

**UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

**“UTILIZAÇÃO DE SENSIBILIZADORES DA INSULINA OU
ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DIAFRAGMÁTICA EM RATOS
TRATADOS COM DEXAMETASONA: PADRÃO METABÓLICO
VENTRICULAR E DOS MÚSCULOS RESPIRATÓRIOS”**

Mestranda: Rita de Cássia Lordello Chaim Menezes

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva

Piracicaba – SP

2005

**“UTILIZAÇÃO DE SENSIBILIZADORES DA INSULINA OU
ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DIAFRAGMÁTICA EM RATOS
TRATADOS COM DEXAMETASONA: PADRÃO METABÓLICO
VENTRICULAR E DOS MÚSCULOS RESPIRATÓRIOS”**

Rita de Cássia Lordello Chaim Menezes

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Fisioterapia, da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade Metodista de Piracicaba, como requisito para obtenção do título de mestre em Fisioterapia.

Piracicaba- SP

2005

Dedico este trabalho ao meu marido João Carlos e às minhas filhas Marina e Maria Fernanda que está chegando. Obrigado pelo apoio e compreensão nos momentos de ausência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tantas graças concedidas e por ter me iluminado em mais uma trajetória da minha vida profissional.

Aos meus pais por terem me dado a estrutura emocional e os muitos ensinamentos durante a minha vida.

Às minhas amigas de mestrado Karina e Léia pelo companheirismo, auxílio nos procedimentos laboratoriais, incentivo e sugestões oportunas na realização deste trabalho.

Às integrantes do Laboratório de Fisiologia, Patrícia e Melissa pela recepção e paciência demonstradas ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rinaldo Guirro, Coordenador do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Fisioterapia, pelo excelente desempenho na valorização e reconhecimento do nosso curso.

À graduanda em Biologia Márcia pela colaboração especial na coleta de material e realização de experimento.

À Santa Casa de Limeira, em particular ao Dr. Gilberto Scarassatti, pelo apoio financeiro e valorização profissional.

Em especial ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva pela incansável dedicação e qualidade de orientação que me permitiu crescer no meu conhecimento e pensamento científico. Minha eterna e sincera gratidão.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	06
LISTA DE ABREVIATURAS.....	08
RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	12
1- INTRODUÇÃO.....	15
1.1- Dexametasona.....	19
1.2- Troglitazona.....	21
1.3- Metformina.....	23
1.4- Estimulação elétrica neuromuscular.....	27
2- OBJETIVOS.....	30
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1- Animais.....	33
3.2- Tratamento com dexametasona, troglitazona e metformina.....	33
3.3- Tratamento com estimulação elétrica neuromuscular.....	34
3.4- Amostragem.....	36
3.4.1- Determinação do glicogênio muscular.....	36
3.4.2- Proteínas Totais.....	36
3.4.3- Leucometria.....	36
3.4.4- Glicemia.....	37
3.4.5- Teste de tolerância à insulina (ITT).....	37
3.4.6- Obtenção dos linfócitos do timo.....	37
3.5- Análise estatística.....	38
4- RESULTADOS.....	39
5- DISCUSSÃO.....	50
6- CONCLUSÃO.....	59
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Equipamento Dualpex 961 (Quark) utilizado para a realização da estimulação elétrica.

Figura 2. Estimulação elétrica realizada no rato através de dois eletrodos de superfície acoplados com gel na região logo abaixo do gradil costal.

Figura 3. Porcentagem de decaimento da glicose após a administração de insulina regular (1UI/Kg iv) após a coleta de amostra no tempo zero (T0). Os valores estão expressos em porcentagem, tomando como 100% a glicose no T0. Os grupos estão assim representados: Controle (C), tratado com Dexametasona por 3 dias (De 3 dias) e 5 dias (De 5 dias).

Figura 4. Reserva de glicogênio nos músculos Diafragma (D), Abdominal (A) e Ventricular (V) dos grupos Controle (C), tratado com Dexametasona (1mg/Kg) por 3 dias (De 3 dias) e 5 dias (De 5 dias).

Figura 5. Reserva de glicogênio nos músculos Diafragma (D), Abdominal (A) e Ventricular (V) dos grupos Controle (C), tratado com Metformina (1.4mg/ml) por 3 dias (M 3 dias) e Troglitazona (0.8mg/Kg) por 3 dias (T 3 dias).

Figura 6. Reserva de glicogênio nos músculos Diafragma (D), Abdominal (A) e Ventricular (V) dos grupos Controle (C), tratado com Metformina (1.4mg/ml) por 5 dias (M 5 dias) e Troglitazona (0.8mg/Kg) por 5 dias (T 5 dias).

Figura 7. Reserva de glicogênio nos músculos Diafragma (D), Abdominal (A) e Ventricular (V) dos grupos tratado com Dexametasona (1mg/Kg) por 3 dias (De 3 dias) tratado com Dexametasona + Metformina (1.4mg/ml) por 3 dias (De+M 3 dias) e Dexametasona+Troglitazona (0.8mg/Kg) por 3 dias (De+T 3 dias).

Figura 8. Reserva de glicogênio nos músculos Diafragma (D), Abdominal (A) e Ventricular (V) dos grupos tratados com Dexametasona (1mg/Kg) por 5 dias (De 5 dias) com Dexametasona+Metformina (1.4mg/ml) por 5 dias (De+M 5 dias) e Dexametasona+Troglitazona (0.8mg/Kg) por 5 dias (De+T 5 dias).

Figura 9. Reserva de glicogênio nos músculos Diafragma (D), Abdominal (A) e Ventricular (V) dos grupos Controle (C), tratados com Dexametasona (1mg/Kg) por 5 dias (De 5 dias), com estimulação diafragmática elétrica transcutânea por 5 dias (E 5 dias) e Dexametasona+Eletroestimulação por 5 dias (De+E 5 dias).

Figura 10. Concentração de proteínas totais nos músculos Diafragma (D) e Abdominal (A) dos grupos Controle (C) e tratado com Dexametasona (1mg/Kg) por 5 dias (De 5 dias).

Figura 11. Número de linfócitos do timo do grupo Controle (C), tratado com estimulação diafragmática elétrica transcutânea (E) e Tratado com Dexametasona (1mg/Kg) + E (De + E) durante 5 dias.

Figura 12. Número de leucócitos do grupo Controle (C), tratado com estimulação diafragmática elétrica transcutânea (E) e Tratado com Dexametasona (1mg/Kg) + E (De + E) durante 5 dias.

