus:

Atualmente considerada a doença do século XXI, a diabetes é a 4ª causa principal de mortes nos países desenvolvidos e é considerada epidemia global que acomete 140 milhões de pessoas no mundo, sendo 50% desse total ainda não diagnosticado. Estimativas indicam que este número chegará a 300 milhões nos próximos 25 anos (World Health Organization e International Diabetes Federation). Este aumento está associado com alterações no estilo de vida de modo geral, marcado principalmente pelo sedentarismo e obesidade (ZIMMET *et al.*, 2001). A palavra “*diabetes*” vem do grego diabeneim e significa “fluir através”, enquanto o termo “*mellitus*”, do latim, significa “doce”. Existem relatos da diabetes

mellitus há mais de 2000 anos atrás descrevendo sintomas detalhados desta doença (KAHN, 1994).

1.1.1 Classificação

A diabetes mellitus pode ser classificado, atualmente, em: I - Diabetes tipo I; II - Diabetes tipo II; III - Outros tipos específicos; IV - Diabetes gestacional.

- Diabetes tipo I:

Inicialmente também conhecida como diabetes “juvenil”, a diabetes tipo I ocorre devido a destruição das células β 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 (anti-descarboxilase do ácido glutâmico, anti-ilhotas 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 na diabetes tipo I, resulta em manifestações clínicas evidentes, possibilitando rápido diagnóstico quando comparada com a diabetes tipo II (GROSS *et al.*, 2002).

- Diabetes tipo II:

A diabetes tipo II é a mais comum, correspondendo a 90% dos casos. Este tipo ocorre devido a distúrbios na ação e secreção da insulina. Anteriormente conhecida como diabetes da maturidade, por ser muito freqüente em indivíduos acima de 40 anos, hoje esta denominação caiu em desuso, devido a alta incidência de diabetes tipo II em indivíduos jovens. O diabetes tipo II é uma doença multifatorial, sendo resultado de uma combinação de genes (“diabetogenes”) e de fatores ambientais (KAHN, C. R. *et al.*, 1994). Devido a quantidades significativas de insulina residual, hiperglicemia e a cetoacidose no organismo não sejam tão acentuadas nos indivíduos

diabéticos do tipo II, torna difícil o diagnóstico precoce da doença. Por esta razão, a diabetes tipo II causa complicações crônicas a nível microvascular (retinopatias, nefropatias) e macrovascular (doenças coronárias, doenças vasculares periféricas). Neuropatias também ocorrem comumente, afetando nervos motores, sensoriais e autonômicos (SIMA; SOGIMOTO, 1999).

- Outros tipos específicos:

Ocorrem devido a: defeitos genéticos da função da célula β ; defeitos genéticos na ação da insulina; doença do pâncreas exócrino; endócrinopatias; indução por drogas ou produtos químicos; infecções; e formas incomuns de diabetes imuno-mediado (GROSS *et al.*, 2002).

- Diabetes gestacional:

Na diabetes gestacional ocorre tolerância diminuída aos carboidratos, podendo esta tolerância persistir, ou não, após o parto (GROSS *et al.*, 2002).

1.1.2 Etiologia:

O desenvolvimento da diabetes não dependente de insulina resulta da combinação de dois fatores principais. O fator genético, que provavelmente envolva genes defeituosos relacionados com a sinalização da insulina e fator ambiental relacionado ao sedentarismo, tipo de dieta, uso de drogas e outros (WHITE, 1997).

A hiperglicemia em indivíduos diabéticos é explicada pelo aumento na produção de glicose pelo fígado, secreção desregulada de insulina e redução da captação de glicose pelos tecidos-alvo da insulina (KRUSZYNSKA; OLEFSKY, 1996).

Por ser doença de origem multifatorial, a etiologia do diabetes tipo II ainda é foco de intenso estudo. Alterações na expressão de vários genes como IRS-1, glicogênio sintase, UCP-3, GLUT-4, hexoquinase II, PI-3K, MAPK, serina-treonina kinase e muitos outros,

foram constatados em indivíduos com diabetes tipo II (SREEKUMAR *et al.*, 2002; KHAN *et al.*, 1994; RONDINONE *et al.*, 1997; KROOK *et al.*, 2000). No entanto, nenhum surgiu como principal causador da doença, mais uma vez sugerindo o envolvimento de vários fatores genéticos associados com fatores ambientais que resultam na diabetes.

Randle estabeleceu a relação entre os ácidos graxos e o metabolismo da glicose, demonstrando que a oxidação dos ácidos graxos possui efeito inibitório sobre a atividade das seguintes enzimas: fosfofrutoquinase, hexoquinase e complexo piruvato desidrogenase, resultando em diminuição da oxidação da glicose (RANDLE, 1994). Portanto, a relação entre níveis de glicose e lipídios, conhecida como Ciclo de Randle, é outro fator que contribui para a condição resistência periférica à insulina (BERGMAN; ADER, 2000).

Além das proteínas intracelulares envolvidas com a sinalização da insulina, estudos recentes têm associado a causa da resistência à insulina com alterações na expressão de algumas moléculas como TNF- α , PPAR- γ e metabolismo de ácidos graxos livres (ROITH, ZICK, 2001)

1.1.3 Terapias

Dieta e exercício físico são hábeis em melhorar a glicemia de indivíduos diabéticos, sem, no entanto, restaurar completamente a ação da insulina (ALZAID, 1996). Diferentes fármacos são utilizados na clínica até o momento:

- Sulfonilúreas: atuam nas células β pancreáticas, aumentando a secreção de insulina. Alvo molecular: receptor sulfonilúrea - canal de K^+ ATP-dependente.
- Tiazolidinedionas (TZDs): aumentam a sensibilidade dos tecidos à insulina. Alvo molecular: PPAR γ .
- Metaformina – biguanidas: atuam no fígado e músculo, inibindo a liberação de glicose hepática e aumentando a sensibilidade periférica à insulina. Alvo molecular: desconhecido.

- Inibidores de α -glicosidase (Acarbose): atuam no intestino, reduzindo a taxa de absorção de carboidratos. Alvo molecular: α -glicosidase.

(MOLLER, 2001; BAILEY, 2000; EMILIEN *et al.*, 1999)

Embora uma certa quantidade de drogas com potencial anti-diabético esteja sendo extensamente utilizadas, existem algumas limitações encontradas nas terapias atuais como: (i) muitos pacientes diabéticos tipo II não apresentam controle da glicemia com o uso dos agentes citados acima; (ii) os agentes não reestabelecem o estado normal da sensibilidade à insulina ou o funcionamento das células β ; (iii) o uso intenso da insulina pode aumentar a adiposidade e agravar a resistência à insulina (BAILEY, 2000).

O exercício físico aumenta a captação de glicose via translocação de GLUT-4 através da contração muscular, inclusive em indivíduos diabéticos. Entretanto, existem evidências recentes que sugerem diferentes vias de sinalização entre a contração muscular e insulina. O mecanismo de sinalização via contração muscular, provavelmente está envolvido com a liberação de cálcio, que por sua vez, estaria ativando a PKC, ou liberando fatores de crescimento, ou ainda, ativando MAPKs, JNKs e p38 (HAYASHI *et al.*, 1997; WOJTASZEWSKI *et al.*, 1999).

1.1.4 Patologia:

A hiperglicemia, característica principal de todos os tipos de diabetes, é responsável por várias alterações metabólicas que resultam em diversas complicações vasculares como cegueira, insuficiência renal e neuropatias (BROWNLEE, 2001).

Juntamente com a glicemia, a dislipidemia, hipertensão e aumento de espécies reativas de oxigênio são alguns dos fatores que alteram a função endotelial e aumentam a liberação de citocinas pró-inflamatórias (PLUTZKY *et al.*, 2002). Estas condições propiciam o aparecimento de doenças como trombose, responsável por 80% das mortes de

indivíduos com diabetes mellitus, sendo 75% deste número devido a problemas cardiovasculares (CARR, 2001).

A diabetes também é conhecida por apresentar estado catabólico, resultado de alterações na expressão de genes responsáveis pela síntese e degradação protéica (LECKER *et al.*, 2004).

1.2 Insulina:

1.2.1 Estrutura e liberação:

A insulina é uma proteína composta por duas cadeias peptídicas (cadeias A e B) que estão ligadas entre si por duas pontes dissulfeto. A liberação da insulina é regulada, primeiramente, pela entrada de glicose nas células β via transportador de glicose (GLUT-2) (BELL *et al.*, 1990). O metabolismo da glicose dentro das células libera fatores de acoplagem como o ATP, que inibem o efluxo de potássio das células β , via canais de K sensíveis ao ATP (BOSCHERO *et al.*, 1988; HENQUIN; MEISSNER, 1984). Como resultado, ocorre a despolarização da célula possibilitando a entrada de íons cálcio, via ativação de canais de cálcio, provocando a exocitose dos grânulos de insulina (POULI *et al.*, 1998). Atualmente sabe-se que este processo é um pouco mais complexo, mediado tanto por fatores humorais quanto neurais. A glicose pode estar atuando para a liberação de insulina via (1) receptor putativo, análogo ao que liga a hormônios e neurotransmissores, ou (2) por um efeito mediado pelos produtos do metabolismo da glicose (RUTTER, 2001). Dentre outros mediadores independentes do canal K_{ATP} estão as proteínas quinases A e C (AIZAWA *et al.*, 1998), AMPc fosfodiesterases (PDE), 5 – AMP – activated protein kinase (HARDIE *et al.*, 1998; da SILVAXAVIER *et al.*, 2000) e proteínas quinases estimuladas pela insulina, como proteína kinase B (PKB) ou p70 S6 kinase (RUTTER, 2001; LEIBIGER *et al.*, 2001; KHAN *et al.*, 2001).

1.2.2 Terapia:

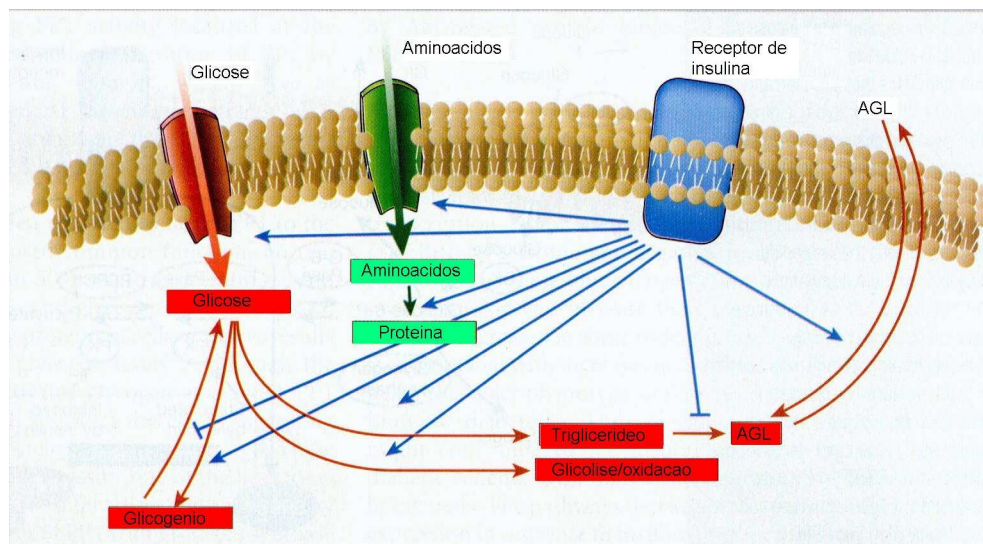
Descoberta em 1921, a insulina é utilizada na terapia de casos como diabetes, câncer, queimaduras e injúrias severas (MARTINEZ-RIQUELME; ALLISON, 2003). Apresenta ação no fígado, músculo e tecido adiposo via ativação do receptor de insulina. Utilizada para todos os casos de diabetes tipo I e, em alguns casos (30%), em indivíduos com diabetes tipo II.

A biotecnologia possibilitou avanços significativos na terapia com insulina. O primeiro análogo da insulina sintetizada por engenharia genética, a insulina *lispro*, foi aprovada e utilizada na clínica no ano de 1996 nos Estados Unidos e na Europa. Comparativamente com a insulina regular, a *lispro* apresenta algumas vantagens como: (i) ação mais rápida (~15 minutos após a administração); (ii) pico de concentração de insulina menor; (iii) menores reações alérgicas. Outros avanços enfocam no modo de administração da insulina, visando liberação de insulina similar ao do pâncreas de uma pessoa normal (EMILIEN, 1999).

1.2.3 Ação e sinalização intracelular:

O hormônio insulina promove a síntese e armazenamento de carboidratos, lipídios e proteínas além de inibir a quebra e liberação dos mesmos para a corrente sanguínea (figura 1) (SALTIEL; KAHN, 2001).

