O Papel da Proteína Quinase C no Desenvolvimento das Complicações Vasculares do Diabetes Mellitus

Beatriz D. Schaan

RESUMO

A mortalidade dos pacientes com diabetes (DM) é maior do que a da população em geral e decorre especialmente das doenças cardiovasculares. Os prováveis mecanismos da aterosclerose acelerada nestes pacientes são os efeitos tóxicos diretos da glicose sobre a vasculatura, a resistência à insulina e a associação do DM a outros fatores de risco para doença cardiovascular. O principal determinante do dano tecidual causado pelo DM é a hiperglicemia, resultando em aumento de glicose intra-celular, aumento de diacilglicerol (DAG) e ativação da proteína quinase C (PKC). Esta revisão tem por objetivo compilar os efeitos da hiperglicemia sobre a via DAG-PKC, a disfunção vascular relacionada a ela, e, finalmente, as novas perspectivas de tratamento das complicações crônicas vasculares do DM baseadas na inibição desta via. (Arq Bras Endocrinol Metab 2003;47/6:654-662)

Descritores: Diabetes mellitus; Proteína quinase C; Doença cardiovascular; Complicações crônicas

ABSTRACT

Role of Protein Kinase C in the Development of Vascular Complications of Diabetes Mellitus.

Mortality of diabetic patients is higher than that of the population at large, and results mainly from cardiovascular diseases. The putative mechanisms for the progressive atherosclerosis these patients present are direct toxic effects of glucose upon vasculature, insulin resistance, and the association of diabetes (DM) with other cardiovascular risk factors. The main determinant of the tissue damage caused by DM is hyperglycemia, which results in high intra-cellular glucose, high diacylglycerol (DAG) and activation of protein kinase C (PKC). This review intends to compile the effects of hyperglycemia upon the DAG-PKC pathway, vascular dysfunction related to it, and new perspectives regarding treatment of vascular chronic complications of DM based in the inhibition of this pathway. (Arq Bras Endocrinol Metab 2003;47/6:654-662)

Keywords: Diabetes mellitus; Protein kinase C; Cardiovascular disease; Chronic complications

*Serviço de Medicina Experimental,
Unidade de Pesquisa do Instituto
de Cardiologia do Rio Grande do
Sul, Fundação Universitária de
Cardiologia (FUC),
Porto Alegre, RS.*

UMA EPIDEMIA DE DIABETES MELLITUS do tipo 2 (DM2) vem ocorrendo nos últimos anos, com tendência de crescimento na próxima década (1-3). As complicações do DM2, tanto micro como macrovasculares, emergem como uma das maiores ameaças à saúde em todo o mundo, com imensos custos econômicos e sociais (4).

A doença cardiovascular é responsável por até 80% das mortes em indivíduos com DM2. De fato, o risco relativo de morte por eventos cardiovasculares ajustado para a idade em diabéticos é 3 vezes maior do que o da população em geral (5). Estudo observacional recente demonstrou que o risco de morte por doença arterial coronariana em pacientes com

*Recebido em 06/05/03
Revisado em 04/07/03
Aceito em 06/07/03*

DM2 é semelhante àquele observado para indivíduos sem DM que tiveram um infarto agudo do miocárdio prévio (6).

As razões para a aterosclerose acelerada manifestada em pacientes com DM ainda não são completamente compreendidas, tendo sido sugeridos como mecanismos prováveis os efeitos tóxicos diretos da glicose sobre a vasculatura, a resistência à insulina e a associação do DM a outros fatores de risco (6). Os resultados de vários estudos, especialmente de 2 grandes ensaios clínicos recentes, em pacientes com DM1 (7) e DM2 (8), demonstrando a relação direta entre os níveis de hiperglicemia cronicamente mantida e as complicações micro e macrovasculares, suportam que a hiperglicemia é o fator determinante inicial principal na patogênese das complicações do DM. O aumento de glicose intra-celular é o principal determinante do dano tecidual causado pelo DM, dano este que pode ser reversível quando restaurada a condição de normoglicemia, ou irreversível, mesmo revertida a hiperglicemia, pois se originou de alterações cumulativas em macro-moléculas de vida longa (9).

A glicose, presente no compartimento extra-celular, é transportada para o compartimento intra-celular por difusão facilitada, mediante ação dos transportadores de glicose, especialmente GLUTs 1 e 4. Uma vez dentro da célula, a glicose é metabolizada por glicólise. Menos do que 5% da glicose intra-celular é metabolizada pela via da aldose-redutase, mesmo em condições de hiperglicemia, o que aumenta o fluxo da via do sorbitol, mudando seu potencial redox, e altera vias de transdução de sinais. É possível que a via comum pela qual a hiperglicemia estaria mediando seus efeitos adversos seja a alteração de vias de transdução de sinais, como é a ativação da via diacilglicerol (DAG)-proteína quinase C (PKC) (10). O GLUT 1 é superexpresso em condições de altas concentrações extra-celulares de glicose e hipóxia, e o aumento do fluxo glicolítico resulta em aumento da síntese de novo de DAG (11). Nas células vasculares, a ativação da via DAG-PKC pode alterar várias funções reconhecidamente alteradas no DM.