Figura 13. Glicemia do grupo Controle (C), tratado com estimulação diafragmática elétrica transcutânea (E) e Tratado com Dexametasona (1mg/Kg) + E (De + E) durante 5 dias.

LISTA DE ABREVIATURAS

Controle (C)

Dexametasona (De)

Dexametasona associado à metformina (De+M)

Dexametasona associado à troglitazona (De+T)

Dexametasona associado à estimulação diafragmática elétrica transcutânea (De+E)

Estimulação diafragmática elétrica transcutânea (E)

Fator de necrose tumoral (TNF)

Fosfatidilinositol-3-quinase (PI3-K)

Metformina (M)

Receptor γ do proliferador ativado de peroxissoma (PPAR- γ)

Reserva de glicogênio (RG)

Substrato de receptor de insulina 1 (IRS-1)

Substrato de receptor de insulina 2 (IRS-2)

Tiazolidinedionas (TZDs)

Transportador de glicose (GLUT)

Transportador de glicose do tipo 1 (GLUT-1)

Transportador de glicose do tipo 4 (GLUT-4)

Troglitazona (T)

Teste de tolerância à insulina (ITT)

RESUMO

RESUMO

Este trabalho avaliou a resistência à insulina após utilização de dexametasona e as respostas metabólicas apresentadas pelo músculo ventricular e os músculos respiratórios diafragma e abdominal quando tratados com metformina e troglitazona e/ou a estimulação diafragmática elétrica transcutânea.

Ratos Wistar foram divididos em grupo controle (C), tratado com dexametasona (De), metformina (M), troglitazona (T), dexametasona+metformina (De+M), dexametasona+troglitazona (De+T), estimulação diafragmática elétrica transcutânea (E) e dexametasona+estimulação diafragmática elétrica transcutânea (De+E).

O teste de tolerância à insulina (ITT) mostrou redução de 43% no grupo De durante 3 dias e 55% no grupo De durante 5 dias comparados ao grupo C.

O grupo De 3 dias comparado ao grupo C apresentou aumento significativo nas reservas de glicogênio (RG) de todos os músculos. O De 5 dias mostrou redução significativa nas RG somente para o músculo diafragma.

Os grupos tratados com M 3 e 5 dias comparados ao C aumentou significativamente as RG dos músculos diafragma, abdominal e ventricular; o mesmo ocorrendo para o tratamento 3 e 5 dias com T.

No diafragma, as RG aumentaram 23% comparando os tratamentos De com De+M durante 3 dias. Comparando De com De+M durante 5 dias as RG aumentaram significativamente em todos os músculos avaliados. No diafragma de animais tratados com De+T comparado com De 3 dias observamos aumento de 14% nas RG. No grupo tratado durante 5 dias com De+T todos os músculos tiveram aumento nas RG.

O tratamento com E comparado ao C teve aumento significativo nas RG para o músculo diafragma e abdominal. E o grupo De+E comparado ao grupo De houve elevação significativa nas RG de todos os músculos avaliados.

Os resultados sugerem que a resistência insulínica induzida por De modificou o padrão metabólico dos músculos respiratórios, ação esta que foi minimizada na presença dos sensibilizadores da insulina e estimulação elétrica neuromuscular. Estes achados podem representar uma forma terapêutica coadjuvante no tratamento de pacientes pneumopatas que fazem uso de corticosteróides. E serem foco de estudos direcionados a avaliar se além de melhorar a resistência insulínica, há reflexo na melhora da

capacidade respiratória e conjuntamente aumento do limiar de tolerância à fadiga muscular destes pacientes.

ABSTRACT

ABSTRACT

This study evaluated the induction of insulin resistance after dexamethasone treatment and the metabolic response of diaphragm, abdominal and ventricular muscles of rats treated with metformin and troglitazone or transcutaneous diaphragmatic electric stimulation.

Wistar rats were separated in groups: control (C), treated with dexamethasone (De), metformin (M), troglitazone (T), dexamethasone+metformin (De+M), dexamethasone+troglitazone (De+T), electro-stimulated (E) and dexamethasone+electro-stimulated (De+E).

The glucose up take (ITT) showed a reduction from De during 3 days to C of 43% and 55% to the group treated with De during 5 days.

The animals treated with De during 3 days matching C showed a significant increase of glycogen reserve (GR) in all muscles. The De 5 days showed significant impairment only of diaphragm muscle.

The groups treated with M 3 e 5 days matching C showed a significant increase of muscle GR in diaphragm, abdominal and ventricular muscles. The same was observed in the groups treated with T 3 e 5 days.

In diaphragm, the GR increased 23% matching De and De+M treatments during 3 days. Matching De and De+M during 5 days the GR increased significantly in the three muscles evaluated. In diaphragm muscle of animals treated with De+T matching De during 3 days we observed an increase of 14% of GR. In the group treated during 5 days with De+T all muscles showed an increase of GR.

The group treated with electro-stimulation matching C caused a significant increase in RG in diaphragm and abdominal. The association De+E matched with De showed a significant elevation to all muscles .

Dexamethasone induced insuline resistance and changed the metabolic pattern of respiratory muscles that were minimized by drugs or electric stimulation . These findings suggests a auxiliary therapeutical approach to patients with pulmonary disease on steroids who could improve their respiratory capacity and increase their resistance to fatigue using metformin, troglitazone or either electric stimulation. Further studies addressing these subjects is necessary for their clinical application.

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

A contração muscular esquelética é desencadeada por eventos deflagrados após a propagação dos potenciais elétricos gerados na interface da junção neuromuscular. Tais sinais elétricos ativam sistemas transmembrânicos responsáveis tanto pelas variações nas concentrações iônicas citosólicas quanto pela modulação na atividade metabólica. No tecido muscular, o perfil metabólico das fibras é determinado pela sensibilidade à insulina, pela população de receptores, pela atividade de sistemas específicos de captação, transporte e metabolismo de substratos (RICHARDSON et al., 1991).

No que tange ao metabolismo dos carboidratos, a homeostasia energética das fibras musculares é mantida às custas da ação da insulina cuja ação facilita a captação e o metabolismo da glicose e regula a cadeia de processos metabólicos. A sensibilidade tecidual à insulina depende da integridade e responsividade dos receptores, os quais são sintetizados no retículo endoplasmático na forma de pró-receptores sendo então transferidos para o sistema de Golgi onde sofrem a clivagem proteolítica. As ações da insulina iniciam-se pela ligação do hormônio a seu receptor na membrana plasmática (GOLDFINE, 1987; ROSEN, 1987). Este receptor é uma glicoproteína heterotetramérica presente em todos os tecidos de mamíferos e constituído por duas subunidades α inteiramente extracelular que contém o sítio de ligação da insulina e duas subunidades β que é uma proteína transmembrana responsável pela transmissão do sinal (BEVAN, 2001).