Figura 1: Esquema dos efeitos gerais da insulina (SALTIEL; KAHN, 2001)

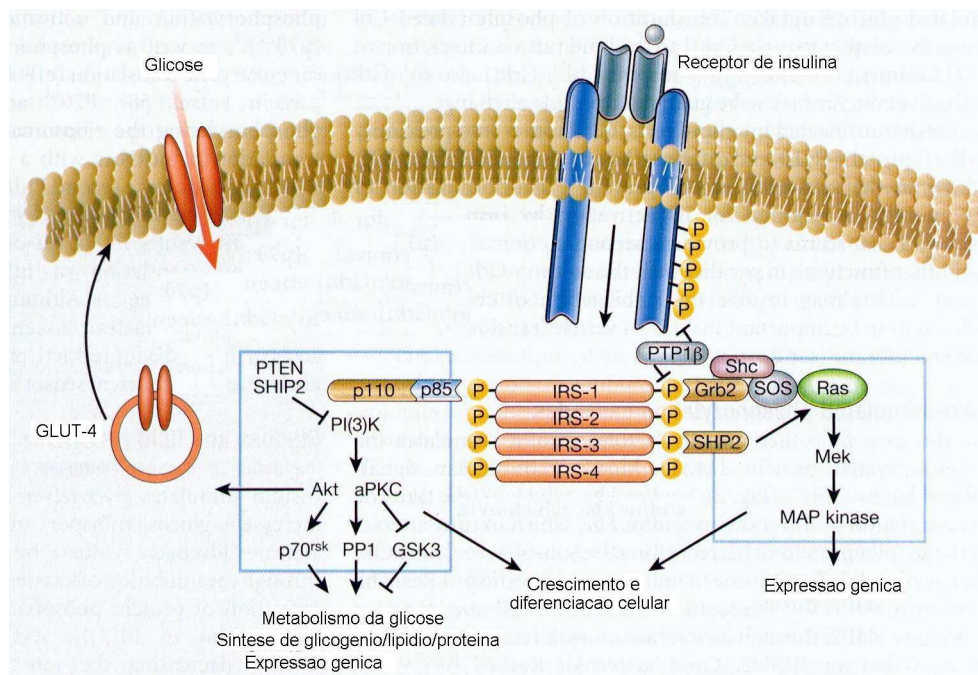


O receptor da insulina faz parte da classe de receptores que estimulam atividade da proteína tirosina quinase, a qual provoca todo o processo de cascata de fosforilação. O receptor é composto por duas subunidades α (localizadas na porção extracelular e responsáveis pela ligação da insulina ao receptor) e duas β (encontradas na porção intracelular e responsáveis pela atividade tirosina quinase).

Mecanismo de sinalização da insulina esquematizado na figura 2: (1) o processo é iniciado com a ligação da insulina às subunidades α do receptor que estão localizadas inteiramente no exterior da célula; (2) auto fosforilação cruzada em três principais sítios de tirosina quinase (posições 1146, 1150 e 1151), localizados nas subunidades β do receptor, que alteram a conformação possibilitando acesso ao ATP e substratos (WHITE, 1997); (3) os substratos para receptor de insulina (IRS-1, -2, -3 e -4) fazem parte de uma família de proteínas que atuam como mediadores entre receptor e moléculas sinalizadoras, funcionando como plataforma fornecedora de grupamentos fosfato; (4) fosforilação de várias outras proteínas como a fosfatidilinositol-3-kinase (PI-3k), a fosfotirosina fosfatase (PTP1D ou Syp) e a proteína adaptadora Grb2 (MAASSEN; OWENS, 1997). A via de transdução do sinal é específica devido a domínios específicos como SH2 (Src homology

region 2) e PTB (phosphotyrosine binding) que reconhecem resíduos específicos de tirosina fosforilados (BASS *et al.*, 1995).

Figura 2: Esquema da cascata de sinalização da insulina (SALTIEL; KAHN, 2001)



1.2.4 Proteínas intracelulares:

As proteínas da família IRS são fundamentais no mecanismo de sinalização da insulina. Estas proteínas possuem algumas características em comum, como domínios PH (pleckstrin homology) e PTB (phosphotyrosine binding) que são responsáveis pela interação com o receptor da insulina e sequência YXXM, conhecida pela ligação aos domínios SH2 (Src homology region 2) na subunidade regulatória p-85 da PI3K. Embora apresentem tais semelhanças, as proteínas IRS apresentam diferenças entre si, indicando que suas funções não são exatamente as mesmas (NYSTROM; QUON, 1999). O IRS-1, substrato encontrado em maior quantidade para o receptor de insulina, é uma proteína que possui pelo menos 22

sítios tirosina e dois domínios envolvidos com a interação proteína-proteína. Estes sítios de fosforilação de tirosina direcionam a ligação de diversas proteínas que possuem domínio SH2, incluindo a subunidade regulatória de 85 kDa da PI-3K, a PTP1D (ou Syp), a proteína adaptadora Grb2 e outras (MASSEN; OWENS, 1997). A proteína IRS-2 tem sido apontada como principal responsável pela ativação da PI-3K em indivíduos com diabetes não dependente de insulina, visto que a IRS-1 apresenta expressão reduzida nestes casos (RONDINONE, 1997). Outros estudos relacionam o papel da IRS-2 com a mitogênese e crescimento das células β pancreáticas, ou liberação de insulina pelas mesmas (GOGG *et al.*, 2001).

As fosfatases formam uma ampla família de enzimas, cujas funções encontram-se associadas na modulação da sinalização intracelular, uma vez que elas desfosforilam receptores e proteínas quinases. As fosfatases podem ser classificadas em duas principais famílias, as proteínas Ser/Thr fosfatases e proteínas tirosina fosfatases, ambas possuem estratégias diferentes para desfosforilar uma proteína (ZHANG *et al.*, 2002). A ampla diversidade das PTPs sugerem que cada tipo é responsável por um mecanismo específico na sinalização. Ao contrário dos RTKs (Receptor Tirosina Kinase) que exigem a dimerização do receptor para serem ativados, a dimerização dos domínios PTPs inibe a atividade catalítica em alguns casos. Algumas PTPs como LAR e PTP1B possuem ação promissora no tratamento do diabetes, por apresentarem capacidade de desfosforilar o receptor da insulina (NYSTROM; QUON, 1999; CHENG *et al.*, 2002).

A atividade da PI-3K (fosfatidilinositol -3 kinase) está relacionada principalmente com o transporte de glicose (RONDINOME *et al.*, 1997) e com a síntese de glicogênio, não interferindo com a ação da insulina na formação da RasGTP (MAASSEN; OWENS, 1997). Composta por uma subunidade regulatória (85 kDa) e uma catalítica (110 kDa), esta proteína fosforila a posição 3 do anel inositol em inositóis fosfolípidos, resultando em aumento nas concentrações de fosfatidilinositol 3, 4, 5- trifosfato (PtdIns (3,4,5)P₃), que regulam a atividade da proteína kinase B (PKB ou Akt) (ALESSI; DOWNES, 1998).

A Akt é uma proteína multimérica presente em vários tipos celulares, que possui capacidade de se associar com várias proteínas, resultando em diferentes respostas biológicas. Estudos recentes têm demonstrado ação da Akt na translocação de GLUT-4, síntese de glicogênio, glicólise, síntese protéica e apoptose (COFFER *et al.*, 1996).

O transportador de glicose GLUT-4 (Glucose Transporter-4) é o principal responsável pela entrada da glicose nas células do tecido muscular e adiposo. Localizado em vesículas intracelulares, seu transporte para a membrana da célula é ativado pela cascata de sinalização celular descrito acima. A expressão reduzida da proteína GLUT-4, está intimamente envolvida com resistência à insulina em indivíduos diabéticos do tipo II (ALZAID, 1996). A insulina possui a capacidade de restaurar a expressão de GLUT-4, mas não a longo prazo. GLUT-4 pode ser expresso em maior quantidade através do exercício, um mecanismo diferente daquele induzido pela insulina. A atividade contrátil do músculo e, conseqüentemente, a necessidade de entrada de glicose para o tecido, é mediada pelo GLUT-4 (STEPHENS; PILCH, 1995).

As MAP kinases ou ERKs (Extracellular signal-regulated kinases) estão relacionadas com regulação de diversas proteínas como, por exemplo, fatores transcricionais (c-Jun, SAP-1, Elk-1, c-Myc), proteínas quinases, proteínas do citoesqueleto (microtubule-associated proteins, tau) e fosfolipase A₂ citosólica (HEI *et al.*, 1995; DENHARDT, 1996). Embora o papel biológico das ERKs não seja totalmente conhecido, em mioblastos, foi verificado ação das ERK 1/2 associada à miogênese e diferenciação miogênica (SARBASSOV; PETERSON, 1998)

1.3 Sais de vanádio:

1.3.1 Histórico:

O vanádio, elemento que possui número atômico 23 e peso atômico 50,9415, é encontrado em baixas concentrações na crosta terrestre, sendo obtido comercialmente como produto através dos processos de mineração de outros metais. O nome “vanadium” foi uma homenagem à deusa Vanadis, da mitologia grega, devido às várias cores formadas pelo metal em soluções (MORINVILLE *et al.*, 1998). O vanádio é encontrado como elemento ultratraço, em concentrações fisiológicas de 10^{-10} a 10^{-9} M, amplamente distribuído em tecidos de mamíferos e outros animais (SHAVER *et al.*, 1995). Sua ação no organismo provavelmente está relacionada com o crescimento e o desenvolvimento do organismo (HAMEL; DUCKWORTH, 1995). Pimenta-do-reino, endro, salsa, cogumelos, espinafre, ostras, mexilhões, cereais, peixe e vinho são fontes de vanádio encontrados na dieta (O’CONNELL, 2001).

No final dos anos 70, sabia-se que os compostos de vanádio eram potentes inibidores da Na/K ATPase a concentrações próximas de mM, sendo, portanto, importantes para o estudo da atividade de diversas enzimas e funções celulares (DUBYAK; KELINZELLER, 1980). Na década de 80 e 90, o interesse nos compostos de vanádio aumentou, principalmente, devido a sua ação insulino-mimética, em concentrações mais altas de μ M e mM. Seus efeitos conseguem normalizar a concentração de glicose sanguínea, restaurar a função cardíaca e aumentar a lipogênese (HAMEL; DUCKWORTH, 1995). Interessantemente, antes mesmo da descoberta da insulina e de seu uso clínico por Banting e Macleod (1921), em 1899 já haviam estudos que mostravam a melhora da diabetes mellitus em humanos após administração oral do vanadato de sódio (SAKURAI *et al.*, 2002). Em 1979, foi demonstrado que os compostos de vanádio aumentavam o transporte e a oxidação de glicose, bem como estimulavam a síntese de glicogênio em fígado e diafragma *in vitro*

(TOLMAN *et al.*, 1979). Em 1985, Heyliger *et al.* verificaram redução da glicemia em ratos diabéticos tratados com vanadato (HEYLIGER *et al.*, 1985). Em tecido adiposo, foi encontrado que o vanadato ativa lipogênese, inibe a lipólise e aumenta a liberação da lipoproteína lipase (UEKI; SERA; TANAKA, 1989). CAM *et al.* (2000) resumem vários estudos sobre o efeito do vanádio em modelos de animais com diabetes tipo I e II, demonstrando aumento do transporte de glicose e síntese de glicogênio em músculo e redução da lipólise e aumento da lipogênese em tecido adiposo. Foi demonstrado que os efeitos semelhantes aos da insulina são potencializados ao se adicionar o peróxido de hidrogênio aos compostos de vanádio (KADOTA *et al.*, 1987; TSIANI; FANTUS, 1997; FOOT *et al.*, 1992).

CLARK *et al.* (1985) demonstraram que o vanádio altera o metabolismo de glicose de modo semelhante ao da insulina em músculo. O vanádio aumenta a entrada de glicose, síntese de glicogênio e glicólise em amplitude menor que à da insulina, mas sua ação é maior ao produzir lactato e oxidar glicose. Ao contrário da insulina, não houve modificação na síntese ou degradação protéica pelo vanadato (CLARK *et al.*, 1985).

SAKURAI *et al.* (2002) verificaram, *in vitro*, atividade do íon vanadil em aumentar a captação de glicose e suprimir a liberação de ácidos graxos livres em adipócitos. *In vivo*, foi realizada administração oral dos complexos VO(O₄) e VO(S₂N₂) e observado retorno da glicemia aos níveis normais em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (SAKURAI *et al.*, 2002).

1.3.2 Propriedades químicas e bioquímicas:

O vanádio é um elemento com alto potencial redox, característica esta que permite a formação tanto de complexos aniônicos quanto catiônicos, dependendo da variação do pH. Os estados de oxidação encontrados *in vivo*, V(+4) e V(+5), co-existem em equilíbrio e são reguladas pela tensão do oxigênio, acidez e presença de agentes redutores como, por exemplo, ascorbato, glutatona e catecolaminas (THOMPSON; ORVIG, 2001).