Vários mecanismos bioquímicos têm sido propostos para explicar anormalidades estruturais e funcionais associadas com a exposição prolongada dos tecidos vasculares à hiperglicemia, tais como: 1) Formação de produtos avançados da glicosilação não-enzimática; 2) Aumento da atividade da aldose-redutase, levando a alterações decorrentes do aumento de sorbitol e redução de mio-inositol; 3) Alterações de radicais livres e estado de oxidação; e 4) Ativação da PKC via acúmulo hiperglicemia-induzido de DAG (12). Não há uma hipótese que unifique estes 4 mecanismos, mas tanto alterações redox causadas pelo aumento do fluxo na via do sorbitol

como o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) hiperglicemia-induzido podem ser responsáveis por todas as outras alterações bioquímicas. Também o aumento de ROS pode reduzir os níveis de óxido nítrico (NO) e daí ativar a aldose redutase. O aumento do fluxo pela via dos polióis induzido pelo aumento de ROS determina maior conversão de glicose a sorbitol, o que acarreta concomitantemente redução de NADPH e glutatona, o que aumenta o estresse oxidativo hiperglicemia-induzido. O sorbitol é convertido a frutose, resultando em aumento da relação NADH:NAD⁺, o que aumentaria a síntese de novo de diacilglicerol, e daí ativação da PKC. Por fim, a formação de produtos avançados de glicosilação não enzimática (AGEs), induzida pela hiperglicemia crônica do DM, além de causar dano tecidual direto, também pode aumentar a formação de ROS (13).

Esta revisão tem por objetivo compilar os efeitos da hiperglicemia sobre a via DAG-PKC, a disfunção vascular relacionada a ela, e, finalmente, as novas perspectivas de tratamento das complicações vasculares do DM baseadas na inibição desta via.

O que é a proteína quinase C, suas características, suas funções

Adicionar e remover grupos fosfato é um mecanismo fisiológico importante na regulação de proteínas intra-celulares, as quais podem ser enzimas, receptores ou segundo-mensageiros. Uma série de respostas celulares mediadas por receptores e vias metabólicas podem ser ativadas e desativadas por quinases (enzimas que adicionam grupos fosfato) ou fosfatases (enzimas que removem grupos fosfato) intra-celulares. As quinases e as fosfatases, por sua vez, são reguladas por sinais bioquímicos extrínsecos, tais como hormônios e fatores de crescimento. As quinases celulares são divididas naquelas que fosforilam proteínas em resíduos tirosina (tirosina-quinases) e aquelas que fosforilam proteínas em resíduos serina e treonina (serina/treonina-quinases). A PKC é uma das 3 principais quinases serina-treonina. Ela está envolvida em eventos de transdução de sinais, respondendo a estímulos específicos hormonais, neuronais e de fatores de crescimento. Sua ação é catalisando a transferência de um grupo fosfato do ATP (adenosina tri-fosfato) a várias proteínas substrato. Da mesma forma, a PKC também sofre fosforilações antes de ser ativada, o que ocorre durante sua translocação do citosol para a membrana da célula. Sua ativação e translocação do citosol à membrana plasmática ocorre em resposta a aumento transitório de DAG ou exposição a agentes exógenos, conhecidos como forbol-ésteres (10).

A família PKC inclui 12 isoformas (α , β I, β II, δ , ϵ , γ , ι , η , λ , μ , θ , ζ), classificadas em convencionais (cPKC, cálcio-dependentes, ativadas pela fosfatidil-serina e pelo DAG); original (nPKC, cálcio-independentes, reguladas pelo DAG e fosfatidilserina) e atípicas (aPKC, cálcio-independentes, não requerem DAG para ativação, mas fosfatidil-serina para regular sua atividade). As isoformas são produtos de diferentes genes, exceto PKC β I e β II, que são variantes de um mesmo gene. Estas isoformas são distribuídas em vários tecidos, demonstrando diferenças de acordo com sua localização. Por exemplo, a PKC- β está presente nas ilhotas pancreáticas, monócitos, cérebro e tecidos vasculares (retina, rins e coração). Dentro de uma única célula, as isoformas também exibem diferenças em sua distribuição antes e após translocação após ativação. Sugere-se que funções de cada isoforma associadas a uma determinada célula podem ser conferidas por diferenças na localização sub-celular da PKC após translocação para proteínas específicas (14).

O DAG celular é o principal ativador fisiológico da PKC; deriva de múltiplas fontes, incluindo a hidrólise de fosfatidil-inositídeos, metabolismo da fosfatidil-colina por fosfolipases ou síntese de novo. Também é possível que a ativação da via DAG-PKC induzida pela hiperglicemia seja resultado de glico-oxidação, já que existem evidências de que alguns oxidantes, como H_2O_2 , podem ativar a PKC (13) (figura 1). Aumento do DAG e decorrente ativação da PKC têm

Figura 1. A liberação intracelular de diacilglicerol (DAG) é o primeiro passo que leva à ativação e translocação da PKC. O DAG celular, que é o ativador fisiológico da PKC, deriva de múltiplas fontes: hidrólise de fosfatidilinositídeos, metabolismo da fosfatidilcolina pela fosfolipase C ou D ou síntese de novo (principal via responsável pela formação de DAG hiperglicemia-induzida no diabetes).

sido descritos em tecidos de animais e humanos diabéticos, tais como retina, aorta, coração e glomérulo, mesmo quando o estímulo de hiperglicemia é agudo (15-17), assim como em células vasculares expostas a altas concentrações de glicose no meio de cultura (18).