A insulina liga-se à subunidade α e estimula a atividade quinase da subunidade β de seu receptor, que se autofosforila. Após a interação hormônio/receptor ocorre a autofosforilação, processo característico de toda a família de receptores tirosina-quinase e a sinalização citosólica da insulina é deflagrada (SCHLESSINGER, 1990). A adenosina trifosfato atua como doador de fosfato e a fosforilação ocorre exclusivamente em tirosina. A autofosforilação do receptor desencadeia uma cascata intramolecular de reações de fosforilações de um ou mais dos seus substratos intracelulares (SUN et al., 1991). Dentre os substratos fosforilados após estímulo insulínico, destacam-se a proteína denominada substrato de receptor de insulina 1 (IRS-1) (KUHNE et al., 1993), o substrato de receptor de insulina 2 (IRS-2) (TAMEMOTO, 1994); o substrato de receptor de insulina 3 e o substrato de receptor de insulina 4 (LAVAN et al., 1997), a

proteína carreadora de SH2 (Shc) e uma tirosina quinase da família Janus (JAK2) (SAAD et al., 1996).

Através de estudos *in vivo*, em cultura de células e em sistemas reconstituídos *in vitro*, o IRS-1 fosforilado associa-se a enzima fosfatidilinositol-3-quinase (PI3-K) ativando-a (FOLLI et al., 1996). Demonstrou-se que essa associação e ativação também ocorrem em dois importantes tecidos insulino-sensíveis de ratos, fígado e músculo, em concentrações fisiológicas de insulina (DIMITRIADIS et al., 1997). Diante disto o IRS-1 pode ser considerada uma molécula “ancoradora” direcionando as ações insulínicas (SAAD et al., 1993).

O receptor de insulina se comunica com seus mensageiros de forma indireta, através das proteínas IRS-1 e IRS-2 e Shc. Todas estas, quando fosforiladas pelo receptor, agem como estaleiros que abrigam proteínas mensageiras com domínio SH2. Outros tipos importantes de proteínas são as proteínas Ras, que são produtos dos protooncogene Ras e atuam na rede sinalizadora da insulina orientando a translocação de vesículas contendo transportadores de glicose do tipo GLUT 4 através do citoplasma, na proliferação, diferenciação celular e na atividade das quinases ativadas por mitógeno (MAP) (TAYLOR, 1991).

Como citado acima, a insulina sinaliza em direção ao intracelular através de subunidades denominadas IRS-1 e IRS-2, as quais, através de reações em cascata fosforilam a proteína G ativando a fosfolipase C "Ras" e a PI3-K. A enzima PI3-K atua como regulador alostérico ligando-se a região denominada de “pleckstrin homology” de proteínas quinase dependente de fosfoinosítídeos e a proteína kinase B. Através destes mecanismos a PI3-K é capaz de atuar no âmbito molecular modulando vários processos metabólicos relacionados ao efeito da insulina incluindo a captação de glicose, efeito antilipólise, síntese de glicogênio e supressão da gliconeogênese hepática através da regulação na expressão da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (RICHARDSON et al., 1991).

Com relação à ação da insulina, são conhecidas suas ações em uma ampla variedade de células e tecidos onde promove o influxo de nutrientes e bloqueia a liberação de outras formas de energia reservadas, ou seja, no músculo esquelético e cardíaco estimula a síntese de proteínas, a captação de glicose e a glicogênese, no tecido

adiposo, ativa a lipogênese bloqueando paralelamente a lipólise (MYERS e WHITE, 1996).

A musculatura esquelética é quantitativamente o tecido mais importante envolvido na homeostasia glicêmica, visto sua capacidade de captar grandes quantidades de glicose após infusão ou ingestão. Em condições basais as fibras musculares esqueléticas apresentam pequenas concentrações citosólicas de glicose. No entanto, frente a hiperinsulinemia, hiperglicemia ou atividade física, são desencadeados processos facilitadores para uma maior captação da hexose, a qual pode ser prontamente oxidada e liberada na forma de lactato, alanina ou piruvato ou direcionada para formação de glicogênio (EXTON, 1987).

A estimulação da síntese de glicogênio é uma das maiores respostas fisiológicas moduladas pela insulina. No entanto, detalhes precisos dos mecanismos pelos quais a insulina atua na síntese de glicogênio nos músculos ainda são desconhecidos. Estudo tem apontado as enzimas glicogênio sintetase kinase-3 e proteínas-ligantes-fosfatases-1 como responsáveis pela ativação da enzima glicogênio sintetase que é a enzima chave do metabolismo do glicogênio (RICHARDSON et al., 1991).

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 denominados GLUTs (MUECKLER, 1990). Uma dessas proteínas é o GLUT 4 cuja atividade é regulada pela insulina sendo expressa exclusivamente em tecidos periféricos sensíveis à insulina como tecido adiposo, coração e músculo esquelético (KABURAGI, 1999; SESTI, 2001).

Considerando-se a função dos transportadores, sabe-se que o GLUT 1 é responsável pela captação basal de glicose, o GLUT 4, que é o mais importante, participa efetivamente do controle glicêmico pois promove a captação de grandes quantidades de glicose sendo ainda passível de ser translocados de reservatórios vesiculares citosólicos em direção à membrana (BURANT, 1991).

É oportuno ressaltar que a utilização de corticosteróides e a estimulação diafragmática elétrica transcutânea são fatores que potencialmente podem interagir com o sistema imunológico gerando uma resposta imunogênica secundária ao estresse farmacológico ou mecânico que inclui a leucocitose, o aumento e ativação de mediadores locais e sistêmicos da resposta inflamatória (NAKAGAWA et al., 1998;

NATALE et al., 2003).

A resposta imunogênica tem a participação de citocinas. Estas são glicoproteínas que mediam a comunicação entre células do sistema imunológico e que têm sua atividade modulada por vários estímulos incluindo atividade física, infecção ou trauma. A atividade física afeta a produção de citocinas locais e sistêmicas como por exemplo o fator de necrose tumoral, interleucinas 1 e 6 e interferon. Estes mediadores agem sobre a capacidade mitogênica dos leucócitos e efetivamente na resposta final celular e humoral (MOLDOVEANU et al., 2001).