Em condições fisiológicas, a forma predominante é a aniônica (+5), denominada ortovanadato (H_2VO_4^-), que possui estrutura semelhante ao grupo fosfato. A forma catiônica (+4), vanadil (VO^{+2}), é encontrada em ambientes redutores intracelulares e sua estrutura assemelha-se ao Mg^{2+} (BRICHARD; HENQUIN, 1995). Entretanto, o equilíbrio entre estas duas formas, a conversão entre elas no meio intracelular ainda são focos de estudo a serem elucidados (CAM *et al.*, 2000). Interessantemente, o estado de oxidação destes compostos parece ser fundamental nas diferentes respostas biológicas de cada um (EVANGELOU, 2002). Os compostos de vanádio peroxidados assumem formas geométricas complexas (pentagonal bipiramidal ou octaédrica), características estruturais que conferem capacidade de reação com diversos elementos químicos (MORINVILLE *et al.*, 1998).

1.3.3 Mecanismo de ação “insulin-like”:

O mecanismo de ação dos compostos de vanádio ainda não foi totalmente esclarecido. Embora alguns estudos tenham demonstrado ação dos sais de vanádio via ativação do receptor tirosina quinase, vários estudos sugerem que a ação do vanádio não está envolvida com o receptor da insulina (SHISHEVA; SHECHTER, 1992; D’ONOFRIO *et al.*, 1993; D’ONOFRIO *et al.*, 1994). A maioria dos estudos apontam, como mecanismo de ação, a inibição de proteínas tirosina fosfatases (PTPs), resultando em estimulação indireta da fosforilação da tirosina (TSIANI; FANTUS, 1998; BEVAN *et al.*, 1995; MCNEILL *et al.*, 1995; POSNER *et al.*, 1994). Ainda não se tem dados e poucos são os modelos experimentais que permitem estudar quais PTPs específicas são inibidas pelo vanádio. Através da descrição da estrutura de PTPs, como por exemplo, a PTP1B, BHATTACHARYYA *et al.* (2001) propõem estudos de modelagem molecular e difração de raio-X para se investigar a atividade das PTPs.

A hipótese de inibidor de PTP é explicada pelo fato do vanádio atuar como competidor do grupo fosfato impedindo assim, a reação enzimática. Interessantemente, a formação de

compostos de vanádio peroxidados demonstrou ser 100 – 1000 vezes mais potente em oxidar o domínio essencial da cisteína, que é aminoácido comum a todas PTPs (BHATTACHARYYA; TRACEY, 2001).

BAASS *et al.* (1995), encontraram atividade do ânion bisperoxo oxovanadato *in vivo* ao aumentar o conteúdo de fosfotirosina do receptor tirosina kinase presente nos endossomos. Além desta estimulação indireta, o vanadato (composto de vanádio) pode estimular, diretamente, proteínas envolvidas na sinalização pós receptor de insulina e IRS (TSIANI; FANTUS, 1997; BRICHARD; HEQUIN, 1995).

FANTUS *et al.* (1995) demonstraram a capacidade do vanadato em modular a ação da insulina, em adipócitos, através do aumento da afinidade do receptor pela insulina. Foi verificado que o tempo de ligação da insulina com o receptor não é alterado, entretanto, o tempo de ação da insulina aumentou significativamente na presença do vanadato. Estes dados corroboram a hipótese de que os compostos de vanádio inibem PTPases, alterando a relação da fosforilação e desfosforilação do receptor tirosina kinase. No entanto, esta modulação não foi verificada em hepatócitos, indicando que os efeitos dos compostos de vanádio variam de acordo com o tipo celular e a forma do vanádio (HAMEL; DUCKWORTH, 1995).

O vanadato demonstrou ser capaz de reduzir a hiperglicemia e os níveis de insulina em ratos obesos, além de reduzir a alta atividade de PTPases encontrada no fígado dos mesmos (PUGAZHENTHI *et al.*, 1995). Como um dos efeitos de maior importância dos sais de vanádio, verificou-se a indução do transportador GLUT 4, do seu compartimento intracelular para a superfície da célula, aumentando a captação de glicose (PÂQUET *et al.*, 1992). BRICHARD (1995) demonstrou que não há modificação no RNAm GLUT-4, corroborando a hipótese de que o vanadato atue na translocação e/ou atividade intrínseca do transportador de glicose. Este composto provou ser eficiente em modelos com diabetes tipo II, sendo capaz de normalizar a concentração de glicose e de reduzir a hiperinsulinemia e os níveis de triacilgliceróis no plasma (KHANDELWAL; PUGAZHENTHI, 1995).

1.3.4 Outros efeitos:

Sua ação na promoção da mitogênese e da proliferação celular está envolvida com proteínas tirosina quinases específicas, sendo este efeito específico para apenas alguns tipos celulares (WANG; SCOTT, 1995). As MAP (mitogen activated protein) kinases (p42^{mapk} ou ERK 1 e p44^{mapk} ou ERK 2) e ribossomal S6 kinases (p70^{s6k} e p90^{rsk}), relacionadas com a síntese de glicogênio e de proteína, também são ativadas na presença do vanadato por via independente do receptor da insulina, provavelmente, por inibição de PTPs específicas que são necessárias para a ativação da via ras-raf-MAPK (PANDEY; CHIASSON; SRISVASTAVA; 1995).

O aumento na atividade de p42^{mapk} e p44^{mapk} pelo composto de vanádio (bis(maltolato)oxovanadium) na dose de 0,75 mg/mL na água de beber, foi demonstrado por HEI *et al.* (1995), em ratos diabéticos tratados a longo prazo (6 meses). Entretanto, o estudo a curto prazo (2 meses), dose de 1mg/mL não demonstrou alterações nos níveis de MAP kinases e de S6 kinases.

Estudos recentes demonstraram várias propriedades dos compostos de vanádio relacionadas com o câncer como: modulação da atividade de enzimas xenobióticas, inibição da síntese de DNA e RNA e geração de espécies reativas de oxigênio, interrupção do ciclo celular e modulação do potencial metastático das células tumorais (EVANGELOU, 2002).

Ativação do NF-κB, fator nuclear de transcrição que regula a expressão de vários genes responsáveis pela resposta imunitária e inflamatória e pela regulação do ciclo celular, efeito este que pode ou não levar a célula a morte celular por apoptose, também tem sido explorado por alguns estudos (EVANGELOU, 2002; THOMPSON, ORVIG, 2001).

1.3.5 Toxicidade:

Estudos em roedores foi demonstrado alguns efeitos tóxicos, como redução no consumo de água e alimento, e diarreia (DOMINGO *et al.*, 1995). Também foi verificado acúmulo

do vanádio em diferentes órgãos, principalmente nos rins, o que poderia resultar em toxicidade a longo prazo (HAMEL; DUCKWORTH, 1995). No entanto, a administração destes agentes em concentrações pequenas, com aumento gradativo, mostrou ser suficiente para evitar tais efeitos (TSIANI; FANTUS, 1997). Administração a longo prazo em ratos (1 ano) via oral não apresentou alterações a nível hematológico, hepático ou renal (BRICHARD, HENQUIN, 1995). Estudos recentes com compostos de vanádio orgânicos demonstraram ser mais potentes e menos tóxicos (GOLDWASER *et al.*, 2000; MCNEILL *et al.*, 1995).

CRUZ *et al.* (1995) demonstraram que o vanadato é citotóxico para algumas linhagens de células tumorais (HTB14, MDAY-D2, EOMA), sem, entretanto, conhecer exatamente seu mecanismo de ação. Estudos relacionados com proliferação celular sugerem que os compostos de vanádio podem tanto induzir proliferação celular quanto a morte celular, dependendo da concentração e do tempo de exposição, que atuam na atividade das MAP kinases (CEROVAC *et al.*, 1999).

GOLDFINE *et al.* (1995) realizaram estudos em humanos, por curto período de tempo, com metavanadato de sódio e verificaram melhora na sensibilidade da insulina em pacientes diabéticos tipo II e alguns do tipo I. Esta melhora foi relacionada principalmente com o aumento da captação de glicose nos tecidos periféricos, visto que não houve alteração na produção de glicose hepática. Exames laboratoriais não identificaram nenhuma alteração no funcionamento de rins, fígado e tireóide. Os efeitos tóxicos reportados foram alguns distúrbios gastrointestinais como vômito e diarreia (GOLDIFINE *et al.* 1995).

Embora o mecanismo de ação dos compostos de vanádio não esteja totalmente esclarecido, sabe-se que seus efeitos semelhantes aos da insulina não seguem exatamente a mesma via de sinalização da insulina. Sendo assim, os sais de vanádio podem ser importantes agentes farmacológicos em doenças onde a ação da insulina não seja satisfatória.

1.3.6 Aplicação clínica:

Ainda não existem informações suficientes para utilização de doses farmacológicas na diabetes. Estudos procuram desenvolver compostos de vanádio que possam melhorar sua absorção e reduzir seus efeitos tóxicos (O' CONNELL, 2001).

2 OBJETIVOS:

Este trabalho objetiva investigar se a administração *in vivo* de ortovanadato de sódio e sulfato de vanadil, ambos peroxidados, em ratos diabetizados por estreptozotocina reduz a glicemia e se as proteínas intracelulares IR- β , Akt e ERK1/2 estão envolvidas neste processo.

3 MATERIAL E MÉTODOS:

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar pesando aproximadamente 200 g, obtidos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro (12/12 horas), em ambiente com temperatura controlada de 22 ± 2 °C com água e ração livres.

3.2 MATERIAL

Anticorpos policlonais de coelho anti-subunidade β do receptor de insulina, anti-Akt 1/2 e de camundongo anti-PY(20) e p-ERK1/2 foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology. Anticorpos anti-IgG de coelho e de camundongo conjugados com a enzima HRP ("Horseradish Peroxidase") e Substrato Quimiluminescente ULTRA SuperSignal adquiridos da Pierce. A revelação dos filmes da técnica de "Imunoblotting" foi realizada no Hospital de Clínicas de Curitiba. Os demais compostos foram obtidos da Sigma.

3.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS:

✓ *Indução do diabetes*

Os ratos foram anestesiados com éter e injetados intravenosamente via peniana com estreptozotocina (45 mg/kg) diluída em tampão citrato pH 4,5. Após 7 dias, aproximadamente 0,2 mL de sangue foi retirado por corte longitudinal da cauda e a glicemia mensurada por Kit GLICOSE PAP Liquiform da Labtest Diagnóstica (TRINDER, 1969; SACKS *et al*, 2002). Todos os animais apresentaram glicemia acima de 300 mg/dL, confirmando a instalação da diabetes.

✓ *Preparo dos sais de vanádio*

O sulfato de vanadil e ortovanadato de sódio, ambos peroxidados, foram preparados na concentração de 0,25 mM e administrados na água de beber dos ratos diabéticos. A solução foi trocada em dias alternados e armazenados em garrafas âmbar para evitar degradação pela luz.

✓ *Determinação da glicemia*

A glicemia foi mensurada em dias alternados por método colorimétrico Kit GLICOSE PAP Liquiform da Labtest Diagnóstica (TRINDER, 1969; SACKS *et al.*, 2002) até completar 8 dias de tratamento. Os animais foram anestesiados com éter e o sangue coletado da cauda através de corte longitudinal.

✓ *Análise das proteínas do músculo sóleo*

Após o 7º dia, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com pentobarbital sódico (50 mg/kg) e utilizados após a abolição dos reflexos das patas à dor. A veia porta foi exposta por laparotomia mediana. Aproximadamente 50% dos animais de cada grupo foi injetada na veia porta 0,5 mL de solução salina 0,9% e 50% restantes contendo 1,5 U/kg de peso corpóreo de insulina regular (BioBRÁS U-100). Os músculos sóleo foram retirados após 2 minutos da infusão com insulina na veia porta (CARVALHO *et al.*, 1996; SAAD *et al.*, 1992), e congelados em nitrogênio líquido.

✓ *Quantificação protéica:*

Os músculos congelados foram homogeneizados em tampão de lise na proporção 1:7 com o auxílio de um homogeneizador Politron (25.000 rpm/min), centrifugados por 5 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante coletado. A quantificação protéica foi feita pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Este método utiliza o corante Coomassie Blue G 250 que se liga à proteína resultando em coloração azul, passível de ser detectada em comprimento de onda de 450nm. A concentração da proteína da amostra desconhecia é

calculada com base em uma curva padrão de uma proteína conhecida (Albumina Bovina Sérica). Após a dosagem protéica as amostras foram diluídas em tampão laemmli 5X e submetidas à eletroforese SDS-PAGE seguido por Imunoblotting (LAEMMLI, 1970).

✓ *Eletroforese: método "SDS-PAGE" (Dodecil de sulfato de sódio – eletroforese em gel de poliacrilamida)*

Quando submetidas a um campo elétrico, as proteínas migram de acordo com vários fatores, tais como peso molecular, carga, formato e interação com outras moléculas (proteínas e lipídios).