A hiperglicemia, elevando DAG de diferentes formas, preferencialmente ativa uma ou mais isoenzimas PKC em diferentes tecidos, por exemplo, PKC- β II no coração e aorta (15), PKC- α , PKC- β II e PKC- ϵ na retina (16), PKC- α , β I e δ nas células glomerulares (19). É interessante observar que a ativação da PKC- β II é a resposta dominante nos tecidos macrovasculares, o que inclui tecido muscular liso e células endoteliais da retina, enquanto que a PKC- β I é predominantemente superexpressa nas células glomerulares em resposta à hiperglicemia (12).

Mecanismos pelos quais a ativação da via DAG-PKC estaria envolvida na gênese das complicações vasculares do diabetes

A ativação da PKC regula uma série de funções vasculares, tais como permeabilidade vascular (20), contratilidade (21), proliferação celular (22), síntese de matriz extracelular (23) e transdução de sinais para várias citocinas e hormônios (24) (figura 2). Como as patologias vasculares do DM caracterizam-se pelas alterações descritas, tem sido especulado um papel patogênico da ativação da PKC sobre estas vasculopatias.

Figura 2. Representação esquemática das anormalidades estruturais e funcionais decorrentes da ativação da via DAG-PKC hiperglicemia-induzida. Algumas destas anormalidades podem ser melhoradas pelo tratamento com vitamina E (ativador da DAG-quinase; anti-oxidante), inibidores específicos da PKC (LY333531) ou inibidores da glicação de proteínas (aminoguanidina).

DAG: diacilglicerol; PKC: proteína quinase C; TGF- β : fator transformador do crescimento-beta; MEC: matriz extracelular; PAI-1: inibidor do ativador do plasminogênio 1; ICAMs: moléculas de adesão intra-celular; VEGF: fator de crescimento vascular derivado do endotélio; ANP: peptídeo natriurético atrial; NF- κ B: fator nuclear κ B; ET-1: endotelina 1; NO: óxido nítrico.

Espessamento da membrana basal capilar e expansão da matriz extracelular

São anormalidades estruturais precoces que ocorrem em vários tecidos, inclusive vasculares no DM (25). Como a membrana basal pode afetar inúmeras funções, como suporte estrutural, permeabilidade vascular, adesão celular, proliferação, diferenciação e expressão de genes, alterações de seus componentes podem causar disfunção celular (12).

A hiperglicemia do DM aumenta a expressão de mRNA de colágeno tipo IV, fibronectina e laminina nos grandes vasos (26) e de colágeno tipo VI no miocárdio (27). Estas alterações podem levar ao enrijecimento do músculo cardíaco, contribuindo para a miocardiopatia diabética.

A expansão de matriz mesangial glomerular e o espessamento da membrana basal dos capilares glomerulares são manifestações precoces clássicas da nefropatia diabética. Histologicamente, observa-se aumento do colágeno tipo IV e VI e fibronectina e redução de proteoglicanos no mesângio. A célula mesangial glomerular é a responsável pela maior expressão da matriz extracelular. Estudos *in vitro* utilizando células mesangiais cultivadas em meios com alto teor de glicose demonstraram maior expressão de mRNA e síntese protéica de colágeno tipo IV e fibronectina (18), alterações que são mediadas pela ativação da PKC (28).

O aumento de expressão de TGF- β 1 citocina, que estimula a produção de componentes da matriz extra-celular, tem sido implicado no desenvolvimento da expansão mesangial e espessamento da membrana basal no DM (29). Considerando que a ativação da PKC pode aumentar a expressão de TGF- β 1 e a produção de matriz extra-celular, são de interesse os relatos de que os inibidores da PKC podem também prevenir aumentos de TGF- β 1 e matriz extra-celular induzidos pela hiperglicemia em células mesangiais e glomérulos (30). A glicose entra para o interior da maioria das células, inclusive as mesangiais, por difusão facilitada. Este processo é mediado por proteínas integrais de membrana específicas, os transportadores de glicose (GLUTs) (31). Estudos com células mesangiais *in vitro* demonstraram maior expressão de GLUT1 em meios com alto teor de glicose, levando à maior atividade da PKC e conseqüente estímulo à síntese de proteínas da matriz extracelular (32). Nosso grupo demonstrou recentemente, no modelo de DM por STZ em ratos, maior expressão de GLUT1 em córtex renal, associado à maior excreção urinária de TGF- β 1 e microalbuminúria, o que sugere que, *in vivo*, o TGF- β 1 também age, assim como *in vitro* foi demonstrado, aumentando a expressão de GLUT1, o que amplificaria

os efeitos deletérios teciduais da hiperglicemia (33). Subseqüentemente, estudamos estas variáveis no modelo animal de hipertensão geneticamente determinada (ratos SHR), com diabetes por STZ e os resultados foram semelhantes, além de observar um efeito aditivo da hipertensão sobre a hiperglicemia em aumentar a excreção urinária de TGF- β 1 (34).