CONSIDERAÇÕES GERAIS

No delineamento do experimento optamos por analisar as relações ligadas ao metabolismo glicogênico na musculatura respiratória e no músculo estriado cardíaco, assim como a resistência insulínica induzida pelo glicocorticoide dexametasona e o efeito dos sensibilizadores metformina e troglitazona sobre a ação insulínica. A estimulação elétrica neuromuscular também foi utilizada enquanto recurso fisioterapêutico no intuito de promover alteração na dinâmica metabólica e no transporte de glicose.

Assim apresentamos uma revisão da literatura utilizada no direcionamento de nossas ações.

1.1- DEXAMETASONA

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 fármacos como os glicocorticóides, sendo a dexametasona a mais estudada destes. De maneira geral, compromete a captação de glicose por tecidos periféricos em especial o tecido muscular. Dentre os glicocorticóides sintéticos, a dexametasona tem sido amplamente utilizada devido sua baixa atividade mineralocorticoide, ação prolongada e facilidade de administração, no entanto, tem sido relatado que o tratamento acompanha inúmeros efeitos metabólicos como lipólise e proteólise concomitante ao tratamento (SAAD et al., 1993).

É fato bem estabelecido que o excesso de glicocorticóides causa resistência à insulina (AMATRUDA et al., 1985). Neste contexto, sabe-se que a hipercortisolemia

está associada com o aumento da produção de glicose pelo fígado, diminuição da utilização e transporte periférico de glicose, diminuição da síntese e aumento da degradação protéica no músculo, além de elevação na quantidade de insulina requerida para exercer ação sobre a captação de glicose e/ou glicogênese (LEIGHTON et al., 1987). Têm-se observado ainda inúmeros efeitos metabólicos como a glicogenólise hepática, a lipólise e em especial o antagonismo da ação da insulina fatores quando associados promovem a elevação na atividade proteolítica do tecido muscular desencadeando fraqueza e atrofia muscular (EXTON et al., 1976).

Na década de 90 diversos autores avaliaram a captação de 3-O-metilglucose (substrato não metabolizável) em ratos tratados com dexametasona havendo o consenso quanto ao status de resistência à insulina que se caracteriza por hiperglicemia, hiperinsulinemia e redução na sinalização da via pós-receptor de insulina comprometendo a translocação dos transportadores e ação da insulina (HARBER e WEINSTEIN, 1992).

Pacientes tratados com glicocorticóides apresentam alterações na homeostasia energética do organismo desenvolvendo o quadro clínico denominado “miopatia por esteróide” cuja incidência varia de 7 à 60% (ASKARI et al., 1976). Tais alterações são atribuídas a ação direta dos corticóides e/ou ao estado de resistência via redução no sistema sinalizador da insulina (SAAD et al., 1993).

Estudos de Vanstapel (1982) demonstraram que, em ratos alimentados, sob jejum ou adrenalectomizados após 3 horas de administração de dexametasona, há elevação no conteúdo muscular de glicogênio, verificando que o glicocorticóide promove a defosforilação da enzima glicogênio sintetase da forma B (inativa) para a forma A (ativa) favorecendo a formação dos reservatórios. Desta forma, a ativação da enzima glicogênio sintetase pode ser utilizada como índice de ação do glicocorticóide.

Um recente estudo levantou a hipótese dos glicocorticóides promoverem alterações na secreção de insulina uma vez que os efeitos do glicocorticóides sobre a síntese de glicogênio não são observados em animais diabéticos aloxanizados. Neste sentido, recentemente foi demonstrado que a dexametasona elevou a secreção de insulina em ilhotas de Langerhans isoladas de ratos (BOSQUEIRO et al., 2002).

Carter-Su e Okamoto (1985) avaliaram “in vitro” o transporte de glicose em adipócitos isolados e expostos ao glicocorticóide sintético dexametasona e verificaram que houve redução no conteúdo do GLUT1, GLUT4 e RNAm dos transportadores.

Meacham et al. (1997) avaliaram o metabolismo de carboidratos em ratos tratados com prednisona correlacionado com mudanças na concentração plasmática de ácido graxo livre não esterificado e lactato e verificaram que a sensibilidade à insulina foi reduzida em 64% e a concentração plasmática de insulina foi elevada em 50% não havendo modificação na lactatemia circulante sugestivo de ciclo de Randle.

1.2- TROGLITAZONA

Dentre as novas terapias prescritas no tratamento do diabetes tipo 2 destaca-se a troglitazona, substância da família das tiazolidinedionas (TZDs). Estas substâncias podem levar a um controle glicêmico efetivo mesmo quando utilizadas isoladamente (LEBOVITZ, 2001). Entretanto seu efeito notável é melhorar a sensibilidade insulínica nos tecidos: adiposo, hepático e muscular (MOLLER, 2001).

As TZDs agem aumentando a resposta biológica destes tecidos alvos da ação insulínica reduzindo a síndrome da resistência à insulina e exercendo efeitos benéficos sobre fatores que aumentam o risco de complicações macrovasculares (MERIDEN, 2004).

As TZDs agem através do receptor γ do proliferador ativado de peroxissoma (PPAR- γ), um membro da super família do receptor de hormônio nuclear. O PPAR- γ controla a transcrição de genes nucleares que aumentam a expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de lipídio e de glicose (SALTIEL e OLEFSKY, 1996; SPIEGELMAN, 1998). Elas estimulam a adipogênese, reduzem as concentrações de ácidos graxos livres e triglicerídeos plasmático e interferem na distribuição tecidual de gordura. A estimulação do PPAR- γ pode diminuir a liberação pelos adipócitos de várias moléculas de sinalização, tais como ácidos graxos livres, leptina e fator- α de necrose tumoral, os quais são capazes de neutralizar a ação hipoglicêmica da insulina (SPIEGELMAN, 1998). Também quando estimuladas pelas TZDs interferem com a função endotelial levando a efeitos benéficos da reatividade vascular, coagulação e fibrinólise (PARULKAR et al., 2001).

No músculo, as TZDs também promovem aumento na expressão das proteínas envolvidas no metabolismo da glicose e de lipídeo (PARK, 1998). A ativação do PPAR- γ com a TZD aumenta a estimulação insulínica da atividade da PI3-K e AKT as quais são enzimas chaves na cascata de sinalização pós receptor de insulina que estão deficientes no músculo estriado de pacientes diabéticos tipo 2 (KIM, 2002).