O método "SDS-PAGE" surgiu em 1960 descrito por Laemmli e desenvolvido para que esta migração dependa unicamente do tamanho da proteína. O SDS (dodecil de sulfato de sódio) é um poderoso detergente carregado negativamente que se liga a regiões hidrofóbicas das proteínas. O complexo formado SDS-proteína distribui carga negativa semelhante entre todas as proteínas (migrará para o pólo positivo do campo elétrico). Portanto, a migração das proteínas no método "SDS-PAGE" depende unicamente dos seus pesos moleculares.

✓ *Imunoblotting:*

O método de Imunoblotting (ou "Western blotting") surgiu em 1979, descrito por Towbin (TOWBIN, 1979). A idéia geral deste método é a identificação de proteínas específicas pelo uso de anticorpos mono ou policlonais, incluindo a detecção, a quantidade relativa e o peso molecular de proteínas, em uma mistura complexa. Após a separação das proteínas em gel de poliacrilamida "SDS-PAGE", elas são transferidas para uma membrana de nitrocelulose, onde se procederá o método. Como restarão regiões onde não haverá proteínas na membrana, primeiro é necessário incubá-la em tampão de bloqueio, evitando que anticorpos se liguem inespecificamente a estas regiões. Após bloqueada, a membrana é, então, incubada em tampão de incubação contendo o anticorpo primário para a proteína que se quer identificar. Para visualizar a interação antígeno-anticorpo é

necessário um método de detecção; usualmente utiliza-se um segundo anticorpo voltado para o primeiro (anti-anticorpo) conjugado com uma enzima, a qual permitirá, pela adição de um substrato cromogênico ou quimiluminescente, tal visualização.

Foram utilizados anticorpos policlonais para a subunidade β do receptor de insulina, Akt 1/2, PY (20) e ERK1/2. O método de detecção foi feito pelo uso de um segundo anticorpo conjugado com a enzima HRP (Horseradish peroxidase), a qual permite a visualização através da adição de um substrato quimiluminescente, o luminol. As imagens foram analisadas por densitometria pelo programa Scion Image.

✓ *Análise estatística:*

Os dados foram expressos como média \pm epm dos grupos experimentais e foram submetidos à análise one way-ANOVA com pós teste de Tukey para um nível de significância de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS:

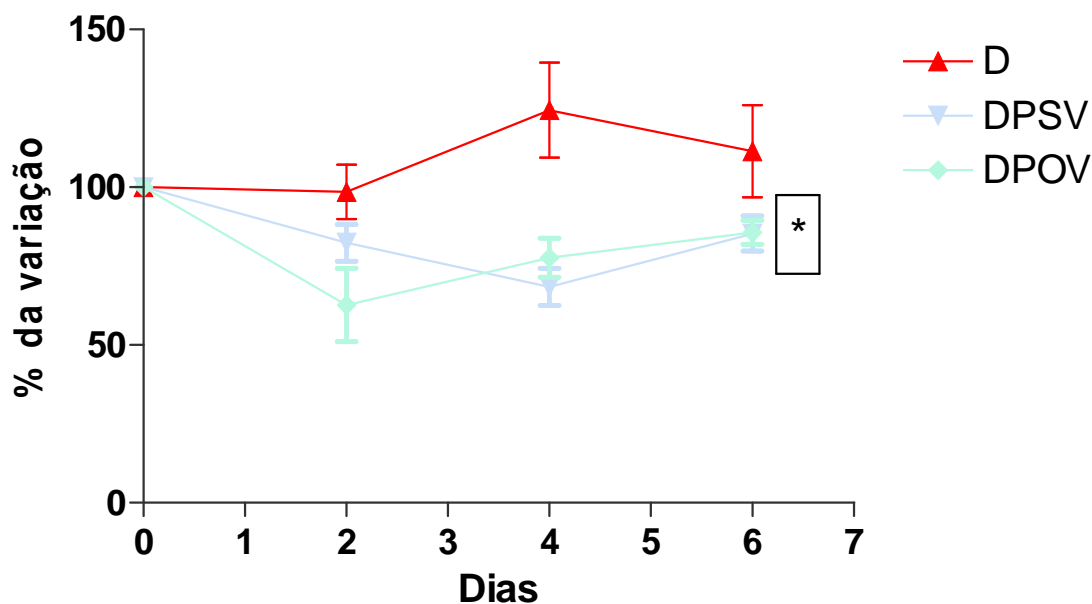


Figura 1: Porcentagem da variação da glicemia dos ratos diabéticos (D), diabéticos tratados com sulfato de vanadil peroxidado (PSV) e diabéticos tratados com ortovanadato de sódio peroxidado (POV). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 8 animais do grupo D, 16 animais do grupo DPSV e 6 animais do grupo DPOV. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo D.

O tratamento dos ratos diabéticos com PSV ou POV promoveu redução da glicemia em 20 e 40 % (figura 1), respectivamente no segundo dia de tratamento ($p < 0,05$). A redução no 4º e 6º dia foi, aproximadamente, de 30% e 15% em ambos os grupos quando comparados ao grupo sem tratamento ($p < 0,05$).

Tabela 1: Ingestão de água (mL/d) e ração (g/d) dos grupos Controle (n = 5), Diabético (n = 5), Diabético tratado com sulfato de vanadil peroxidado (n = 8) e Diabético tratado com ortovanadato de sódio peroxidado (n = 6). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média. * para $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Controle; # $p < 0,05$ quando comparado ao diabético.

Consumo	Controle	Diabético	DPSV	DPOV
Água (mL/d)	37 \pm 1,61	123 \pm 10,09 *	52 \pm 3,99 [#]	58 \pm 5,27 [#]
Ração (g/d)	22 \pm 0,75	36 \pm 3,64 *	19,5 \pm 2,01	21,02 \pm 2,33

O consumo de água e de ração de ratos diabéticos estavam elevados, respectivamente, de 3,3 e 1,6 vezes maior quando comparados aos do grupo Controle (tabela 1). Os grupos tratados com os dois compostos de vanádio peroxidados, por outro lado, tiveram o consumo de ração similar ao do controle. Já o consumo de água diminuiu, continuando maior que o do controle ($p < 0,05$), mas duas vezes menor que os do grupo diabético ($p < 0,01$).

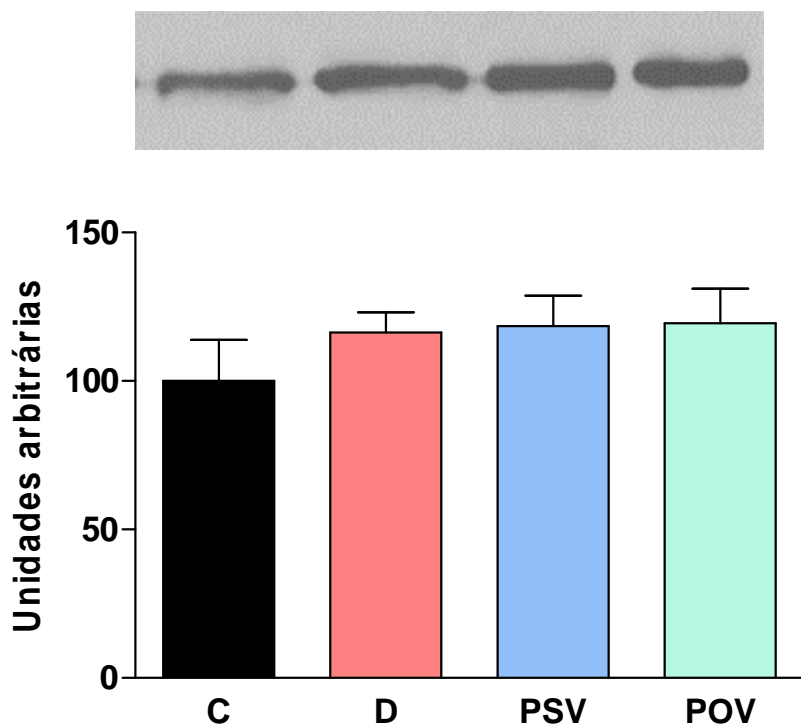


Figura 2: Expressão da IR- β no músculo sóleo de ratos controle (C), diabéticos (D), diabéticos tratados com sulfato de vanadil peroxidado (PSV) e diabéticos tratados com ortovanadato de sódio peroxidado (POV). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de unidades arbitrárias.

A expressão da proteína IR- β no músculo sóleo dos ratos não foi diferente entre os grupos (figura 2).

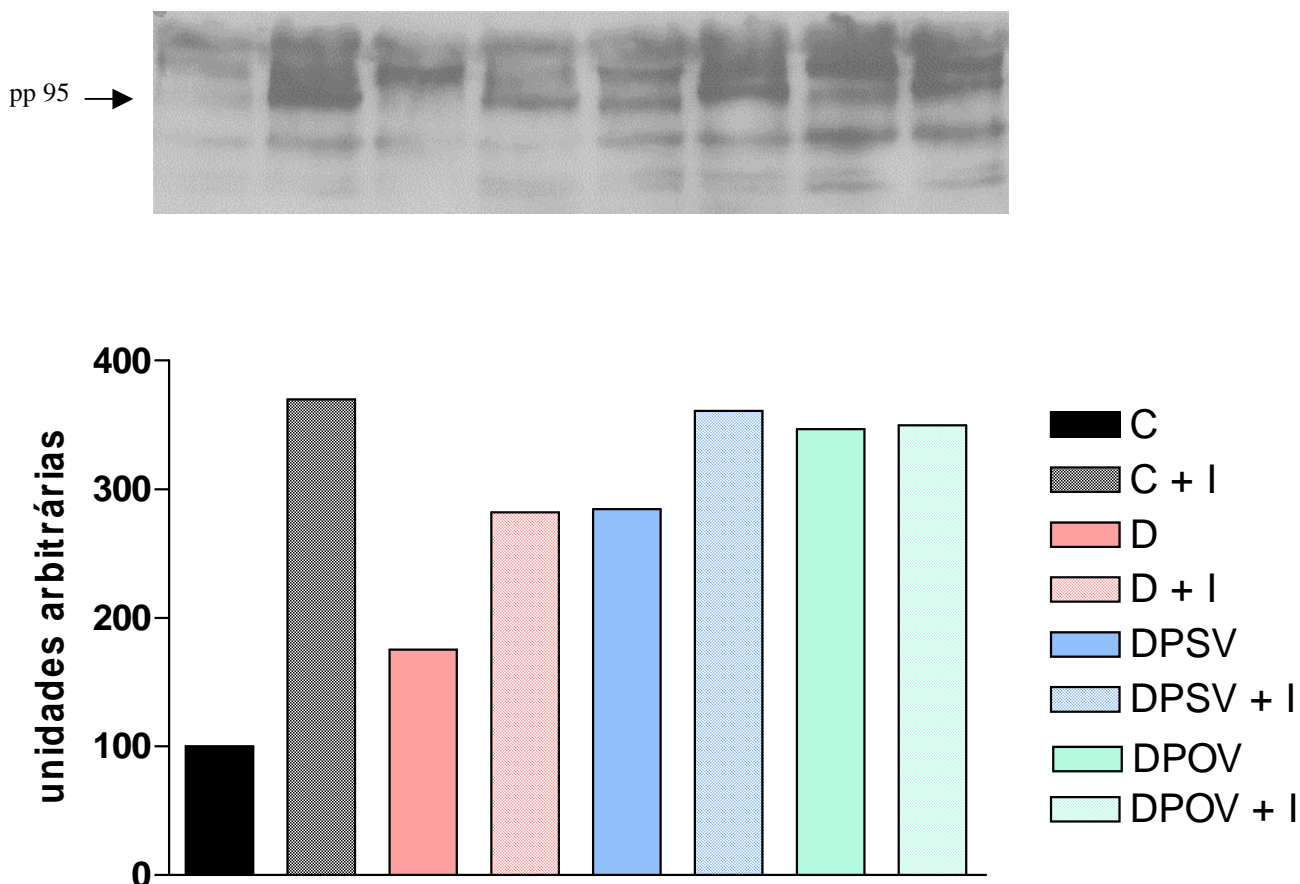


Figura 3: Fosforilação do resíduo tirosil de diferentes proteínas do músculo sóleo de ratos controle (C), ratos controle estimulados com Insulina (C + I), diabéticos (D), diabéticos estimulados com Insulina (D + I), diabéticos tratados com sulfato de vanadil peroxidado (DPSV), diabéticos tratados com sulfato de vanadil peroxidado e estimulados com Insulina (DPSV + I), diabéticos tratados com ortovanadato de sódio peroxidado (DPOV) e diabéticos tratados com ortovanadato de sódio peroxidado e estimulados com Insulina (DPOV + I).

