

Estabilidade na Função Cardíaca na Resistência à Insulina Induzida pela Dexametasona

Stability in Cardiac Function in Insulin Resistance Induced by Dexamethasone

Vitor Alexandre Pezolato^{a*}; Marcos Fabio de Abreu^a; Patrícia Carla Paulino^b; Carlos Alberto da Silva^a

^aUniversidade Metodista de Piracicaba, Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, SP, Brasil

^bUniversidade Metodista de Piracicaba, Laboratório de Fisiologia, SP, Brasil

*E-mail: vitor.pezolato@gmail.com

Recebido: 28 de janeiro de 2014; Aceito: 08 de abril de 2014

Resumo

Conhecidamente, o glicocorticoide dexametasona (dexa) promove alterações na responsividade insulínica, induzindo o quadro de miopatia, condição que compromete o equilíbrio metabólico e funcional da musculatura. O propósito deste estudo foi verificar se a resistência à insulina, induzida pelo glicocorticoide, interfere nas reservas glicogênicas ventriculares ou em parâmetros eletrocardiográficos. Ratos *Wistar* com três a quatro meses de idade foram divididos em dois grupos: controle e resistentes à insulina através do tratamento com (dexa) (1mg/Kg). Após cinco dias, os animais foram submetidos à avaliação de peso, glicemia, sensibilidade tecidual à insulina (KITT), concentração do glicogênio muscular no sóleo, gastrocnêmio porção branca e ventrículo, além da análise eletrocardiográfica. Para análise estatística, foram usados os testes de *Kolmogorov-Smirnov* e *Tukey*, $p < 0,05$. O grupo (dexa) apresentou redução de 15% do peso corporal e glicemia 165% maior do que o controle. Em relação à sensibilidade tecidual à insulina, o grupo (dexa) apresentou constante de decaimento 54% menor, representado por $2,35 \pm 0,1\%/min.$, sendo que, no controle, esse valor foi de $5,13 \pm 0,2\%/min.$ As reservas glicogênicas foram reduzidas devido ao tratamento com o glicocorticoide, atingindo valores 43% menores no sóleo e 68% no gastrocnêmico, enquanto no ventrículo não sofreram alteração. Na avaliação eletrocardiográfica, houve uma redução de 13% na frequência cardíaca e um aumento de 15,7% no intervalo QTc do grupo tratado. O estudo mostra que o coração é um órgão protegido das alterações impostas pela resistência insulínica e não sofre as consequências descritas nos demais tecidos alvo da insulina.

Palavras chave: Dexametasona. Eletrocardiografia. Ratos.

Abstract

Dexamethasone is a glucocorticoid that induces a reduction in insulin sensibility and provides insulin resistance called myopathy, leading to metabolic and functional changes. The purpose of this study was to evaluate if the insulin resistance induced by the dexamethasone interferes into the ventricular glycogen reserves or in electrocardiographic patterns. Wistar rats aged three or four months were divided into two groups: control, and insulin-resistant induced by dexamethasone (dexa, 1mg/kg). After five days, the animals were subjected to plasmatic glucose evaluation, weight and tissue sensitivity to insulin (ITT) evaluations, as well the glycogen reserves in soleus and gastrocnemius skeletal muscle and ventricle, besides an electrocardiography study. Kolmogorov-Smirnov and Tukey's test $p < 0.05$ were used for statistical analysis. The dexamethasone group showed a loss of body weight (15%), and a 165% rise in glycaemia. In insulin sensibility test, the group dexa showed a decrease of 54% in uptake constant, representing through $2.35 \pm 0.1\%/min$ in dexa group, and $5.13 \pm 0.2\%/min$ in control. The dexa treatment induced a reduction in glycogen reserves, with 43% reduction in soleus and 68% in the gastrocnemius muscle, with no changes in ventricle. The electrocardiographic evaluation showed 13% reduction in the cardiac frequency, and a 15.7% rise in the QTc gap in dexa group. This study showed that heart is a protected organ from alterations induced by the insulin resistance, and does not suffer the consequences observed in other insulin-sensitive tissues.

Keywords: Dexamethasone. Electrocardiography. Rats.