A dislipidemia de pacientes com resistência insulínica caracterizada por níveis elevados de triglicerídeos, ácidos graxos livres, lipoproteínas de baixa densidade e baixos níveis de lipoproteínas de alta densidade (OVALLE e BELL, 2002a) está associada com complicações macrovasculares e aterosclerose (HAFFNER et al., 1999).

O uso de TZD está relacionado à melhora deste perfil lipídico e redução de complicações vasculares associadas (ARONOFF et al., 2000; FREED et al., 2002). As TZDs promovem redistribuição de gordura central para periferia (CAREY, 2002). Estudos com ressonância magnética demonstraram redução de área de gordura visceral e aumento da gordura subcutânea. Esta redistribuição de tecido adiposo parece associar-se com melhora da sensibilidade insulínica hepática e muscular (MIYAZAKI, 2002).

A função celular das células β das ilhotas pancreáticas é preservada pelo uso da TZD em pacientes diabéticos (PORTER, 2000) e podendo chegar a ter sua função parcialmente restaurada (OVALLE e BELL, 2002b).

Já foi documentada a relação entre resistência insulínica e inflamação, coagulabilidade e fibrinólise (FESTA et al., 2000). Níveis elevados de proteína C reativa e inibidor do ativador do plasminogênio e fibrinogênio têm sido encontrados em pacientes com resistência insulínica. A elevação da proteína C reativa é considerada um preditor de eventos cardiovasculares (KOENIG, 1999). As TZDs promovem a redução de marcadores inflamatórios de fase aguda que se correlacionam com a reatividade vascular aumentada e redução de danos endoteliais com diminuição da aterogênese (EBELING et al., 2001). A insulina tem efeito vasodilatador provavelmente pela via do óxido nítrico, promovendo estimulação da enzima óxido nítrico sintetase endotelial (ALJADA e DANDONA, 2000). Melhorando a sensibilidade insulínica as TZDs permitem uma maior resposta vascular à insulina e conseqüente efeito anti-hipertensivo.

A troglitazona mostrou melhorar também a sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose em indivíduos não diabéticos caracterizada pela resistência insulínica (NOLAN, 1994) de pacientes obesos, pessoas com tolerância à glicose diminuída,

pacientes com síndrome de Werner e mulheres com síndrome do ovário policístico (JOHNSON, 1998).

As tiazolidinedionas são uma classe única de agentes antidiabéticos orais que mostraram reduzir diretamente a resistência insulínica nos locais de ação da insulina, especificamente tecido adiposo, músculo esquelético e o fígado. Reduzindo a resistência insulínica, estas drogas influenciam muitos fatores de risco cardiovasculares modificáveis associados com a síndrome da resistência insulínica (ARODA e HENRY, 2003).

A análise farmacodinâmica da troglitazona mostrou que seu perfil de absorção é rápido e o tempo máximo da concentração plasmática ocorre entre 2 a 3 horas após a ingestão oral. Neste sentido já foi verificado que a alimentação eleva a sua absorção em aproximadamente 85%. Liga-se à albumina (99%), é excretada principalmente nas fezes (85%) e secundariamente na urina (3%). No entanto, não promove a secreção de insulina, necessitando da presença desta para que possa exercer sua ação. Esta substância tem meia vida plasmática de 16 a 34 horas e reduz a glicosilação da hemoglobina. Não afeta o peso do pâncreas, o número de ilhotas e nem a quantidade de glucagon (DeFRONZO, 1999).

1.3- METFORMINA

As guanidinas apresentam ampla utilização na terapêutica clínica. Dentre suas várias aplicações podemos citar: agente antibactéria, antiviral, antiinflamatório, hipotensor, antagonista do receptor de histamina, indutor de alteração na excitabilidade neuronal ligada a canais de Na^+ e indutora de alteração na liberação de neurotransmissores (SCHAFER, 1983).

Há várias décadas as biguanidas começaram a ser utilizadas no tratamento do diabetes mellitus devido a sua propriedade anti-hiperglicemiante quando administrada por via oral (DAWIS e GRANNER, 1996). Todavia, a sua prescrição foi abandonada devido à ocorrência de muitos casos letais de pacientes que desenvolveram acidose láctica quando usavam fenformina, sendo substituídas por outras biguanidas como, buformina e metformina. A metformina destacou-se das demais, pois, desde que

utilizada em condições controladas, o risco de provocar acidose láctica é mínimo (CAMPBELL, 1991).

Em pacientes diabéticos, não dependente de insulina, tratados com metformina, Jackson (1987), verificou que ela promovia uma pequena elevação na concentração plasmática de ácido láctico, principalmente após as refeições, gerando uma pequena acidose pós-prandial. Sugeriram que a metformina estaria induzindo aumento na captação hepática de glicose e a subsequente metabolização até lactato. O remanescente poderia ser utilizado para sintetizar glicogênio através da via indireta proposta por Katz e McGarry (1984). Também Nosadini (1987) atribuiu importância a esta via para a diminuição da hiperlactatemia.

Estudos farmacocinéticos demonstraram, no homem e no rato, que a metformina não se liga a proteínas plasmáticas e não é metabolizada, sendo excretada rapidamente na urina (SCHAFER, 1983). As avaliações farmacodinâmicas realizadas em pacientes diabéticos revelaram níveis plasmáticos máximos de metformina 1 a 2 horas após a administração oral, sendo os níveis plasmáticos mantidos durante 4 a 5 horas. A metformina apresenta uma alta taxa de eliminação, com o pico de excreção urinária entre 1 e 3 horas após uma simples dose, e meia vida plasmática entre 1,5 e 4,5 horas (CASEY, 1979). A rápida excreção renal de metformina parece contribuir decisivamente para a ocorrência de poucos casos de acidose durante o tratamento (PENTIKAINEN et al., 1979).

Pénicaud et al. (1989), demonstraram que o trato digestivo é um dos sítios preferenciais de ação da metformina. Em ratos geneticamente obesos, metformina promoveu aumento da utilização de glicose pelo trato digestivo. Sugeriram que este efeito se relaciona à redução da glicemia decorrente do tratamento e, conseqüentemente, induziria a redução da insulinemia.