Os dados da figura 3 demonstram diferentes proteínas fosforiladas no resíduo tirosil. A proteína pp 95 apresenta alteração na fosforilação dos diferentes grupos analisados. Os grupos DPSV + I, DPOV e DPOV + I apresentaram, aproximadamente, níveis de fosforilação similares aos do grupo C + I. O grupo DPSV apresentou níveis semelhantes aos do grupo D + I, cujo grau de fosforilação foi 1,6 vezes maior quando comparado ao D.

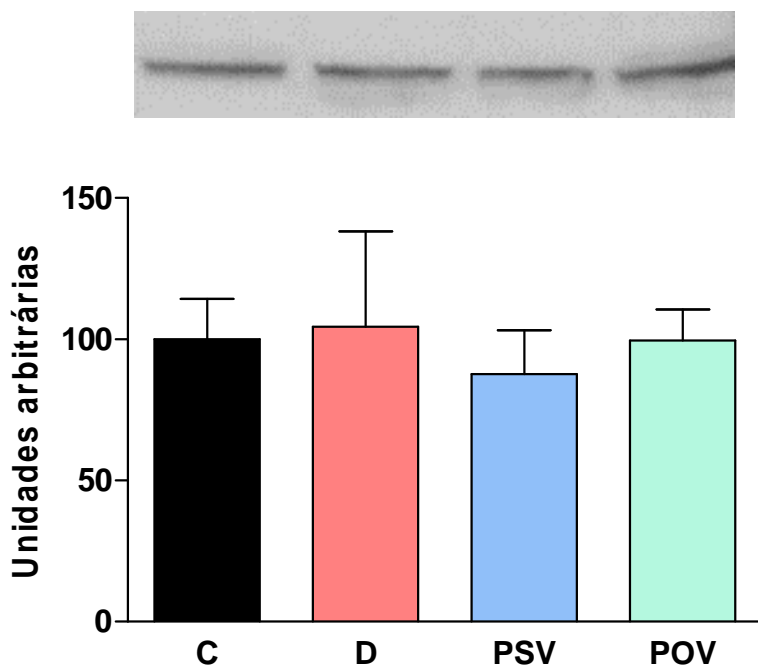


Figura 4: Expressão da Akt do músculo sóleo de ratos controle (C), diabéticos (D), diabéticos tratados com sulfato de vanadil peroxidado (PSV) e diabéticos tratados com ortovanadato de sódio peroxidado (POV). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de unidades arbitrárias.

A expressão da proteína Akt no músculo sóleo de ratos não foi diferente entre os grupos.

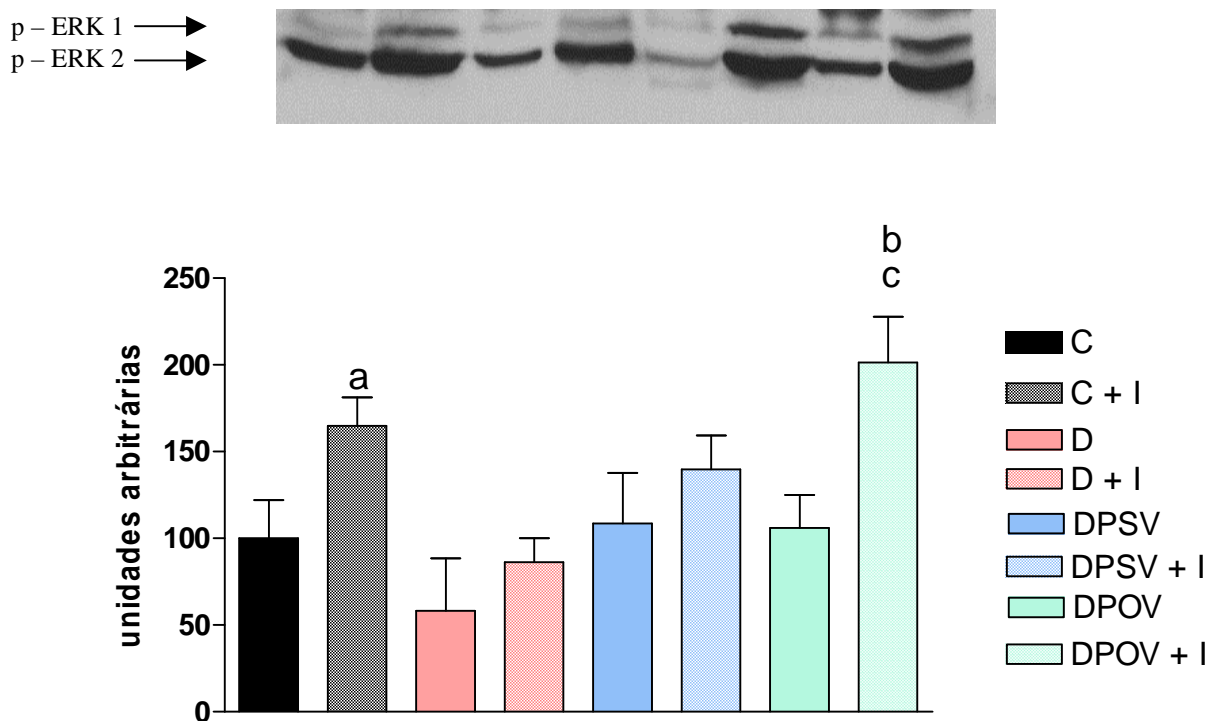


Figura 5: Fosforilação da ERK 1 no resíduo tirosil 204 no músculo sóleo de ratos controle (C) [n = 5], ratos controle estimulados com Insulina (C + I) [n = 5], diabéticos (D) [n = 5], diabéticos estimulados com Insulina (D + I) [n = 5], diabéticos tratados com sulfato de vanadil peroxidado (DPSV) [n = 11], diabéticos tratados com sulfato de vanadil peroxidado e estimulados com Insulina (DPSV + I) [n = 11], diabéticos tratados com ortovanadato de sódio peroxidado (DPOV) [n = 3] e diabéticos tratados com ortovanadato de sódio peroxidado (DPOV + I) [n = 3]. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de unidades arbitrárias. a quando comparado ao grupo C; b $p < 0,05$ quando comparado ao grupo D + I; c $p < 0,05$ quando comparado ao grupo DPOV.

Os dados da figura 5 representam a fosforilação da ERK 1 em unidades arbitrárias. A injeção de insulina foi hábil em ativar a ERK 1 significativamente no grupo C ($p < 0,05$). Nos animais do grupo D a ERK 1 estava reduzida em 50% e a presença de insulina elevou sua ativação similar à do grupo C, contudo foi significativamente menor quando comparada à do C + I. No grupo DPSV a ativação da ERK 1 foi similar à do C. A presença de insulina

não modificou sua ativação. O DPOV também teve ativação similar à do C, contudo a presença de insulina promoveu ativação significativa a qual foi similar à do C + I.

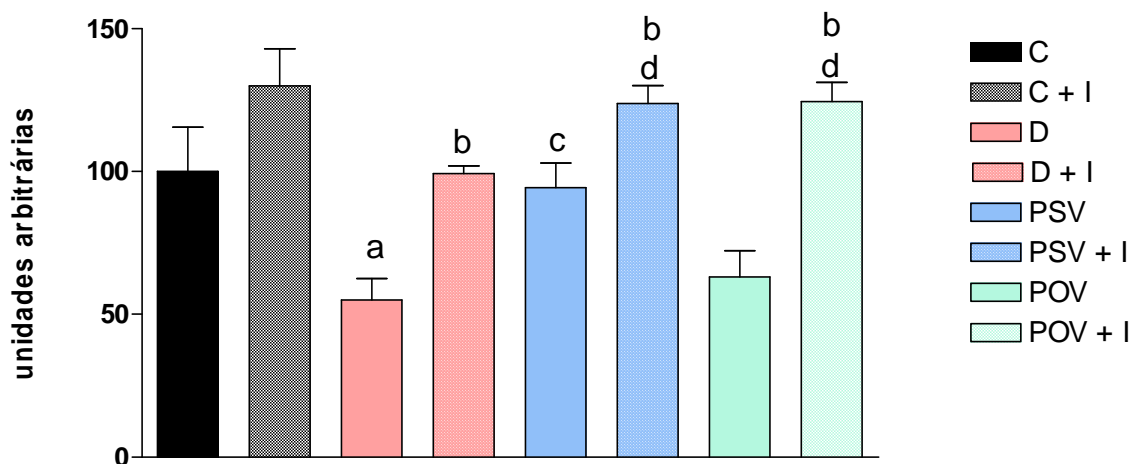


Figura 6: Fosforilação da ERK 2 no resíduo tirosil 204 no músculo sóleo de ratos controle (C) [n = 5], ratos controle estimulados com Insulina (C + I) [n = 5], diabéticos (D) [n = 5], diabéticos estimulados com Insulina (D + I) [n = 5], diabéticos tratados com sulfato de vanadil peroxidado (DPSV) [n = 11], diabéticos tratados com sulfato de vanadil peroxidado e estimulados com Insulina (DPSV + I) [n = 11], diabéticos tratados com ortovanadato de sódio peroxidado (DPOV) [n = 3] e diabéticos tratados com ortovanadato de sódio peroxidado (DPOV + I) [n = 3]. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de unidades arbitrárias. a $p < 0,05$ quando comparado ao C. b $p < 0,05$ quando comparado ao seu respectivo grupo sem insulina. c $p < 0,05$ quando comparado ao grupo D. d $p < 0,05$ quando comparado ao D+I

A figura 6 mostra a fosforilação da ERK 2 em unidades arbitrárias. A presença de insulina no grupo Controle (C+I) não alterou o grau de fosforilação da ERK 2 quando comparado ao do grupo C. O diabetes (D) promoveu redução de 50% da fosforilação da ERK 2 quando comparado ao grupo C. A presença de insulina no grupo diabético (D+I) restabeleceu a fosforilação aos níveis do grupo C. O tratamento da diabetes com sulfato de vanadil peroxidado (DPSV) teve o mesmo efeito do grupo D+I. Por outro lado, o tratamento com vanadato de sódio peroxidado não reverteu os efeitos provocados pela

diabetes, sendo similar o grau de fosforilação da ERK 2 à do grupo D. Interessantemente a presença de insulina associada ao tratamento com PSV (DPSV+I) ou POV (DPOV+I) teve efeito aditivo quanto a fosforilação da ERK 2 elevando-a em aproximadamente 25 %, sendo estatisticamente diferente quando comparada ao grupo D+I.

5 DISCUSSÃO

O vanádio é um elemento que pode ser encontrado em diferentes estados de valência, característica esta que permite a existência de diferentes compostos de vanádio com estruturas químicas complexas e propriedades fisiológicas variadas (SHECHTER *et al.*, 2003). Os estudos *in vitro* permitiram a avaliação dos diversos efeitos dos sais de vanádio sobre o metabolismo de diferentes tipos celulares e tecidos (DUBYAK; KLEINZELLER 1980; CLARK, 1985; CAREY, 1995; SHECHTER, 1980; DUCKWORTH, 1988; JACKSON; 1988; DEGANI, 1981; BOSCH, 1990).

Diferentes modelos de animais diabéticos tratados com ortovanadato de sódio e sulfato de vanadil demonstraram redução da glicemia (KHANDELWAL; PUGAZHENTHI, 1995; CAM *et al.*, 1993; THOMPSON *et al.*, 1993). No entanto, poucos foram os estudos demonstrando a ação dos compostos de vanádio peroxidados *in vivo*. SHISHEVA *et al.* (1993) demonstraram atividade anti-diabética do vanadato peroxidado em ratos diabetizados por estreptozotocina via injeção intraperitoneal (700 µg vanádio/kg de p.c.) durante o período de 72 horas (SHISHEVA *et al.*, 1993). Um segundo estudo demonstrou ação do composto de vanádio peroxidado [VO(O₂)₂ 1 – 10 phenanthroline], bpV(phen), via transdermal (BRAND; HAMEL, 1999). Os dados da figura 1 demonstram redução da glicemia de ratos diabéticos tratados oralmente na água de beber com sulfato de vanadil (0,25 mM) ou ortovanadato de sódio (0,25 mM), ambos peroxidados, utilizando dose, aproximadamente, 15 vezes menor que a encontrada na literatura. A tendência em retornar aos níveis glicêmicos iniciais no final do sexto dia pode ser explicado pelo fato da dose ter sido mantida constante. Estudos crônicos com sulfato de vanadil iniciam o tratamento com doses baixas, aumentando gradativamente a concentração ao longo dos dias (DAI *et al.*, 1994; CAM *et al.*, 1999). Estudos recentes verificaram atividade insulino-mimética do vanádio em concentrações acima de 0,75 mg/mL por períodos a partir de 2

semanas (CROS *et al.*, 1992; CAM *et al.*, 2000). No entanto, doses elevadas de vanádio causam algumas alterações, como diarreia, o que resulta em desidratação e, em alguns casos, morte de alguns animais (DOMINGO *et al.*, 1995).