1 Introdução

As ações teciduais da insulina iniciam-se pela ligação do hormônio a seu receptor na membrana plasmática^{1,2}. Por ter caráter multifatorial, a sinalização insulínica decorre da ativação de uma cascata intracelular que converge no sentido de ativar substratos intracelulares, denominados IRS³. Dentre os substratos insulínicos, o IRS-1 pode ser considerado uma molécula “ancoradouro”, direcionando as ações insulínicas em tecidos insulino-sensíveis, tais como o fígado e músculo^{4,5}.

Estudos da integração funcional entre o receptor de insulina e a captação celular de glicose permitiram o conhecimento de

uma família de transportadores com distribuição diferenciada entre os tecidos e denominadas GLUT, cuja proteína GLUT 4 tem atividade regulada pela insulina ou em decorrência da contração muscular, sendo expressa em tecidos periféricos sensíveis à insulina como tecido adiposo, coração e músculo esquelético⁶⁻⁸.

A resistência periférica à insulina é um quadro clínico determinado por diferentes fatores como: obesidade, diabetes mellitus, inatividade física ou ainda, devido à ação de glicocorticoides^{9,10}. Neste contexto, sabe-se que a hipercortisolemia está associada com a redução na eficiência

da via pós-receptor da insulina, diminuindo o transporte e a utilização da hexose, redução na proteogênese e aumento na proteólise¹¹.

Muitos estudos levantaram a hipótese dos glicocorticoides promoverem alterações na secreção de insulina, uma vez que seus efeitos sobre a síntese de glicogênio não são observados em animais diabéticos. Neste sentido, recentemente foi demonstrado que o tratamento com dexametasona elevou a secreção de insulina em ilhotas isoladas de ratos¹²⁻¹⁴.

O glicocorticoide sintético dexametasona tem sido amplamente utilizado, devido sua baixa atividade mineralocorticoide, ação prolongada e facilidade de administração. Neste sentido, têm-se observado inúmeros efeitos metabólicos ligados ao tratamento com o glicocorticoide, merecendo destacar a glicogenólise hepática, lipólise e, em especial, o antagonismo na via pós-receptor da insulina concomitante à elevação na atividade proteolítica do tecido muscular, promovendo fraqueza e atrofia muscular¹⁵.

Pacientes tratados com glicocorticoides apresentam alterações na homeostasia energética do organismo, desenvolvendo o quadro clínico denominado “miopatia por esteróide”, uma vez que glicocorticoides têm efeitos catabólicos, ocasionando quadros de fadiga muscular, atrofia muscular e danos às fibras motoras, cuja incidência varia de 7 a 60%¹⁶. Tais alterações são atribuídas à ação direta dos corticoides e/ou ao estado de resistência via redução no sistema sinalizador da insulina¹⁷.

Diversos estudos demonstram associações entre resistência à insulina ou hiperinsulinemia, com hipertensão arterial, aterosclerose ou hipertrofia do miocárdio^{18,19}. Segundo pesquisa²⁰, a redução do IRS-1 e da PI3-kinase pode reduzir as reservas de glicogênio no coração de ratos submetidos ao tratamento com dexametasona, podendo ou não gerar alterações cardíacas.

Embasado na literatura, a proposta deste trabalho foi verificar se a resistência à insulina induzida pela dexametasona interfere nas reservas glicogênicas ventriculares ou em parâmetros eletrocardiográficos.

2 Material e Métodos

Foram utilizados ratos machos, *Rattus norvegicus albinus*, da linhagem *Wistar* com 3 a 4 meses de idade e peso de 200 a 300 gramas, os quais receberam água e alimentação *ad libitum* sendo mantidos em ambiente com temperatura constante de 23° C ± 2° C e ciclo claro/escuro de 12 horas, com luz acesa a partir das 6 horas, em gaiolas coletivas contendo no máximo 4 animais. Os ratos foram distribuídos em dois grupos experimentais (n=9) denominados de controle (C) e resistentes a insulina através do tratamento com dexametasona (D) (1mg/Kg), durante 5 dias via intraperitoneal (ip). Para determinação da sensibilidade tecidual à insulina, foi utilizado o teste de tolerância à insulina (KITT), que consistiu de anestesia com tiopental sódico (40 mg/kg) e após 10 min, amostras do sangue foram coletadas, sendo realizado um corte na cauda do animal