Fluxo sanguíneo vascular

Anormalidades de fluxo sanguíneo e contratilidade vasculares têm sido relatadas em animais e pacientes diabéticos, em retina, rins, artérias periféricas e microvasculatura de nervos periféricos.

Redução do fluxo retiniano no DM foi demonstrada por Bursell e cols., em 1996 (35), e Small e cols., em 1987 (36). Além disto, os ésteres do forbol, que são agonistas da PKC, reduzem o fluxo sanguíneo retiniano, enquanto que os inibidores da PKC normalizam este fluxo, sugerindo que a ativação da PKC teria um papel regulador sobre o fluxo sanguíneo retiniano, possivelmente por ação vasoconstrictora ou aumentando a expressão de endotelina-1 (16,37).

No rim, aumento da taxa de filtração glomerular é uma característica da fase inicial da nefropatia diabética, o que pode relacionar-se à redução da resistência arteriolar induzida pela hiperglicemia e poderia se dever à maior produção de prostaglandinas (38), efeito mediado pela ativação da PKC (39). Não se descarta que a PKC tenha papel regulador sobre a hemodinâmica renal através de interferência sobre a produção de NO (40).

A neuropatia diabética caracteriza-se por diminuição da velocidade de condução nervosa e menor regeneração neuronal, em cuja gênese têm sido implicados efeitos metabólicos da hiperglicemia associados à redução de fluxo sanguíneo ao nervo (41). Como o aumento da atividade da PKC nos *vasa nervorum* leva à maior resposta contrátil e redução da vasodilatação, foram realizados estudos utilizando inibidores da PKC, os quais demonstraram efeito positivo sobre a condução nervosa, o que se atribuiu à melhora do fluxo sanguíneo aos nervos (42,43).

Contratilidade do músculo liso vascular

Há uma maior resposta contrátil do músculo liso vascular no DM, o que é atribuído parcialmente à ativação da PKC pela hiperglicemia. A normalização da glicemia restaura a resposta contrátil do músculo liso vascular. Um estudo demonstrou que, em contraste com o aumento de contratilidade do músculo liso vascular em resposta a estímulos pressóricos, o estímulo da hiperglicemia acarreta alterações mais sustentadas (44).

Permeabilidade vascular e neovascularização

Uma característica precoce da disfunção vascular do DM, especialmente em vasos da retina e rim, é a maior permeabilidade vascular a macromoléculas circulantes (25). A ativação da PKC aumenta a permeabilidade à albumina e outras moléculas diretamente através de efeito sobre as barreiras formadas por células endoteliais, provavelmente por levar à fosforilação de proteínas cito-esqueléticas que formam as junções intracelulares (45).

A ativação da PKC pode regular a permeabilidade vascular e também a neovascularização via expressão de fatores de crescimento, como o VEGF (*vascular permeability factor*), implicado nos processos de neovascularização na retinopatia diabética (46) e em células musculares lisas da aorta (47).

Ativação e disfunção endotelial

O endotélio normal tem papel chave na regulação do tônus vascular pela produção e liberação de fatores de relaxamento e contração, de forma que a disfunção endotelial é um marcador precoce de disfunção vascular. A ativação da PKC diminui a síntese de NO, enquanto que a inibição da PKC aumenta sua liberação. Estudo recente em humanos submetidos a um clampé hiperglicêmico por 6 horas demonstrou que o fluxo sanguíneo do antebraço em resposta à metacolina está reduzido na hiperglicemia, o que é corrigido após o tratamento oral com inibidores da PKC- β . Estes resultados sugerem que a hiperglicemia prejudica a função endotelial, em parte via ativação da PKC- β (48).

A endotelina-1 (ET-1), potente vasoconstritor, também é sintetizada pelo endotélio. Seu aumento tem sido associado a menor fluxo sanguíneo na retina e nervos periféricos de modelos animais de DM. Estes aumentos têm sido atribuídos à aumento da atividade da PKC, isoformas β e δ , mediada pela hiperglicemia (37).

A exposição de plaquetas humanas a altas concentrações de glicose *in vitro* ou *in vivo* diminui sua capacidade de causar vasodilatação endotélio-dependente. Este fenômeno é mediado por aumento de níveis de DAG e estímulo da PKC e atividade da fosfolipase A2, conforme resultados obtidos *in vitro* recentemente por Oskarsson e cols. (49).

Adesão de monócitos

A adesão de monócitos às células endoteliais é um evento precoce importante na formação de ateroma, e que está aumentado no DM. Foi demonstrado aumento da atividade da PKC em monócitos de indivíduos com DM, a qual foi reduzida em 40% com a normali-

zação da glicemia. Como a maior atividade da PKC aumenta a adesão dos monócitos à parede vascular, aumenta a ligação do fibrinogênio e promove sua diferenciação a macrófagos, espera-se, nesta circunstância, progressão dos ateromas (50).