O tratamento com metformina também está relacionado com modificações no metabolismo lipídico. Em diabéticos tratados houve redução nas concentrações de colesterol plasmático e redução na incorporação do colesterol à parede aórtica, sugerindo um efeito protetor ao desenvolvimento de aterosclerose (MARQUIE, 1978). Riccio (1991) verificou que o tratamento com metformina promove diminuição da oxidação dos ácidos graxos livres no fígado. Nos tecidos periféricos a metformina pode induzir redução na oxidação dos ácidos graxos favorecendo a oxidação da glicose, fato

que se reflete na redução dos níveis de triglicérides plasmáticos e colesterol, como propuseram Wu et al. (1990).

Quanto à ação anti-hiperglicemiante exercida pela metformina, tem-se observado que ela induz elevação na captação de glicose por tecidos periféricos sem aumentar a secreção de insulina. Porém, para que o efeito hipoglicemiante se manifeste é preciso que a insulina esteja presente. Outra característica importante da metformina é não induzir hipoglicemia, mesmo em indivíduos normoglicêmicos (BAILEY, 1992; DeFRONZO et al., 1991). Todavia, em altas concentrações, a metformina inibe a secreção de insulina induzida pela glicose em ilhotas de Langerhans isoladas de ratos. Por outro lado, em ilhotas isoladas de porcos e ratos, o tratamento prévio com metformina exerceu efeito estimulante sobre a secreção de insulina induzida pela arginina (KUHL, 1979). Tem sido consenso que a metformina em concentrações terapêuticas não estimula a secreção de insulina (TAPPY, 1995).

A atividade anti-hiperglicemiante da metformina é multifatorial. Estes fatores são: supressão da liberação hepática de glicose, redução da absorção intestinal de glicose, aumento da sensibilidade dos hepatócitos à insulina, estimulação da captação de glicose por tecidos sensíveis à insulina e aumento do armazenamento de glicogênio (BAILEY, 1993; da SILVA, 1998).

Avaliações da inter-relação entre a metformina e o receptor de insulina demonstraram um aumento da afinidade do receptor sem induzir elevação no número destes receptores (VIGNERI et al., 1982).

Classicamente se observa em tecidos hepáticos e extra-hepáticos de diabéticos alterações no pós-receptor da insulina, favorecendo a hipótese de que a metformina pode ser um coadjuvante no tratamento do diabetes mellitus, porque possivelmente atue sobre os mecanismos pós-receptor da insulina (FOLEY et al., 1983).

Os efeitos *in vitro* da metformina sobre a ligação da insulina ao seu receptor e sua fosforilação foram avaliados em amostras de fígados de humanos, revelando que 0,3 - 300 mg/ml de metformina não afeta nenhum dos parâmetros. Na concentração de 400mg/ml verificou-se um aumento de 50% na fosforilação do receptor da insulina e na atividade da quinase ligada ao receptor sem afetar a ligação da insulina, demonstrando que a metformina exerce efeito em nível de pós-receptor potencializando o sistema

sinizador da insulina das quinases ou por eventos ligados à cascata de fosforilação iniciada pela insulina (FANTUS e BROSSEAU, 1986).

Os efeitos do tratamento com metformina sob a captação de glicose em adipócitos isolados de pacientes portadores de resistência à insulina, mostram que a metformina induz aumento no transporte de 3-O-metilglicose através de potencialização na translocação de transportadores de microsomas intracelulares sem afetar a expressão gênica dos transportadores (MATTHAEI e GRETEN, 1991).

Galuska et al. (1991), avaliaram o efeito de 0,1 mM de metformina, que corresponde à dose 10 vezes maior que a terapêutica sobre a população de transportadores de glicose em músculo esquelético de diabéticos resistentes à insulina, constatando que a metformina induz aumento na captação de glicose pelas fibras musculares, possivelmente alterando a atividade intrínseca dos transportadores ou recrutando mais transportadores de reservatórios citosólicos para a membrana plasmática.

Klip (1992), avaliando o transporte de glicose em células musculares em cultura, demonstrou que a metformina estimula a captação de 2-deoxiglicose e 3-O-metilglicose, cujo efeito se mostra tempo-dependente exibindo metade da estimulação máxima entre 5-6 horas e máxima capacidade em 18 horas. Tem sido sugerido que a metformina pode ativar o mecanismo de ação da insulina, aumentando a atividade do receptor de insulina levando a translocação dos transportadores de glicose GLUT4 para a membrana plasmática dos músculos esqueléticos (HOWLETT e BAILEY, 1999). Contudo, a presença de insulina é necessária para o efeito da metformina se manifeste.

Widen et al. (1992), estudaram a ação da metformina sobre o metabolismo periférico da glicose em diabéticos, constatando que a metformina preferencialmente inibe a oxidação da glicose, e pode interferir na fosforilação oxidativa das mitocôndrias, como sugerido por Klip e Paquet (1990). Possivelmente a metformina também estimula a enzima glicogênio sintetase muscular favorecendo a formação de glicogênio.

Uma vez que a metformina requer a presença de insulina para exercer o seu efeito, sua associação com as sulfoniluréias durante o tratamento de diabéticos tipo 2 tem sido promissora, reduzindo a concentração plasmática de glicose, de colesterol e triglicerídeos, reduzindo a glicosilação da hemoglobina, e contribuindo para diminuir o risco de desenvolvimento de arteriosclerose.

1.4- ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NEUROMUSCULAR

A estimulação elétrica funcional dos músculos é um recurso e área de investigação intensa, próspera e bastante utilizada no campo da fisioterapia. Dentre os inúmeros sistemas celulares que são ativados em decorrência da estimulação elétrica, temos a integração entre a dinâmica metabólica e as vias sinalizadoras celulares, a ativação ou inibição de vias específicas mantendo o músculo um tanto mais ativo e saudável (ROBINSON e SNYDER-MACKLER, 2001).

No que tange à funcionalidade da estimulação elétrica neuromuscular, devemos considerar que apesar desta técnica não substituir a ação fisiológica dos fatores neurotróficos, mostra ser uma estratégia com ação aditiva no comando neuromuscular sendo indicado em caso de fraqueza muscular, distensão muscular, incontidência, elevação ou perda do tônus muscular, espasticidade, imobilização muscular, desuso muscular.

É sabido que os músculos imobilizados apresentam modificações anatômicas, histológicas e fisiológicas diferenciando-os dos normais, uma vez que, a sucessão de fatos deflagrados pelo desuso traz conseqüências evidentes destacando-se a perda imediata da atividade voluntária do músculo e o desenvolvimento de atrofia muscular progressiva.