constituindo o tempo zero (T0). Após a primeira coleta, foi injetada, via intraperitoneal (ip), insulina regular da Biobrás®, na dose de 2U/kg e amostras de sangue foram coletadas sucessivamente nos tempos 2,5; 5; 10 e 20 minutos após a administração da insulina. A glicose plasmática foi avaliada por meio de glicosímetro¹². Para a determinação do glicogênio muscular, as amostras foram digeridas em KOH 30% à quente e o glicogênio precipitado a partir da passagem por etanol e o glicogênio precipitado submetido à hidrólise ácida na presença de fenol²¹. Os valores foram expressos em mg/100 mg de peso úmido. Para análise eletrocardiográfica, os animais foram anestesiados com Pentobarbital sódico (40mg/Kg, ip) e os eletrodos conectados aos canais do eletrocardiógrafo (Heart Ware System), sendo registradas três derivações bipolares (DI, DII e DIII) e três derivações amplificadas (aVR, aVL e aVF), com sensibilidade 2 N e velocidade de 50 mm/segundo. O intervalo QT foi medido em dez batimentos consecutivos, do início do complexo QRS ao ponto de retorno da onda T isoeletrica, definido como segmento TP. O intervalo QT foi corrigido pela frequência cardíaca, usando a fórmula de Bazett ($QTc = QT / \sqrt{RR}$). A análise estatística foi realizada aplicando o teste de normalidade de *Shapiro-Wilk* seguido do teste de *Tukey-Kramer*, ($p < 0,05$). O projeto foi aprovado pelo Comitê de ética de experimentação animal da Universidade Metodista de Piracicaba sob o protocolo n° 09/2013.

3 Resultados e Discussão

Tendo em vista que o *status* de resistência modifica o equilíbrio quimio-metabólico e compromete a homeostasia celular, iniciou-se avaliando o peso dos ratos, sendo verificada redução de 15% do peso em decorrência do tratamento com a dexametasona.

Em seguida, foi avaliada a glicemia dos grupos experimentais, no intuito de verificar a implantação do *status* de resistência à insulina, sendo que o grupo tratado com dexametasona apresentou glicemia 165% maior que o controle, indicando alteração na sensibilidade insulínica (Tabela 1).

Tabela 1: Peso (g) e Glicemia (mg/dL) de ratos controle e tratados com dexametasona (1mg/Kg/5 dias). Os valores correspondem à média ± epm, n=9. * $p < 0,05$ quando comparados ao controle.

	Controle (C)	Dexametasona (D)
Massa corporal (g)	377,54 ± 6,93	317,23 ± 4,94 *
Glicemia (mg/dL)	146 ± 9,19	387,33 ± 17,67 *

Uma vez estabelecida a alteração glicêmica, optou-se por avaliar a sensibilidade tecidual insulínica através do KITT. O grupo tratado apresentou constante de decaimento 54% menor que o controle, sendo 5,13 ± 0,2 %/min no grupo controle e 2,35 ± 0,1 %/min no grupo tratado com dexametasona, reiterando a alteração na sensibilidade insulínica, como pode ser observado no gráfico da Figura 1.

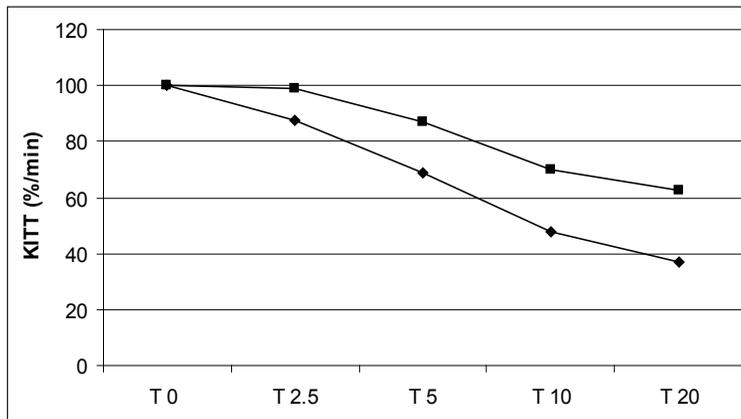


Figura 1: Constante de decaimento percentual da glicose por minuto (KITT) do grupo controle (◇) e de grupo tratado com dexametasona (■). Os valores correspondem à média ± epm, n=9. *p<0,05 comparado ao controle