O modelo de diabetes induzido por estreptozotocina é amplamente utilizado e apresenta sintomas como insulinopenia, hiperfagia e catabolismo (WEI *et al.*, 2003). Os dados da tabela 1 demonstram aumento do consumo de água e de ração do grupo D, características estas que confirmam, juntamente com a hiperglicemia, o estado diabético dos animais. Os grupos tratados com PSV ou POV apresentaram redução no consumo de ração quando comparados ao grupo D, igualando-se a quantidades similares às do grupo C. A ingestão de água também apresentou redução nos grupos tratados, entretanto, não chegou a atingir os mesmos níveis de consumo do grupo C. Estas respostas também foram encontradas em estudos que utilizaram sais de vanádio (metavanadato de sódio, sulfato de vanadil) administrados via oral e cronicamente (MALABU *et al.*, 1994; THOMPSON *et al.*, 1993). MALABU *et al.* (1994) levantaram a hipótese de que o efeito hipoglicemiante do vanadato seria, exclusivamente, devido à supressão da ingestão alimentar. No entanto, esta hipótese foi refutada por estudos posteriores que utilizaram um segundo grupo diabético não tratado que consumia a mesma quantidade de calorias que o grupo diabético tratado (PAIR FED) (YUEN *et al.*, 1997; CAM *et al.*, 1999), além dos vários estudos que demonstraram atividade do vanádio em diferentes tipos celulares (CAM *et al.*, 2000). WANG *et al.* (2001) propuseram um mecanismo de ação para explicar esta redução na ingestão alimentar, ao constatar redução dos níveis do neuropeptídeo Y (NPY) nas áreas do núcleo paraventricular e núcleo arqueado de ratos Zucker obesos (WANG *et al.*, 2001).

Mesmo com os vários estudos durante a última década, o mecanismo de ação molecular do vanádio *in vivo* ainda não foi completamente compreendido (MARZBAN; McNEILL, 2002). Alguns estudos demonstraram ação do vanádio em restaurar níveis reduzidos do RNAm e da expressão da proteína GLUT-4 em músculo esquelético e cardíaco de ratos diabéticos (STROUT *et al.*, 1990; KOPP *et al.*, 1997; MOHAMMAD *et*

al., 2002). Níveis de RNAm de PEPCK e G-6-Pase também foram restaurados em fígado de diferentes modelos de ratos diabéticos (BRICHARD *et al.*, 1993; WANG *et al.*, 1997; MARZBAN *et al.*, 2002) Em relação à expressão da proteína IR- β , os dados da figura 2 não apresentaram alteração nos níveis de expressão da proteína quando comparados aos grupos Controle e Diabetizados, após o tratamento de ambos os compostos de vanádio por sete dias. Embora os tratamentos não tenham apresentado alteração na expressão desta proteína, sua ação possivelmente esteja atuando na fosforilação/desfosforilação de algumas proteínas sinalizadoras. A figura 3 corrobora esta hipótese juntamente com alguns estudos *in vitro* que encontraram ativação da subunidade β do receptor da insulina estimulada por sais e compostos de vanádio peroxidados (FANTUS *et al.*, 1994; BAND *et al.*, 1997). Um dos possíveis mecanismos de ação do vanádio é via inibição de PTPs. Enquanto o vanádio apresenta esta ação de inibir PTPs, atuando como análogo do fosfato, os compostos de vanádio peroxidados atuam, diretamente, oxidando o resíduo catalítico cisteína de PTPs, como demonstrado com a proteína PTP-1B (HUYER *et al.*, 1997). A PTP-1B, juntamente com outras PTPs como, por exemplo, rPTP- α (receptor protein tyrosine phosphatase- α), LAR (leucocyte-antigen related tyrosine phosphatase) e SHP2 (SH2-domain-containing phosphotyrosine phosphatase), está relacionada na modulação da cascata de sinalização da insulina. Estudos *in vitro* e *knockout in vivo* constataram o papel da PTP-1B como importante modulador da sensibilidade à insulina e do metabolismo energético (CHENG *et al.*, 2002).

A proteína Akt vem sendo estudada extensivamente por modular diversas atividades biológicas de diferentes tipos celulares, como translocação de GLUT-4, síntese de glicogênio, glicólise, síntese protéica e ciclo celular (COFFER *et al.*, 1998). Estudos recentes têm associado ativação da Akt com sua redução da mobilidade em gel SDS-PAGE (ANDJELKOVIC *et al.*, 1996; KOHN *et al.*). WIJKANDER *et al.* (1997) demonstraram ação do vanadato e vanadato peroxidado em ativar Akt em adipócitos incubados de ratos (WIJKANDER *et al.*, 1997). Alguns estudos relacionaram a redução da ativação da Akt

com resistência à insulina (CARVALHO *et al.*, 2000), fato este que coloca a Akt como importante modulador da sinalização da insulina. No entanto, os dados da figura 4 indicam que não houve alteração na expressão da Akt entre os grupos, nem na mobilidade da mesma em gel de eletroforese. Explicamos esta divergência na literatura por: (i) nossos experimentos foram realizados *in vivo*; (ii) os tecidos-alvo estudados são diferentes (músculo sóleo) e; (iii) as diferentes doses utilizadas. Portanto, a redução da glicemia, do consumo de água e ração relatados neste trabalho, não podem ser explicados via ativação da Akt. Uma outra possível explicação seria a ação direta do vanádio sobre o transportador GLUT-4, visto que alguns estudos reportaram aumento da expressão de GLUT-4 em músculo cardíaco e esquelético de ratos diabetizados por estreptozotocina (KOPP *et al.*, 1997; STROUT *et al.*, 1990) e, aumento da atividade intrínseca dos transportadores de glicose do músculo (KRISTIANSEN *et al.*, 1996).

As ERKs fazem parte da família das MAPKs, proteínas envolvidas com mitogênese, diferenciação celular, regulação metabólica, crescimento celular, organização do citoesqueleto, transporte vesicular, apoptose, resposta a estresse (DENHARDT, 1996). Na última década, vários estudos, *in vitro*, em diferentes linhagens celulares reportaram ação dos sais de vanádio e compostos de vanádio peroxidados na ativação de MAPKs (THÉBERGE *et al.*, 2003; CEROVAC *et al.*, 1999; KRADY *et al.*, 1997; HEI *et al.*, 1998; PANDEY *et al.*, 1995). Foi relatado ativação diferenciada de ERK 1 e ERK 2 (SARBASSOV *et al.*, 1997). Nossos dados corroboram estes achados onde a ERK 1 teve ativação somente nos animais diabéticos tratados com ortovanadato de sódio peroxidado co-estimulado com Insulina (figura 5). ZHOU *et al.* (1993) e HEI *et al.* (1993) foram os primeiros a demonstrar ativação de MAPKs em músculo esquelético estimulado pela insulina, constatando uma das dificuldades, que era a alta taxa de fosforilação basal de ERKs encontradas no músculo. Este achado explica o dado encontrado neste trabalho onde a presença de insulina não foi capaz de alterar o grau de fosforilação de ERK2 no grupo controle (C+I) pois esta já se encontrava elevada. Os níveis de fosforilação da ERK 2, que apresentaram-se reduzidos em 50% no grupo diabético, retornaram aos níveis dos animais

controle quando tratado com PSV. Interessantemente, quando houve estímulo com insulina, para ambos os grupos tratados com sais de vanádio peroxidados, ocorreu efeito aditivo entre insulina e vanádio (figura 6), efeito encontrado em estudos *in vitro* (POSNER *et al.*, 1994). Estes dados corroboram a hipótese de que o vanádio atue aumentando a sensibilidade da insulina endógena circulante, provavelmente por uma via de sinalização alternativa (CAM *et al.*, 2000).

A diabetes apresenta diversas alterações metabólicas devido a sinalização inadequada da insulina. Estudo recente em músculo esquelético de ratos diabetizados por estreptozotocina, demonstrou alterações na expressão de diferentes genes envolvidos com metabolismo energético, regulação transcricional e transporte de vesículas. Alguns genes apresentaram aumento da expressão da *fatty acid transporter type 1*, *hormônio lipase sensível*, *fatty acid binding protein 3* (envolvidas com β oxidação de ácidos graxos), *ubiquitin-conjugating enzyme E2D2* e *ubiquitina proteín ligase* (envolvidas com *proteólise*). Outros apresentaram redução da expressão: GLUT-4, hexokinase II (envolvidas com metabolismo de carboidratos), *NADH-ubiquinona desidrogenase*, *citocromo c oxidoreductase*, *citocromo c oxidase* (envolvidas na cadeia transportadora de elétrons) (YECHOOR *et al.*, 2002). A atrofia do músculo esquelético é um fenômeno que, embora seja encontrado em diferentes estados catabólicos como jejum, câncer, insuficiência renal e diabetes, envolve um mesmo conjunto de genes (denominados *atrofins*) (LECKER *et al.*, 2004). Na maioria dos casos, este processo ocorre por supressão da síntese protéica e elevação dos níveis de degradação protéica.

Portanto, a ativação de ERK 1 e 2 encontrada neste trabalho, pode estar modulando a expressão das várias proteínas citadas acima, uma vez que ERKs atuam na ativação de RSKs (Ribossomal S6 Kinases) e de vários outros fatores transcricionais nucleares como c-Fos, c-Jun, c-Myc, CREB (DENHARDT, 1996; BLENIS, 1993). As ERKs também atuam na sinalização de IGF-I e IGF-II, que tem papel na diferenciação miogênica e proliferação celular (WILSON *et al.*, 2003; SARBASSOV; PETERSON, 1998).

6 CONCLUSÃO

Os nossos dados sugerem que a administração de ortovanadato de sódio e sulfato de vanadil, ambos peroxidados e em concentrações de 0,25 mM, reduziram a glicemia, o alto consumo de água e de ração encontrado em ratos diabéticos. Também apresentaram ação na cascata de sinalização da insulina ao aumentarem a fosforilação de ERK 1/2 em músculo sóleo. Interessantemente, os sais de vanádio peroxidados apresentaram efeito aditivo juntamente com o estímulo insulínico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AIZAWA, T.; KOMATSU, M.; ASANUMA, N.; SATO, Y.; SHARP, G.G. Glucose action 'beyond ionic events' in the pancreatic beta cell. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.19, 4343 – 4347, 1998.

ALESSI, D. R.; DOWNES, C. P. The role of PI 3-kinase in insulin action. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1436, p. 151-164,1998.

ALZAID, A. A. Insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Acta Diabetologica**, v.33, n. 2, p. 87-99, 1996.

ANDJELKOVIC, M.; JAKUBOWICZ, T.; CRON, P.; MING, X; HAN, J. Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 5699 – 5704, 1996.

BAASS, P. C.; DI GUGLIELMO, G. M.; AUTHIER, F.; POSNER, B. I.; BERGERON, J. J. M. Compartmentalized signal transduction by receptor tyrosine kinases. **Trends in Cell Biology**, vol. 5, p. 465 – 470, 1995.

BAILEY, C. J. Potential new treatments for type 2 diabetes. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 21, p. 259 – 265, 2000.

BAND, C. J.; POSNER, B. I.; DUMAS, V.; CONTRERES, J. Early signaling events triggered by peroxovanadium [bpV(phen)] are insulin receptor kinase (IRK) – dependent: Specificity of inhibition of IRK-associated protein tyrosine phosphatases by bpV(phen). **Molecular endocrinology**, v. 11, p. 1899 – 1910, 1997.

BELL, G.I.; KAYANO, T.; BUSE, J.B.; BURANT, C.F.; TAKEDA, J.; LIN, D.; FUKUMOTO, H.; SEINO, S. Molecular biology of mammalian glucose transporters. **Diabetes Care**, v. 13, p. 198 – 208, 1990.

BERGMAN, R. N.; ADER, M. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM**, v. 11, n.9, p. 351 – 356, 2000.

BEVAN, A. P.; DRAKE, P. G., YALE, J.; SHAVER, A; POSNER, B. I. Peroxovanadium compounds: Biological actions and mechanism of insulin-mimesis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 153, p. 49 – 58, 1995.

BHATTACHARYYA, S.; TRACEY, A.S. Vanadium (V) complexes in enzyme systems: aqueous chemistry, inhibition and molecular modeling in inhibitor design. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 85, p. 9 – 13, 2001.

BLENIS, J. Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 5889 – 5892, 1993.

BOSCH, F.; IATZOGLOV, M.; PARK, E.A.; HANSON, R.W. Vanadate inhibits expression of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in rat hepatoma cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 13677 -13682, 1990.

BOSCHERO, A.C.; TOMBACCINI, D.; ATWATER, I. Effects of glucose on insulin release and ^{86}Rb permeability in cultured neonatal and adult rat islets. **FEBS (Federation of European Biochemical Societies) Letters**, v. 236, 375 – 379, 1988.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 142, p. 79 – 83, 1976.

BRAND, R. M.; HAMEL, F. G. Transdermally delivered peroxovanadium can lower blood glucose levels in diabetic rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 183, p. 117 – 123, 1999.