Proliferação de células musculares lisas

Células musculares lisas cultivadas em meios com altas concentrações de glicose apresentam maior atividade da PKC e atividades proliferativas, comparativamente a células cultivadas em meios com concentrações baixas de glicose. Tanto inibidores da aldose-redutase, como da PKC- β , impedem estas alterações (51).

Miocardiopatia

Utilizando camundongos transgênicos que superexpressam especificamente a isoforma β II da PKC no miocárdio, Wakasaki e cols., em 1997 (52), demonstraram que estes animais apresentavam, comparativamente à espécie nativa, hipertrofia ventricular esquerda, necrose de cardiomiócitos, fibrose multifocal e redução da função ventricular esquerda.

O estudo de corações humanos que apresentavam miocardiopatia dilatada ou isquêmica por outros autores demonstrou aumento de 40% na expressão de PKC- β 1 e β 2 de membranas celulares (53).

Atividade da Na-K-ATPase

A Na-K-ATPase é um componente da bomba de sódio que está envolvida na manutenção de funções celulares, tais como integridade, contratilidade, crescimento e diferenciação. Os mecanismos pelos quais a hiperglicemia altera a atividade da Na-K-ATPase têm sido discutidos. A PKC pode regular os níveis de Na-K-ATPase em alguns tecidos pela fosforilação/defosforilação de sua sub-unidade alfa e agir estimulando ou inibindo sua atividade, dependendo do sistema estudado (54).

Possibilidades terapêuticas

Inibidores da PKC- β

A inibição de todas as isoformas da PKC através de inibidores inespecíficos provou-se impraticável pela sua toxicidade. Como os estudos em retina, rins e tecidos vasculares de diabéticos demonstraram que a isoforma preferentemente ativada é a β , um inibidor específico desta isoforma, o LY333551 foi desenvolvido e tem sido testado com resultados interessantes.

Estudos *in vitro* demonstraram que seu uso reduz a atividade da PKC β II, mas não da PKC α , reduzindo o DAG nos tecidos vasculares estudados. O

mesmo estudo comprovou sua efetividade *in vivo*, demonstrando melhora da hemodinâmica retiniana e renal em ratos com DM (19). Estes inibidores também preveniram a superexpressão de TGF- β , colágeno α 1 e fibronectina em glomérulos de ratos diabéticos, eventos que sabidamente estão envolvidos na gênese da nefropatia diabética (55). Ainda no modelo animal de DM, outros autores demonstraram que o LY333551 determinou normalização de fluxo sanguíneo neuronal e velocidade de condução nervosa (43).

O tratamento de camundongos transgênicos que superexpressam a PKC β II com LY333551 oral resulta em melhora das alterações histológicas e funcionais cardíacas descritas neste modelo animal (52).

Por outro lado, o efeito do LY333551 sobre a atividade proliferativa de células musculares lisas em meios de cultura com alto teor de glicose foi inferior àquele obtido com o uso de epalrestat, inibidor da via da aldose-redutase, mesmo que ambos tenham-se demonstrado efetivos na inibição da PKC isoforma β II (51).

O uso de LY333531 oral (*ruboxistaurin mesylate*) em humanos demonstrou que a droga foi bem tolerada em doses de até 64mg/dia, não se associando a efeitos adversos significativos (56,57). Os resultados obtidos em 252 pacientes com diabetes e retinopatia de base tratados com o LY333531 ou placebo por 36-48 meses demonstraram menor progressão da retinopatia sem alterações no controle glicêmico nos indivíduos tratados (redução de 32% no risco de progressão) (56). O tratamento de 205 pacientes com neuropatia diabética periférica com 32 e 64mg/dia da mesma droga foi efetivo em reduzir os sintomas referentes a esta complicação, os quais são freqüentemente incapacitantes (57). Estudos de fase III estão em andamento para indicações de retinopatia e neuropatia diabéticas com lançamento previsto para 2005/2006.

É importante considerar possíveis efeitos deletérios a longo prazo com o uso destas drogas, já que a PKC- β é expressa no cérebro, além de nos tecidos vasculares (58). No tratamento propriamente dito de indivíduos diabéticos, o uso dos inibidores da PKC- β provavelmente será empregado cronicamente, o que não tem precedentes nos estudos apresentados.

Vitamina E

Com o conhecimento de que o DM acompanha-se de aumento do estresse oxidativo, a vitamina E, um antioxidante, tem sido estudada, com interesse adicional por inibir a ativação de DAG-PKC em tecidos vasculares e células vasculares cultivadas em meios com alto teor de glicose. O mecanismo envolvido neste efeito provavelmente decorre de efeito inibidor da vitamina

E sobre a via da PKC através de sua capacidade em aumentar a atividade da DAG-quinase, portanto, aumentando seu metabolismo a ácido fosfatídico e levando à redução do DAG, e conseqüentemente da ativação da PKC (59).