Após verificar alterações na sensibilidade insulínica, tornou-se sugestivo avaliar as reservas glicogênicas, importantes reservas sob controle direto da ação insulínica. Como pode ser verificado no gráfico da Figura 2, as reservas glicogênicas foram reduzidas

frente ao tratamento com o glicocorticoide, atingindo valores 43% menores no sóleo e 68% menores no gastrocnêmio porção branca. Cabe ressaltar que as reservas glicogênicas ventriculares não foram afetadas pelo tratamento com dexametasona.

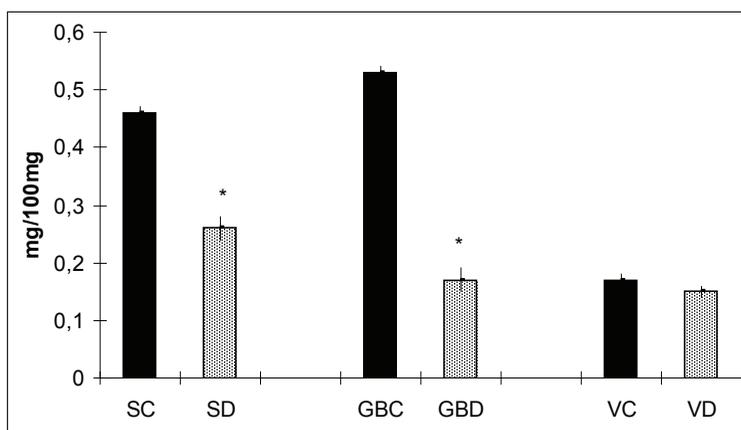


Figura 2: Concentração de glicogênio (mg/100mg) dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio porção branca (GB) e ventrículo (V) de ratos controle (C) e tratados com dexametasona (D; 1 mg/Kg – 5 dias). Os valores correspondem à média ± epm, n=9. *p<0,05 comparados ao controle

No intuito de verificar se a resistência insulínica poderia afetar parâmetros elétricos que coordenam a atividade cardíaca, passou-se a avaliar o perfil eletrocardiográfico. Neste sentido, pode-se verificar na Tabela 2, que a frequência

cardíaca do grupo tratado com dexametasona apresentou-se reduzida em 13%, além do aumento de 15,7% no intervalo QTc. Quanto aos demais parâmetros eletrocardiográficos, não foram verificadas alterações significantes.

Tabela 2: Frequência cardíaca e parâmetros eletrocardiográficos de ratos controle e tratados com dexametasona (1mg/Kg/5 dias). Os valores correspondem à média ± epm, n=9. *p<0,05 comparados ao controle.

	Controle (C)	Dexametasona (D)
Frequência Cardíaca (bat/min)	247,35 ± 4,8	214,87 ± 8,1 *
Intervalo QRS (ms)	54,3 ± 0,6	58 ± 2,1
Intervalo QTc (ms)	198 ± 4,9	235 ± 1,1*
Intervalo PR	40 ± 2,0	36,4 ± 2,2
Segmento PR	11 ± 1,4	11 ± 1,6

A literatura científica tem mostrado que inúmeras condições patológicas de caráter degenerativo ou tratamento com fármacos estão relacionados com o desenvolvimento do estado de resistência à insulina. Esta resistência é considerada como o comprometimento na captação de glicose, mediada pela ação insulínica por células envolvidas na reserva de substratos metabolizáveis, tais como: o tecido adiposo, hepatócitos e tecido muscular²².