As ações da estimulação elétrica neuromuscular têm sido aplicadas em modelos experimentais que comprometem a dinâmica contrátil das fibras sendo demonstrado inúmeros benefícios para o músculo desnervado e para regeneração de tecidos biológicos (JAFFE e STERN, 1979).

Frente às ações deflagradas pela estimulação elétrica neuromuscular merecem destaque os cuidados quanto à aplicação desta técnica terapêutica considerando-se a forma e duração do pulso utilizado; o tipo de contração utilizada para estimular o músculo; a força de contração induzida; o número de contrações produzidas por período de tratamento; a duração de cada contração; o tempo de repouso entre as contrações e o número de sessões diárias ou semanais (WAKIN e KRUSEN, 1955).

Dentre as diferentes análises realizadas utilizando-se a estimulação elétrica neuromuscular destacamos a utilização no músculo esquelético desnervado onde a terapia trouxe inúmeros benefícios relacionados a elevação na força e resistência,

redução na fibrose mantendo as fibras em melhores condições metabólicas (SILVA, 1999; POLACOW, 2003) e ativação de sistemas celulares que permitem a elevação na captação de substratos energéticos.

Dos modelos utilizados para estudar os eventos deflagrados pela imobilização há uma técnica de suspensão do membro posterior de ratos gerando desuso e tem sido observado que a perda de massa tecidual não ocorre concomitantemente as modificações metabólicas sugerindo-se dissociação dos eventos (YOSHIDA et al., 2003). Neste modelo foi observado que a estimulação elétrica preveniu os eventos desencadeados pela suspensão promovendo aumento na força muscular, alterações na tensão máxima e na capacidade oxidativa (MISAWA, 2001).

Cabe ressaltar que já foi demonstrado através de análise morfométrica e técnicas estereológicas que os músculos estimulados eletricamente apresentam elevação na densidade dos capilares, na distância e fluxo capilar propiciando um reajuste na distribuição e sensibilidade dos receptores (HUDLICKA, 1982).

O foco do nosso estudo foi avaliar se a resistência insulínica desencadeada pelo tratamento com glicocorticóides na musculatura esquelética afeta também o metabolismo da musculatura respiratória.

Na prática clínica o uso de corticosteróides são amplamente utilizados tanto no tratamento crônico quanto agudo de diversas patologias como por exemplo na doença pulmonar obstrutiva crônica.

A miopatia é um quadro caracterizado por fraqueza e hipotrofia muscular, quadro freqüentemente encontrado nos pacientes sob corticoterapia. Nestes pacientes têm sido observado intensa fraqueza muscular comprometendo a função respiratória, o que pode levar ao quadro de insuficiência respiratória.

O conhecimento dos efeitos colaterais que o tratamento com corticosteróides promovem nos músculos respiratórios instigou-nos a buscar recursos farmacológicos, ou de outra natureza, que poderiam minimizar estes efeitos sendo selecionado os fármacos metformina e troglitazona e o recurso fisioterapêutico estimulação diafragmática elétrica transcutânea.

Neste contexto, resultados provenientes desta análise podem contribuir em estudos futuros direcionados a aplicação clínica dos métodos, contribuindo para a

manutenção de melhores condições metabólicas que possam refletir na melhora da qualidade de vida destes pacientes.

OBJETIVOS

2-OBJETIVOS

- 1- Determinar o período de implantação do estado de resistência à insulina com dexametasona através de teste de tolerância à insulina realizado após 3 e 5 dias de tratamento com glicocorticóide.
- 2- Avaliar o conteúdo de glicogênio dos músculos que participam do processo respiratório em ratos tratados com dexametasona e com substâncias sensibilizadoras da insulina metformina e troglitazona durante o período de 3 e 5 dias.
- 3- Avaliar o conteúdo de glicogênio dos músculos que participam do processo respiratório em ratos tratados com dexametasona associado a metformina e troglitazona durante o período de 3 e 5 dias.
- 4- Avaliar o efeito da aplicação de estimulação diafragmática elétrica transcutânea sobre as reservas musculares de glicogênio em ratos resistentes à insulina após administração de dexametasona.
- 5- Avaliar as respostas metabólicas apresentadas pelo ventrículo após tratamento com dexametasona.
- 6- Avaliar o número de leucócitos circulantes e dos linfócitos do timo na presença da estimulação diafragmática elétrica transcutânea.

MATERIAL E MÉTODOS

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- ANIMAIS

Utilizamos ratos albinos da linhagem Wistar, com idade variando de 3 a 4 meses alimentados com ração e água *ad libitum* sendo submetidos a condições controladas de biotério (ciclo fotoperiódico de 12h claro/escuro, e temperatura 23°C±2).

Os animais foram divididos em 13 grupos experimentais (n=5):

Controle
Tratado com dexametasona 3 dias
Tratado com dexametasona 5 dias
Tratado com metformina 3 dias
Tratado com metformina 5 dias
Tratado com troglitazona 3 dias
Tratado com troglitazona 5 dias
Tratado com dexametasona + metformina 3 dias
Tratado com dexametasona + metformina 5 dias
Tratado com dexametasona + troglitazona 3 dias
Tratado com dexametasona + troglitazona 5 dias
Tratado com estimulação diafragmática elétrica transcutânea
Tratado com dexametasona + estimulação elétrica transcutânea

3.2- TRATAMENTO COM DEXAMETASONA, TROGLITAZONA E METFORMINA

A dexametasona foi administrada na concentração de 1mg/kg peso pela via intraperitoneal. Os grupos experimentais tratados com troglitazona receberam a substância na concentração de 0.8mg/kg e os grupos tratados com metformina receberam a substância na concentração de 1.4mg/ml ambas diluídas na água para beber. Todos os tratamentos foram realizados durante 3 e 5 dias conforme modelo de resistência insulínica já descrito (SAAD et al; 1993). As dosagens foram escolhidas

tendo como parâmetros a meia vida plasmática que em média apresenta 2 – 3 mg/ml de sangue / 6-8 horas.

3.3- TRATAMENTO COM ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA

O equipamento utilizado para a estimulação elétrica foi o Dualpex 961 (Figura 1).

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/kg) e a região do tórax anterior tricotomizada para garantir um maior efeito da estimulação e do posicionamento dos eletrodos. Dois eletrodos de superfície de silicone-carbono com área de 1,5 x 2,0 cm cada e gel de acoplamento foram utilizados e posicionados bilateralmente logo abaixo do gradil costal (figura 2).