Injeções intra-peritoneais de vitamina E preveniram aumentos da atividade de DAG e PKC na retina (60), aorta, coração (61) e glomérulos renais (62) de ratos diabéticos. Funcionalmente, na retina e rins há prevenção das alterações hemodinâmicas pelo uso da vitamina E, em paralelo com a inibição da ativação da DAG-PKC. Também o aumento da albuminúria foi prevenido pelo uso de vitamina E nestes animais (63). Portanto, é possível que algum aumento da ativação de PKC no diabetes pode ser resultado de oxidantes em excesso, que sabidamente ativam a PKC e podem ser gerados na hiperglicemia.

Inibidores da HMG-CoA redutase

Evidências de que os inibidores da HMG-CoA redutase diminuem a migração de células musculares lisas vasculares *in vitro* e *in vivo* levaram a estudos onde foi demonstrado que estes efeitos se dão diretamente sobre a parede vascular por mecanismos via supressão do aumento do estresse oxidativo induzido pela fosfolipase D e PKC (63). É possível que parte dos efeitos na prevenção da doença arterial coronariana obtidos com o emprego destas drogas se devam a estes efeitos.

Inibidores da enzima conversora

Aos já conhecidos efeitos benéficos dos inibidores da enzima conversora no DM somam-se os resultados de estudo experimental utilizando ramipril, o qual foi efetivo em prevenir o aumento da PKC induzido pelo DM por estreptozotocina na retina, glomérulos e artéria mesentérica, sugerindo que aqueles efeitos benéficos possam ser, pelo menos em parte, mediados pela inibição da PKC em vários tecidos (64).

Considerações finais

A hiperglicemia ativa a via da DAG-PKC. Os fatores iniciantes deste processo são metabólicos, e o principal elemento é a hiperglicemia. O achado de que metabólitos secundários da glicose, como produtos glicosilados e oxidantes, podem também ativar a via DAG-PKC sugerem que esta ativação pode ser o mecanismo comum pelo qual múltiplos co-produtos da glicose exercem seus efeitos colaterais. Não é surpresa que a via DAG-PKC sirva para este papel, porque é uma via de transdução de sinais que sabidamente regula muitas funções e ações vasculares. Nos tecidos vasculares, a isoforma PKC- β parece ser o mediador principal de

alterações na proliferação celular, função endotelial, permeabilidade microvascular e formação de colágeno.

A inibição da via DAG-PKC, quer seja através do uso de inibidores da PKC, seletivos para as diferentes isoformas, quer seja pelo uso de vitamina E, aumentando a degradação de DAG e outras drogas de uso mais recente, têm, portanto, potencial promissor na prevenção das complicações vasculares do DM, inovando no tratamento das complicações do DM independente do controle glicêmico. Estudos de longa duração em humanos são necessários para reforçar a utilidade destas drogas como mais uma ferramenta na terapêutica do DM.

REFERÊNCIAS

1. Newham A, Ryan R. Prevalence of diagnosed diabetes mellitus in general practice in England and Wales, 1994 to 1998. *Health Stat Quart* 2002;14:5-13.
2. Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Nelson DE, Engelgau MM, Vinicor F, et al. Diabetes trends in the U.S.: 1990-1998. *Diabetes Care* 2000;23:1278-83.
3. Schaan BD, Harzheim E, Lima NGL, Gus I. Fatores de risco para doença arterial coronariana em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose no Rio Grande do Sul (RS). *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002;46(supl.1):S394.
4. Gray A, Clarke P, Farmer A, Holman R. Implementing intensive control of blood glucose concentration and blood pressure in type 2 diabetes in England: cost analysis (UKPDS 63). *BMJ* 2002;325:860-5.
5. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 1993;16:434-44.
6. Haffner SM, Lehto S, Ronnemaa T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998;339:229-34.
7. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;329:977-86.
8. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998;352:837-53.
9. Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee M. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int Suppl* 2000;58:S26-S30.
10. Idris I, Gray S, Donnelly. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia* 2001;44:659-73.
11. Kaiser N, Sasson S, Feener EP, Boukobza-Vardi N, Higashi S, Moller DE, et al. Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Diabetes* 1993;42:80-9.
12. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 1998;47:859-66.
13. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813-20.
14. Newton AC. Protein kinase C: structure, function and regulation: minireview. *J Biol Chem* 1995;270:28495-8.
15. Inoguchi T, Battan R, Handler E, Sportsman JR, Hezth W, King GL. Preferential elevation of protein kinase C isoform β II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:11059-63.
16. Shiba T, Inoguchi T, Sportsman JR, Heath W, Bursell S, King GL. Correlation of diacylglycerol and protein kinase C activity in rat retina to retinal circulation. *Am J Physiol* 1993;265:E783-E793.
17. Craven PA, DeRubertis FR. Protein kinase C is activated in glomeruli from streptozotocin diabetic rats. *J Clin Invest* 1989;83:1667-75.
18. Ayo SH, Radnik R, Garoni JA, Troyer DA, Kreisberg JL. High glucose increases diacylglycerol mass and activates protein kinase C in mesangial cell cultures. *Am J Physiol* 1991;261:F571-F577.
19. Ishii H, Jirousek MR, Koya D, Takagi C, Xia P, Clermont A, et al. Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC β inhibitor. *Science* 1996;272:728-31.
20. Lynch JJ, Ferro TJ, Blumenstock FA, Brockenauer AM, Malik AM. Increased endothelial albumin permeability mediated by protein kinase C activation. *J Clin Invest* 1990;85:1991-8.
21. Rasmussen H, Forder J, Kojuma I, Scriabine A. TPA-induced contraction of isolated rabbit vascular smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;122:776-84.
22. Kariya K, Kawahara Y, Tsuda T, Fukuzaki H, Takai Y. Possible involvement of protein kinase C in platelet-derived growth factor-stimulated DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1987;63:251-5.
23. Huhtala P, Chow LT, Tryggvason K. Structure of the human type IV collagen gene. *J Biol Chem* 1990;265:11077-82.
24. Hachiya HL, Takayama S, White MF, King GL. Regulation of insulin receptor internalization in vascular endothelial cells by insulin and phorbol esters. *J Biol Chem* 1987;262:6417-24.
25. Williamson JR, Kilo C. Extracellular matrix changes in diabetes mellitus. In: Scarpelli DG, Migahi G, editors. *Comparative pathobiology of major age-related diseases*. New York: Liss; 1984.p.269-88.
26. Cagliero E, Roth T, Roy S, Maiello M, Lorenzi M. Expression of genes related to extracellular matrix in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1991;266:14244-250.
27. Spiro MJ, Crowley TJ. Increased rat myocardial type VI collagen in diabetes mellitus and hypertension. *Diabetologia* 1993;36:93-8.