BRICHARD, S. M. Effects of vanadate on the expression of genes involved in fuel hoemostases in animal models of type I and type II diabetes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 153, p. 121-124, 1995.

BRICHARD, S. M.; DESBUQUOIS, B.; GIRARD, J. Vanadate treatment of diabetic rats reverses the impaired expression of genes involved in hepatic glucose metabolism: effects on glycolytic and gluconeogenic enzymes, and on glucose transporter GLUT2. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 91, p. 91 – 97, 1993.

BRICHARD, S. M.; HENQUIN, J. C. The role of vanadium in the management of diabetes. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 16, p. 265 – 270, 1995.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, p. 813 – 820, 2001.

CAM, M. C.; BROWNSEY, R. W.; McNEILL, J. H. Mechanisms of vanadium action: insulin-mimetic or insulin-enhancing agent? **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.78, p. 829 – 847, 2000.

CAM, M. C.; PEDERSON, R. A.; BROWNSEY, R. W.; McNEILL, J. H. Long-term effectiveness of oral vanadyl sulphate in streptozotocin-diabetic rats. **Diabetologia**, v. 36, p. 218 – 224, 1993.

CAM, M. C.; RODRIGUES, B. McNEILL, J. H. Distinct glucose lowering and beta cell protective effects of vanadium and food restriction in streptozotocin-diabetes. **European Journal of Endocrinology**, v. 141, p. 546 – 554, 1999.

CAREY, J.O.; AZEVEDO, J.L; MORRIS, P. G.; PORIES, W.J.; DOHM, G. L. Okadaic acid, vanadate, and phenylarsine oxide stimulate 2-deoxyglucose transport in insulin-resistant human skeletal muscle. **Diabetes**, v. 44, p. 682 – 688, 1995.

CARR, M. E. Diabetes mellitus: a hypercoagulable state. **Journal of Diabetes and Its Complications**, v. 15, p. 44 – 54, 2001.

CARVALHO, C. R. O.; BRENELLI, S. L.; SILVA, A. C.; NUNES, A. L. B.; SAAD, M. J. A. Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. **Endocrinology**, v. 137, p. 151 – 159, 1996.

CARVALHO, E.; RONDINONE, C.; SMITH, U. Insulin resistance in fat cells from obese Zucker rats – Evidence for impaired activation and translocation of protein kinase B and glucose transporter 4. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 206, p. 7 – 16, 2000.

CEROVAC, Z.; BAN, J.; MORINVILLE, A.; YACCATO, K.; SHAVER, A.; MAYSINGER, D. Activation of MAPK by potassium bisperoxo (1, 10-phenanthroline) oxovanadate (V). **Neurochemistry International**, v. 34, p. 337 – 344, 1999.

CHENG, A.; DUBÉ, N.; GU, F.; TREMBLAY, M. L. Coordinated action of protein tyrosine phosphatases in insulin signal transduction. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 1050 – 1059, 2002.

CLARCK, A. S.; FAGAN, J. M.; MITCH, W. E. Selectivity of the insulin-like actions of vanadate on glucose and protein metabolism in skeletal muscle. **The Biochemical Journal**, v.232, i.1, p. 273 – 276, 1985.

CRUZ, T. F.; MORGAN, A.; WEIXIAN, M. *In vitro* and *in vivo* antineoplastic effects of orthovanadate. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 153, p. 161-166, 1995.

COFFER, P. J.; JIN, J.; WOODGETT, J. R. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. **Journal of Biochemistry**, v. 335, p. 1 – 13, 1998.

CROS, G.; MONGOLD, J.; SERRANO, J.; RAMANADHAM, S.; McNEILL, J. H. Effects of vanadyl derivatives on animal models of diabetes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 109, p. 163 – 166, 1992.

D'ONOFRIO, F.; LE, M. Q.; CHIASSON, J. L.; SRIVASTAVA, A. K. Activation of mitogen activated protein (MAP) kinases by vanadate is independent of insulin receptor autophosphorylation. **FEBS (Federation of European Biochemical Societies) Letters**, v. 340, p. 269 – 275, 1994.

D'ONOFRIO, F.; LE, M. Q.; CHIASSON, J. L.; SRIVASTAVA, A. K. Vanadate dependent activation of mitogen activated protein (MAP)kinase in Chinese hamster ovary cells overexpressing a wild type human insulin receptor (CHO-HIRc). **The Pharmacologist**, v. 35, p. 109, 1993.

DAI, S.; THOMPSON, K. H.; McNEILL. One-year treatment of streptozotocin-induced diabetic rats with vanadyl sulphate. **Pharmacology & toxicology**, v. 74, p. 101 – 109, 1994.

DaSILVAXAVIER, G.; VARADI, A.; LECLERC, I.; SALT, I. P.; DOIRON, B.; HARDIE, D. G.; KAHN, A.; RUTTER, G. A. role of AMP-activated protein kinase in the regulation by glucose of islet beta-cell gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 4023 – 4028, 2000.

DEGANI, I.; GOCHIN, M.; KARLISH, S.J.D.; SHECHTER, Y. Electron paramagnetic resonance studies and insulin-like effects of vanadium in rat adipocytes. **Biochemistry**, 1981, 20: 5795, 1981.

DENHARDT, D. T. Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signaling. **Journal of Biochemistry**, v. 318, p. 729 – 747, 1996.

DOMINGO, J. L.; GOMEZ, M.; SANCHEZ O. J.; LLOBET, J. M.; KEEN, C. L. Toxicology of vanadium compounds in diabetic rats: the action of chelating agents on vanadium accumulation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 153, p. 233 - 240, 1995.

DUBYAK, G. R.; KLEINZELLER, A. The Insulin-mimetic effects of vanadate in isolated rat adipocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 255, n. 11, p. 5306 – 5312, 1980.

DUCKWORTH, W.C.; SOLOMON, S.S. LIEPNIKS, J.; HAMEL, F.G.; HAND, S.; PEAVY, D.E. Insulin-like effects of vanadate in isolated rat adipocytes. **Endocrinology**, 122: 2285 – 2289, 1988.

EMILIEN, G.; MALTEAUX, J.; PONCHON, M. Pharmacological management of diabetes: recent progress and future perspective in daily drug treatment. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 81, p. 37 – 51, 1999.

EVANGELOU, A. M. Vanadium in cancer treatment. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.42, p. 249 – 265, 2002.

FANTUS, I. G.; AHMAD, F.; DERAGON, G. Vanadate augments insulin-stimulated insulin receptor kinase activity and prolongs insulin action in rat adipocytes. **Diabetes**, v. 43, 375 – 383, 1994.

FANTUS, I. G.; DERAGON, G.; LAI, R.; TANG, S. Modulation of insulin action by vanadate: evidence of a role for phosphotyrosine phosphatase activity to alter cellular signaling. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 153, p. 103-112, 1995.

FOOT, E.; BLISS, T.; FERNANDES, L. C.; DA COSTA, C.; LEIGHTON, B. The effects of orthovanadate, vanadyl and peroxides of vanadate on glucose metabolism in skeletal muscle preparations *in vitro*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 109, p. 157-162, 1992.

GOGG, S.; CHEN, J.; EFENDIC, S.; SMITH, U.; OSTENSON, C-G. Effects of phosphotyrosine phosphatase inhibition on insulin secretion and intracellular signaling events in rat pancreatic islets. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 280, p. 1161- 1168, 2001.

GOLDFINE, A. B.; SIMONSON, D. C.; FOLLI, F.; PATTI, M.; KAHN, C. R. Metabolic effects of sodium metavanadate in humans with insulin-dependent and noninsulin-dependent diabetes mellitus *in vivo* and *in vitro* studies. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 80, n.11, p. 3311 – 3320, 1995.

GOLDWASER, I.; GEFEL, D.; GERSHONOV, E.; FRIDKIN, M; SHECHTER, Y. Insulin-like effects of vanadium: basic and clinical implications. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 80, n.1/2, p. 21 – 5, 2000.

GROSS, J. L.; SILVEIRO, S. P.; CAMARGO, J. L.; REICHEL, A. J.; AZEVEDO, M. J.. Diabetes Mellito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46 (1), p. 16 – 26, 2002.

HAMEL, F. G.; DUCKWORTH, W. C. The relationship between insulin and vanadium metabolism in insulin target tissues. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.153, p. 95 - 102, 1995.

HARDIE, D. G.; CARLING, D.; CARLSON, M. The AMP-activated,SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell?. **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, p. 821 – 855, 1998.

HAYASHI, T.; WOJTASZEWSKI, J. F. P.; GODDYEAR, L. J. E. Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. **American Journal of Physiology**, v. 273, p. E1039 – e 1051, 1997.

HEI, Y.; CHEN, X.; PELECH, S. L.; DIAMOND, J.; McNEILL, J. H. Skeletal muscle mitogen-activated protein kinases and ribosomal S6 kinases. **Diabetes**, v. 44, p. 1147 – 1155, 1995.

HEI, Y-J.; McNEILL, J. H.; SANGHERA, S.; DIAMOND, J.; BRYER-ASH, M. P.; PELECH, S. L. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 13203 – 13213, 1993.

HENQUIN, J. C.; MEISSNER, H. P. significance of ionic fluxes and changes in membrane potential for stimulus-secretion coupling in pancreatic B-cells. **Experientia**, v. 40, p. 1043 – 1052, 1984.

HEYLIGER, C.E.; TAHILIANI, A.G., McNEILL, J.H. Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. **Science**, v. 227, p. 1474 – 1477, 1985.

HUYER, G.; LIU, S.; KELLY, J.; MOFFAT, J.; PAYETTE, P.; KENNEDY, B.; TSAPRAILIS, G.; GRESSER, M. J.; RAMACHANDRAN, C. Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 743 – 851, 1997.

JACKSON, T. K.; SALHANICK, A. I.; SPARKS, J. D.; SPARKS, C. E.; BOLOGNINO, M.; AMATRUDA, J. M. Insulin-mimetic effects of vanadate in primary cultures of rat hepatocytes. **Diabetes**, v. 37, p. 1234 – 1240, 1988.

KADOTA, S.; FANTUS, I. G.; DERAGON, G.; HARVEY, J. G.; HERSH, B.; POSNER, B. I. Peroxide(s) of vanadium: a novel and potent insulin-mimetic agent which activates the insulin receptor kinase. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 147, 259 – 266, 1987.

KAHN, C. R. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. **Diabetes**, v. 43, p.1066 – 1084, 1994.

KHAN, F. A.; GOFORTH, P. B.; AHANG, M. SATIN, L. S. Insulin activates ATP-sensitive K (+) channels in pancreatic beta-cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. **Diabetes**, v. 50, p. 2192 – 2198, 2001.

KHANDELWAL, R. L.; PUGAZHENTHI. *In vivo* effects of vanadate on hepatic glycogen metabolizing and lipogenic enzymes in insulin-dependent and insulin-resistant diabetic animals. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.153, p. 87 – 94, 1995.

KOHN, A. D.; KOVACINA, K. S.; ROTH, R. A. Insulin stimulates the kinase activity of RAC-PK, a pleckstrin homology domain containing ser/thr kinase. **EMBO Journal**, v. 14, p. 4288 – 4295, 1995.

KOPP, S. J.; DAAR, J.; PAULSON, D. J.; ROMANO, F. D.; LADDAGA, R. Effects of oral vanadyl treatment on diabetes-induced alterations in the heart GLUT-4 transporter. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 29, p. 2355 – 2362, 1997.

KRADY, M.; FREYERMUTH, S.; ROGUE, P.; MALVIYA, A. N. Pervanadate elicits proliferation and mediates activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in the nucleus. **FEBS (Federation of European Biochemical Societies) Letters**, v. 412, p. 420 – 424, 1997.

KRISTIANSEN, S.; YOUN, J.; RICHTER, E. A. Effect of vanadate on glucose transporter (Glut4) intrinsic activity in skeletal muscle plasma membrane giant vesicles. **Biochim Biophys Acta**, v. 1282, p. 71 -75, 1996.

KROOK, A.; BJORNHOLM, M.; GALUSKA, D.; JIANG, X. J.; FAHLMAN, R.; MYERS Jr, M. G. Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. **Diabetes**, v. 49, p. 284 – 292, p. 2000.

KRUSZYNSKA, Y. T.; OLEFSKY, J. M. Cellular and molecular mechanisms of non-insulin dependent diabetes mellitus. **Journal of Investigative Medicine**, v.44, n.8, 1996.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. **Nature**, v. 227, p. 680 – 85, 1970.

LECKER, S. H.; JAGOE, R. T.; GILBERT, A.; GOMES, M.; BARACOS, V.; BAILEY, J.; PRICE, S. R.; MITCH, W. E.; GOLBERG, A. L. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. **FASEB Journal**, v. 18, p. 39 – 51, 2004.