Quando os resultados deste estudo são comparados com a literatura científica, observa-se que a administração de dexametasona em animais de experimentação na concentração de 1 mg/kg/dia, durante 5 dias, por via intraperitoneal, alterou a sensibilidade periférica à insulina. A redução na constante de captação da hexose expressa no teste de tolerância à insulina e a consequente hiperglicemia reflete no comprometimento multifatorial, representado por alterações no perfil de ativação dos receptores de insulina, na ativação dos substratos do receptor de insulina (IRS), bem como na associação destes com as vias que participam da cascata citosólica sinalizadora da insulina⁴.

No que se refere às alterações glicêmicas e no peso dos animais, recentes trabalhos demonstraram alterações nos mesmos parâmetros do presente estudo e dentro do mesmo perfil de tratamento^{23,24}. O paralelismo entre este estudo e os estudos de Rafacho²⁴ reitera a viabilidade da metodologia utilizada para indução da resistência.

A avaliação do conteúdo de glicogênio da musculatura periférica tratada com dexametasona apresentou redução nas reservas, demonstrando que a implantação do estado de resistência acompanha diminuição na atividade das vias glicogênicas. Fato que possivelmente está ligado à *down-regulation* na população de receptores de insulina nos tecidos alvo, evento que se torna pronunciado a partir do quinto dia do tratamento¹².

Um evento importante está ligado às reservas glicogênicas ventriculares, nas quais não foram observadas as alterações classicamente descritas no *status* de resistência insulínica. Este fato representa uma ação diferenciada do glicocorticoide no músculo cardíaco, uma vez que já foi descrito a secreção de cortisol no músculo cardíaco. Certamente, a produção do glicocorticoide no coração é 1000 vezes menor do que na supra-renal, portanto cabe reforçar que a presença do glicocorticoide foi constatada em preparação experimental com coração isolado, condição que minimiza interferência de cortisol que possa ter vindo de perfusão a partir do plasma, além da descrição das enzimas envolvidas na síntese²⁵.

Recentemente foi avaliado o mecanismo de ação do cortisol na dinâmica cardíaca de ratos diabéticos, sendo demonstrado que o corticoide exerce ação parácrina e autócrina no músculo cardíaco, modulando as correntes de potássio e portanto promovendo a estabilização na duração do potencial de ação. Estas alterações eletrocardiográficas também já foram descritas em humanos^{26,27}.

Especificamente no coração, a dexametasona promove

mudança no *status* de ativação dos canais de K⁺, retardando sua inativação e aumentando o tempo de repolarização, evento que minimiza a sobrecarga do músculo cardíaco e protege o coração²⁸.

Uma vez que as dinâmicas elétricas de repolarização foram reduzidas, justifica-se a menor frequência cardíaca constatada no grupo tratado. Ao proteger o coração, a dexametasona reduz a necessidade de utilização das reservas glicogênicas, razão pela qual as reservas não se apresentaram alteradas, de forma antagônica ao observado nos músculos periféricos.

Merece destacar que na presença da dexametasona o intervalo QTc, que representa o tempo necessário para a despolarização e a repolarização ventricular, apresentou-se prolongado, indicando a ação moduladora do glicocorticoide na dinâmica cardíaca.

4 Conclusão

O coração é um órgão protegido das alterações impostas pela resistência insulínica, não sofrendo as consequências ocorridas no tecido muscular esquelético estriado, uma vez que não houve alterações elétricas cardíacas significantes.