28. Studer RK, Craven PA, DeRubertis F. Role for protein kinase C in the mediation of increased fibronectin accumulation by mesangial cells grown in high-glucose medium. **Diabetes** 1993;42:118-26.
29. Bertoluci MC, Schmid H, Lachat JJ, Coimbra TM. Transforming growth factor-beta in the development of rat diabetic nephropathy. **Nephron** 1996;74:189-96.
30. Murphy M, Godson C, Cannon S, Kato S, Mackenzie HS, Martin F, et al. Suppression subtractive hybridization identifies high glucose levels as a stimulus for expression of connective tissue growth factor and other genes in human mesangial cells. **J Biol Chem** 1999;274:5830-4.
31. Gould GW, Holman GD. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. **Biochem J** 1993;295:329-41.
32. Henry DN, Busik JV, Brosius F, Heilig CW. Glucose transporters control gene expression of aldose reductase, PKC α and GLUT1 in mesangial cells *in vitro*. **Am J Physiol** 1999;46:F97-F104.
33. Schaan B, Bertoluci M, Lacchini S, Machado U, Irigoyen MC, Schmid H. Increased renal GLUT1 abundance, albuminuria and urinary TGF- β 1 in STZ-induced diabetic rats: Implications for the development of diabetic nephropathy (DN). **Horm Metab Res** 2001;33:1-6.
34. Schaan B, Oliveira F, Lima NG, Passaglia J, Hermes E, Sauer F, et al. Efeito da hipertensão arterial (HAS) sobre o TGF- β 1 urinário na nefropatia diabética experimental (NDE). **Arq Bras Endocrinol Metab** 2002;46(supl.1):S370.
35. Bursell SE, Clermont AC, Kinsley BT, Simonson DC, Aiello LM, Wolpert HA. Retinal blood flow changes in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and no diabetic retinopathy. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 1996;37:886-97.
36. Small KW, Stefansson E, Hatcehl D. Retinal blood flow in normal and diabetic dogs. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 1987;28:672-5.
37. Park JY, Takahara N, Gabriele A, Chou E, Naruse K, Suzuma K, et al. Induction of endothelin-1 expression by glucose: an effect of protein kinase C activation. **Diabetes** 2000;49:1239-48.
38. Craven PA, Caines MA, DeRubertis FR. Sequential alterations in glomerular prostaglandin and thromboxane synthesis in diabetic rats: relationship to the hyperfiltration of early diabetes. **Metabolism** 1987;36:95-103.
39. Lin L-L, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ. cPLA $_2$ is phosphorylated and activated by MAP kinase. **Cell** 1993;72:269-78.
40. Sharma K, Danoff TM, DePiero A, Ziyadeh FN. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages and glomerular mesangial cells by elevated glucose levels: possible mediation via protein kinase C. **Biochem Biophys Res Commun** 1995;207:80-8.
41. Feldman E, Stevens MJ, Greene DA. Pathogenesis of diabetic neuropathy. **Clin Neurosci** 1997;4:365-70.
42. Cameron NE, Cotter MA, Jack AM, Basso MD, Hohman TC. Protein kinase C effects on nerve function, perfusion, Na(+), K(+)-ATPase activity and glutathione content in diabetic rats. **Diabetologia** 1999;42:1120-30.
43. Nakamura J, Kato K, Hamada Y, Nakayama M, Chaya S, Nakashima E, et al. A protein kinase C-beta-selective inhibitor ameliorates neural dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes** 1999;48:2090-5.
44. Williams B. Glucose-induced vascular smooth muscle dysfunction: the role of protein kinase C. **J Hyperten** 1995;13:477-86.
45. Stasek JE Jr, Patterson CE, Garcia JG. Protein kinase C phosphorylates caldesmon 77 and vimentin and enhances albumin permeability across cultured bovine pulmonary artery endothelial cell monolayers. **J Cell Physiol** 1992;153:62-75.
46. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid in patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. **N Engl J Med** 1994;331:1480-7.
47. Xia P, Aiello LP, Ishii H, Jiang ZY, Park DJ, Robinson GS, et al. Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial growth. **J Clin Invest** 1996;98:2018-26.
48. Beckman JA, Goldfinch AB, Gordon MB, Garrett LA, Creager MA. Inhibition of protein kinase C β prevents impaired endothelium-dependent. **Circ Res** 2002;90:107-11.
49. Oskarsson HJ, Hofmeyer TG, Coppey L, Yorek MA. Effect of protein kinase C and phospholipase A2 inhibitors on the impaired ability of human diabetic platelets to cause vasodilation. **Br J Pharmacol** 1999;127:903-8.
50. Ceolotto G, Gallo A, Miola M, Sartori M, Trevisan R, Del Prato S, et al. Protein kinase C activity is acutely regulated by plasma glucose concentration in human monocytes *in vivo*. **Diabetes** 1999;48:1316-22.
51. Nakamura J, Kasuya Y, Hamada Y, Nakashima E, Naruse K, Yasuda Y, et al. Glucose-induced hyperproliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells through polyol pathway hyperactivity. **Diabetologia** 2001;44:480-7.
52. Wakasaki H, Koya D, Schoen FJ, Jirousek MR, Ways DK, Hoyt BD, et al. Targeted overexpression of protein kinase C β 2 isoform in myocardium causes cardiomyopathy. **Proc Natl Acad Sci USA** 1997;94:9320-35.
53. Bowling N, Walsh RA, Song G, Estridge T, Sandusky GE, Fouts RL, et al. Increase protein kinase C activity and expression of Ca $^{2+}$ -sensitive isoforms in the failing human heart. **Circulation** 1999;99:384-91.
54. Greene DA, Lattimer SA, Sima AA. Sorbitol, phosphoinositides, and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. **N Engl J Med** 1987;316:599-606.
55. Koya D, Jirousek MR, Lin YW, Ishii H, Kuboki K, King GL. Characteristics of protein kinase C β isoform activation on the gene expression of transforming growth factor β , extracellular matrix components and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. **J Clin Invest** 1997;100:115-26.
56. Milton RC, Aiello LP, Davies MD, Sheetz MJ, Arora V, Vignati L, and the PKC-DRS Study Group. Initial results of the protein kinase C β inhibitor diabetic retinopathy study (PKC-DRS). **Diabetes** 2003;52:A127.
57. Bastyr III EJ, Price KL, Skljarevski V, Lledo A, Vignati L. Ruboxistaurin (RBX) mesylate treatment in patients with diabetic peripheral neuropathy (DPN) improves clinical global impression (CGI) and correlates with change in patient symptoms and signs. **Diabetes** 2003;52:A191.