LEIBIGER, B.; LEIBIGER, I. B.; MOEDE, T.; KEMPER, S.; KULKARNI, R. N.; KAHN, C. R.; de VARGAS, L. M.; BERGGREN, P. O. Selective insulin signaling through A and B insulin receptors regulates transcription of insulin and glucokinase genes in pancreatic beta cells. **Molecular Cell**, V. 7, p. 559 – 570, 2001.

MAASSEN, J. A.; OUWENS, D. M. Mechanism of Insulin Action. **Molecular Pathogenesis of Diabetes mellitus**, v. 22, p. 201-221, 1997.

MALABU, U. H.; DRYDEN, S.; McCARTHY, H. D.; KILPATRICK, A.; WILLIAMS, G. Effects of chronic vanadate administration in the STZ-induced diabetic rat. The antihyperglycemic action of vanadate is attributable entirely to its suppression of feeding. **Diabetes**, v. 43, p. 9 – 15, 1994.

MARTINEZ-RIQUELME, A. E.; ALLISON, S. P. Insulin revisited. **Clinical Nutrition**, v. 22, p. 7 -15, 2003.

MARZBAN, L. RAHIMIAN, R.; BROWNSEY, R. W.; McNEILL, J. H. Mechanisms by which bis(maltolato)oxovanadium (IV) normalizes phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase expression in streptozotocin-diabetic rats in vivo. **Endocrinology**, v. 143, p. 4636 – 4645, 2002.

MARZBAN, L.; McNEILL, J. H. Biological effects of vanadium: possible mechanisms of action. **Proceedings of the International Symposium on Bio-Trace Elements**, p. 108 – 112, 2002.

McNEILL, J. H., YUEN, V. G.; DAÍ S.; ORVIG C. Increased potency of vanadium using organic ligands. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 153, p. 175 – 180, 1995.

MOHAMMAD, A. SHARMA, V.; McNEILL, J. H. Vanadium increases GLUT4 in diabetic rat skeletal muscle. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 233, p. 139 – 143, 2002.

MOLLER, D. E. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. **Nature**, v. 414, p. 821 – 827, 2001.

MORINVILLE, A.; MAYSINGER, D.; SHAVER, A. From Vanadis to Atropos: vanadium compounds as pharmacological tools in cell death signaling. **Trends in Pharmacology Science**, v. 19, p. 452 – 460, 1998.

MYERS, M. G.; WHITE, M. F. Insulin signal transduction and the IRS proteins. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 36; p. 615 – 58.

NYSTROM, F. H.; QUON, M. J. Insulin Signalling: Metabolic pathways and mechanism for specificity. **Cellular Signalling**, v. 8, p. 563-574, 1999.

O' CONNELL, B. S. Select vitamins and minerals in the management of diabetes. **Diabetes spectrum**, v. 14, n.3, p.133 – 148.

PANDEY, S. K.; CHIASSON, J.; SRIVASTAVA, A. K. Vanadium salts stimulate mitogen-activated protein (MAP) kinases and ribosomal S6 kinases. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 153, p. 69 – 78, 1995.

PÂQUET, M. R.; ROMANEK, R. J.; SARGEANT, R. J. Vanadate induces the recruitment of glut - 4 glucose transporter to the plasma membrane of rat adipocytes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 109, p. 149 - 155, 1992.

PLUTZKY, J.; VIBERTI, G.; HAFFNER, S. Atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus and insulin resistance: mechanistic links and therapeutic targets. **Journal of Diabetes and Its Complications**, v. 16, p. 401 – 415, 2002.

POSNER, B. I.; FAURE, R.; BURGESS, J. W.; BEVAN, A. P.; LACHANCE, D.; ZHANG-SUN, G.; FANTUS, I. G.; Ng, J. B.; HALL, D. A.; LUM, B. S.; SHAVER, A. Peroxovanadium compounds: a new class of potent phosphotyrosine phosphatase inhibitor wich are insulin mimetics. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 4596 – 4604, 1994.

PUGAZHENTHI, S.; TANHA, F.; DAHL, B.; KHANDELWAL, R. L. Decrease in protein tyrosine phosphatase activities in vanadate-treated obese Zucker (fa/fa) rat liver. **Molecular and Celular Biochemistry**, v. 153, p. 125-129, 1995.

RANDLE, P. J.; PRIESTMAN, D. A.; MISTRY, S. C.; HALSALL, A. Glucose fatty acid interactions and the regulation of glucose disposal. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 55, p.1 – 11, 1994.

ROITH, D.; ZICK, Y. Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. **Diabetes Care**, v. 24, p. 588 – 597, 2001.

RONDINOME, C. M.; WANG, L; LONNROTH, P; WESSLAU, C.; PIERCE, J. H.; SMITH, U. Insulin receptor substrate (IRS) 1 is reduced and IRS-2 is the main docking protein for phosphatidylinositol 3-kinase in adipocytes from subjects with non-insulin dependent diabetes mellitus. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 94, p. 4171 – 4175, 1997.

RUTTER, G. A. Nutrient – secretion coupling in the pancreatic islet β - cell: recent advances. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 22, p. 247 – 284, 2001.

SAAD, M. J.; ARAKI, E.; MIRALPEIX, M.; ROTHENBERG, P. L.; WHITE, M. F.; KAHN, C. R. Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 90, p. 1839 – 1849, 1992.

SACKS, D. B.; BRUNS, D. E.; GOLDSTEIN, D. E.; MACLAREN, N. K.; MCDONALD, J. M.; PARROT, M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. **Clin Chem**, v. 48, p. 436-472, 2002.

SAKURAI, H.; KOJIMA, Y.; YOSHIKAWA, Y.; KAWABE, K; YASUI, H. Antidiabetic vanadium (IV) and zinc (II) complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, V. 226, P. 187 – 198, 2002.

SALTIEL, A.R.; KAHN, R.C. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, p. 799 – 812.

SARBASSOV, D. D.; JONES, L. G.; PETERSON, C. A. Extracellular signal-regulated kinase-1 and -2 respond differently to mitogenic and differentiative signaling pathways in myoblasts. **Molecular Endocrinology**, v. 11, p. 2038 – 2047, 1997.

SARBASSOV, D. D.; PETERSON, C. A. Insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol-3kinase regulate extracellular signal-regulated kinase-dependent and – independent signalin pathways during myogenic differentiation. **Molecular Endocrinology**, v. 12, p. 1870 – 1878, 1998.

SHAVER, A; NG, J. B.; HALL, D. A.; POSNER. B. I. The chemistry of peroxovanadium compounds relevant to insulin mimesis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 153, p. 5 - 15, 1995.

SHECHTER, Y.; KARLISH, S.J. Insulin-like stimulation of glucose oxidation in rat adipocytes by vanadyl (IV) ions. **Nature**, 284: 556 – 558, 1980.

SHECHTER, Y; GOLDWASER, I; MIRONCHIK M.; FRIDKIN, M.; GEFEL, D. Historic perspective and recent developments on the insulin-like actions of vanadium; toward developing vanadium-based drugs for diabetes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 237, p. 3 – 11; 2003.

SHISHEVA A.; IKONOMOV, O.; SHECHTER, Y. The protein tyrosine phosphatase inhibitor, pervanadate, is a powerful antidiabetic agent in streptozotocin-treated diabetic rats. **Endocrinology**, v. 134, p. 507 – 510, 1993.

SHISHEVA, A; SHECHTER, Y. Quercetin selectively inhibits insulin receptor function in vitro and the bioresponse of insulin and insulinomimetic agents in rat adipocytes. **Biochemistry**, v. 31, p. 8059 – 8063, 1992.

SREEKUMAR, R.; HALVATSIOTIS, P.; SCHIMKE, J. C.; NAIR, K. S. Gene expression profile in skeletal muscle of type 2 diabetes and the effect of insulin treatment. **Diabetes**, v. 51, p. 1913 – 1920, 2002.

STEPHENS, J. M.; PILCH, P. F. The metabolic regulation and vesicular transport of GLUT 4, the major insulin-responsive glucose transporter. **Endocrine Reviews**, v. 16, p. 529 – 546, 1995.

STROUT, H. V.; VICARIO, P. P.; BISWAS, C.; SAPERSTEIN, R.; BRADY, E. J.; PILCH, P.F.; BERGER, J. Vanadate treatment of streptozotocin diabetic rats restores expression of the insulin-responsive glucose transporter in skeletal muscle. **Endocrinology**, v. 126, p. 2728 – 2732, 1990.

THÉBERGE, J.; MEHDI, M. Z.; PANDEY, S. K.; SRIVASTAVA, A. K. Prolongation of insulin-induced activation of mitogen-activated protein kinases ERK 1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase by vanadyl sulfate, a protein tyrosine phosphatase inhibitor. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 420, p. 9 – 17, 2003.

THOMPSON, K. H.; ORVIG, C. Coordination chemistry of vanadium in metallopharmaceutical candidate compounds. **Coordination Chemistry Reviews**, v.219-221, p.1033 – 1053, 2001.

THOMPSON, K.H.; LEICHTER, J.; McNEILL, J. H. Studies of vanadyl sulfate as a glucose-lowering agent in STZ-diabetic rats. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 197, p. 1549 – 1555, 1993.

TOLMAN, E. L.; BARRIS, E.; BURNS, M.; PANSINI, A ; PARTRIDGE, R. Effects of vanadium on glucose metabolism in vitro. **Life Sciences**, v. 25, i. 13, p.1159–1164, 1979.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy Sciences USA.**, v. 76, p. 4350-54, 1979.

TRINDER, R. Determination of glucose in blood using glucose with alternative oxygen acceptor. **Ann Clin Biochem**, 6: 27-27, 1969.

TSIANI, E.; FANTUS, I. G. Multifunctional actions of vanadium compounds on insulin signaling pathways: Evidence for preferential enhancement of metabolic versus mitogenic effects. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 182, p. 109 – 119, 1998.

TSIANI, E.; FANTUS, I. G. Vanadium compounds: Biological actions and potential as pharmacological agents. **Trends in Endocrinology Metabolism**, v. 8, p. 51 - 58, 1997.]

UEKI, H.; SERA, M.; TANAKA, K. Stimulatory release of lipoprotein lipase activity from rat fat pads by vanadate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 272, p.18 – 24, 1989.

WANG, H.; SCOTT, R. E. Unique and selective mitogenic effects of vanadate on SV40 – transformed cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 153, p. 59 – 67, 1995.

WANG, J. YUEN, V. G.; McNEILL, J. H. Effect of vanadium on insulin sensitivity and appetite. **Metabolism**, v. 50, p. 667 – 673, 2001.

WANG, Y.; YU, B. Effect of peroxovanadate compound on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and lipid metabolism in diabetic rats. **Drugs Under Experimental and Clinical Research**, v. 23, p. 111 – 115, 1997.

WEI, M.; SMITH, M. T.; ROSS, F. B.; SHMID, K. HOEY, A. J.; BURSTOW, D.; BROWN, L. The streptozotocin-diabetic rat as a model of chronic complications of human diabetes. **Heart, lung and circulation**, v. 12, p. 44 - 50.

WHITE, M. F. The insulin signalling system and the IRS proteins. **Diabetologia**, v. 40, p. 2 - 17,1997.

WIJKANDER, J.; HOLST, L. S.; RAHN, T.; RESJO, S.; CASTAN, I.; NAGANIELLO, V.; BELFRAGE, P.; DEGERMAN, E. Regulation of protein kinase B in rat adipocytes by

insulin, vanadate, and peroxovanadate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 21520 – 21526, 1997.

WILSON, E. M.; HSIEH, M. M.; ROTWEIN, P. Autocrine growth factor signaling by Insulin-like /growth Factor-II mediates MyoD-stimulated myocyte maturation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 41109 – 41113, 2003.

WOJTASZEWSKI, J. F. P.; LYNAGE, J.; JAKOBSEN, A. B.; GOODYEAR, L. J.; RICHTER, E. A. Differential regulation of MAP kinase by contraction and insulin in skeletal muscle: metabolic implications. **American Journal of Physiology**, v. 277, p. E724 – E732, 1999.

YECHOOR, V. K.; PATTI, M.; SACCONI, R.; KAHN, C. R. Coordinated patterns of gene expression for substrate and energy metabolism in skeletal muscle of diabetic mice. **PNAS**, v. 99, p. 10587 – 10592, 2002.

YUEN, V. G.; ORVIG, C.; McNEILL, J. H. Effects of bis(maltolato)oxovanadium (IV) are distinct from food restriction in STZ-diabetic rats. **American Journal of Physiology**, v. 272, p. 30 – 35, 1997.

ZHANG, Z.; ZHOU, B.; XIE, L. Modulation of protein kinase signaling by protein phosphatases and inhibitors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 93, p. 307 – 317, 2002.

ZHOU, G. X.; MEIER, K. E.; BUSE, M. G. Sequential activation of two mitogen activated protein (MAP) kinase isoforms in rat skeletal muscle following insulin injection. **Biochemical and Biophysical research communications**, v. 197, p. 578 – 584, 1993.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G. M. M.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v. 414, p. 782 – 787, 2001.