Referências

1. Bevan P. Insulin signaling. *J Cell Sci* 2001;114(8):1429-30.
2. Carvalheira JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de sinalização da insulina. *Arq Bras Endocrinol* 2006;46(4):419-26.
3. Shaw LM. The insulin receptor substrate (IRS) proteins: at the intersection of metabolism and cancer. *Cell Cycle* 2011;10(11):1750-6.
4. Saad MJA, Foli F, Kahn CR. Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone treated rats. *J Clin Invest* 1993;92:2065-72.
5. Clemmons D, Maile L, Xi G, Shen X, Radhakrishnan Y. IGF-I signaling in response to hyperglycemia and the development of diabetic complications. *Curr Diabetes Rev* 2011;7(4):235-45.
6. Sesti G. Molecular mechanism of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: role of the insulin receptor variant forms. *Diabetes Metab Res Rev* 2001;17(5):363-73.
7. Siegel D, Baveye P. Battling the paper glut. *Science* 2010;329(5998):1466-90.
8. Ramm-Petersen A, Selmer KK, Nakken KO. Glucose transporter protein type 1 (GLUT-1) deficiency syndrome. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2011;131(8):828-31.
9. Benito M. Tissue specificity on insulin action and resistance: past to recent mechanisms. *Acta Physiol (Oxf)* 2011;201(3):297-312.
10. Benito M. Tissue-specificity of insulin action and resistance. *Arch Physiol Biochem* 2011;117(3):96-104.
11. Lancha Junior AH. Effects of creatine supplementation on muscle wasting and glucose homeostasis in rats treated with dexamethasone. *Amino Acids* 2012;42(5):1695-701. DOI: 10.1007/s00726-011-0871-9
12. Rafacho A, Abrantes JL, Ribeiro DL, Paula FM, Pinto ME, Boschero AC, et al. JR. Morphofunctional alterations in endocrine pancreas of short- and long-term dexamethasone-

- treated rats. *Horm Metab Res* 2011;43(4):275-81. DOI: 10.1055/s-0030-1269896
13. Rafacho A, Giozzet VA, Boschero AC. Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance. *Pancreas* 2008;36(3):284-93. DOI: 10.1097/MPA.0b013e31815ba826
 14. Burén J, Lay YC, Lundgreen M, Eriksson JW, Jensen J. Insulin action and signaling on fat and muscle from dexamethasone-treated rats. *Arch Biochem Biophys* 2008;474(1):91-101. DOI: 10.1016/j.abb.2008.02.034
 15. De Oliveira C, De Mattos AB, Biz C, Oyama LM, Ribeiro EB, Do Nascimento CM. High-fat diet and glucocorticoid treatment cause hyperglycemia associated with adiponectin receptor alterations. *Lipids Health Dis* 2011;18;10-1. DOI: 10.1186/1476-511X-10-11
 16. Castro MF, Godo J, Silva L, Andreu JL. Miopatia esteroidea. *Semin Fund Esp Reumatol* 2008;9(4). DOI: 10.1016/S1577-3566(08)75213-8
 17. Saad MJ. Molecular mechanisms of insulin resistance. *Braz J Med Biol Res* 1994;27(4):941-57.
 18. Katz EB, Stenbit AE, Hatton K, De Pinho R, Charron MJ. Cardiac and adipose tissue abnormalities, but not diabetes in mice deficient in GLUT 4. *Nature* 1995;377:151-5.
 19. Carvalho CRO, Brenelli SL, Silva AM, Nunes ALB, Velloso LA, Saad MJA. Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *Endocrinology* 1996;137:151-9.
 20. Carvalho CRO. Regulation of IRS-1 in the heart of intact rats: effects of stz-diabetes, dexamethasone and aging. Tese [Doutorado em Clínica Médica] - Universidade Estadual de Campinas; 1998.
 21. Siu LO, Russeau JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples, *J Appl Physiol* 1970;28(2):234-6
 22. Raw I. Mecanismo de ação da insulina. *Rev Med* 2006;85(4):124-9.
 23. Rafacho A, Roma LP, Taboga SR, Boschero AC, Bosquiere JR. dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic islets. *Can J Physiol Pharmacol* 2007;85(5):536-45.
 24. Rafacho A, Giozzet VA, Boschero AC, Bosquiere JR. Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance. *Pancreas* 2008;36(3):284-93. DOI: 10.1097/MPA.0b013e31815ba826
 25. Silvestre JS, Robert V, Heymes C, Aupetit-Faisant B, Mouas C, Moalic IM, *et al.* Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. *J Biol Chem* 1998;273:4883-91.
 26. De Amico M, Marfella R, Nappo F, Di Filippo C, De Angelis L, Berrino L, *et al.* High glucose induces ventricular instability, and increases vasomotor tone in rats. *Diabetologia* 2001;44:464-70.
 27. Shimoni Y. Dexamethasone and cardiac potassium currents in the diabetic rats. *Br J Pharmacol* 2005;146(2):280-7.
 28. Nerbonne JM. Molecular basis of functional voltage gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* 2000;525:285-98.