58. Gutterman DD. Vascular dysfunction in hyperglycemia: Is protein kinase C the culprit? **Circ Res** 2002;90:5-7.
59. Lee IK, Koya D, Ishii H, Kanoh H, King GL. D-alpha-tocopherol prevents the hyperglycemia induced activation of diacylglycerol(DAG)-protein kinase C pathway in vascular smooth muscle cell by an increase of DAG kinase activity. **Diabetes Res Clin Pract** 1999;45:183-90.
60. Kunisaki M, Bursell SE, Clermont AC, Ishii H, Ballas LM, Jirousek MR, et al. Vitamin E prevents diabetes-induced abnormal retinal blood flow via the diacylglycerol-protein kinase C pathway. **Am J Physiol** 1995;269:E239-E246.
61. Kunisaki M, Fumio U, Nawata H, King GL. Vitamin E normalises diacylglycerol-protein kinase C activation induced by hyperglycemia in rat vascular tissues. **Diabetes** 1996;45/3:S117-S119.
62. Koya D, Lee IK, Ishii H, Kanoh H, King GL. Prevention of glomerular dysfunction in diabetes by treatment with d-alpha-tocopherol. **J Am Soc Nephrol** 1997;8:426-35.
63. Yasunari K, Maeda K, Minami M, Yoshikawa J. HMG-CoA reductase inhibitors prevent migration of human coronary smooth muscle cells through suppression of increase in oxidative stress. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2001;21:937-42.
64. Osicka TM, Yu Y, Lee V, Panagiotopoulos S, Kemp BE, Jerums G. Aminoguanidine and ramipril prevents diabetes-induced increases in protein kinase C activity in glomeruli, retina and mesentery artery. **Clin Sci (Lond)** 2001;100:249-57.

Endereço para correspondência:

Beatriz D. Schaan
Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul -
Unidade de Pesquisa
Av. Princesa Isabel, 370
90620-001 Porto Alegre, RS
Fax: (051) 3230-3600 ramal 3877/3927
e.mail: pesquisa@cardnet.tche.br