A estimulação elétrica foi realizada diariamente por 20 minutos durante 5 dias, sendo a frequência de 30Hz ($T_{ON}=1s$ e $T_{OFF}=1s$) e a largura de fase de 0,4ms. A intensidade da corrente foi padronizada em 5.0 mA, aumentando 1 mA a cada 5 minutos, para não haver acomodação, finalizando em 8.0 mA.

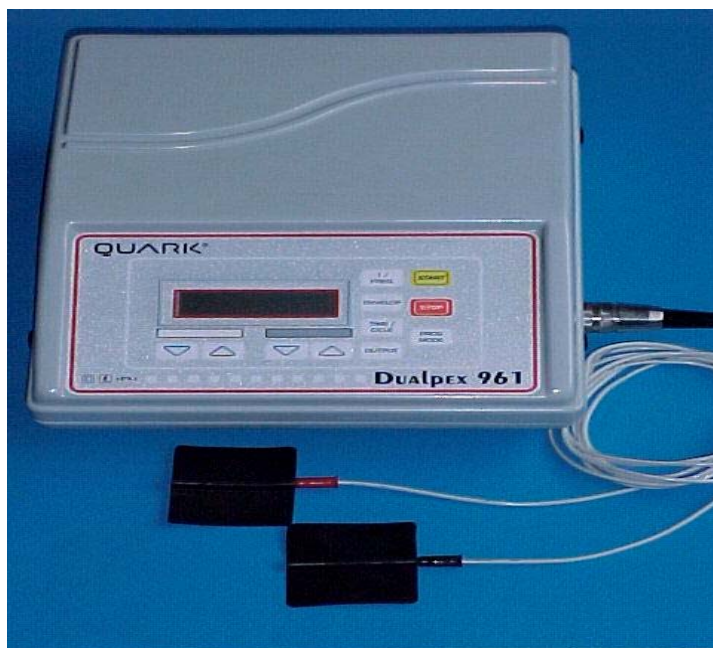


Figura 1. Equipamento Dualpex 961 (Quark[®]) utilizado para a realização da estimulação elétrica.



Figura 2. Estimulação elétrica realizada no animal através de dois eletrodos (1 e 2) de superfície acoplados com gel na região logo abaixo do gradil costal.

3.4- AMOSTRAGEM

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/Kg de peso, ip) para a coleta do sangue através da veia renal, o qual foi centrifugado por 10 minutos a 2500 rpm, o plasma separado e encaminhado para as avaliações bioquímicas.

Os músculos diafragma, abdominal e ventricular foram cuidadosamente isolados, retirados e encaminhados para as avaliações de proteínas totais e conteúdo de glicogênio muscular.

3.4.1- DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO MUSCULAR DE GLICOGÊNIO

As amostras do músculo foram digeridas em KOH 30% a quente e o glicogênio precipitado a partir da passagem por etanol a quente. Entre uma fase e outra da precipitação, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm durante 15 minutos. O glicogênio precipitado foi submetido à hidrólise ácida na presença de fenol, segundo a proposta de Siu et al., (1970). Os valores foram expressos em mg/100 mg de peso úmido.

3.4.2- DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS MUSCULAR

Amostras dos músculos foram separadas para a determinação das proteínas totais através de kit laboratorial da marca Bio Diagnóstica[®].

3.4.3- LEUCOMETRIA

O sangue do animal foi coletado em tubo de vidro (ensaio), com auxílio de um funil, contendo ácido etileno diamino tetracético (anticoagulante para hematologia) na concentração 100 microlitros para 3,5 ml de sangue.

Após a coleta do sangue, este foi homogeneizado e uma pequena quantidade da amostra, com auxílio de uma pipeta de 5-50 µl JENCONS SEALPETTE, foi retirado 10 µl de sangue o qual foi colocado em um tubo de plástico.

Em seguida, acrescenta-se a este tubo plástico 190 µl de corante Turkey e homogeniza com a pipeta. A câmara de Neubauer foi preenchida com a solução e as células contadas em microscópio de Luz, utilizando-se os quadrantes laterais da Câmara de Neubauer. Para obtenção do número de células o cálculo foi realizado como a seguir:

O valor da contagem foi dividido por 4 devido a contagem dos quatro campos e multiplicado pela diluição feita na solução de células o que resulta numa concentração 10^3 células/ml, aferida pela própria câmara de Neubauer.

3.4.4- DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA

A concentração plasmática de glicose foi determinada através de kit enzimático de utilização laboratorial (CELM- Reactoclin).

3.4.5- TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT)

Para a realização do ITT, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg) e após 40 min, foi feita uma incisão próxima à veia femural, onde foi coletado 0,25 ml de amostras de sangue. Após a primeira coleta foi injetado, via veia peniana, insulina regular da Biobrás, na dose de 1 U/kg. Amostras de sangue foram coletadas sucessivamente nos tempos 0; 2,5; 5; 10; e 20 min após a administração da insulina. A glicose plasmática foi avaliada por método enzimático.

3.4.6- OBTENÇÃO DOS LINFÓCITOS DO TIMO

Após a coleta de macrófagos torácicos, o timo foi localizado e retirado. Em seguida foi separado o tecido ganglionar linfóide do tecido gorduroso. As células foram obtidas através de um sistema composto de dois cilindros de aço inox de diferentes diâmetros, de modo que um se encaixe no outro, contendo cada cilindro um sistema de malhas na sua extremidade. O timo foi colocado entre os dois cilindros e através de movimentos circulares, este foi levemente comprimido, obtendo-se assim linfócitos íntegros e isolados. Ao tecido macerado foram adicionados 10 ml de PBS (4° C), sendo

a solução colocada num tubo de plástico e centrifugada por 1 minuto a 2000rpm para formação do Pellet. O sobrenadante foi descartado e o Pellet foi ressuspenso em 10 ml de PBS (4° C) sendo a solução diluída 10x. Desta solução foi coletada uma amostra de 100µL e colocada em outro tubo plástico do tipo Eppendorff, acrescentando-se 900µL de PBS (4° C) levando a uma diluição de 10x.

3.5- ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação estatística dos dados foram feita através de ANOVA seguido de teste “t” de student. Em todos os cálculos foi fixado o nível crítico de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

4- RESULTADOS

Os eventos que ocorrem após a ligação da insulina ao seu receptor são específicos e finamente regulados. Definir as etapas que levam à especificidade deste sinal representa um desafio para diferentes tipos de pesquisas, todavia podem resultar no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para pacientes que sofrem de estado de resistência à insulina.

Iniciamos o estudo avaliando a velocidade de decaimento da glicose plasmática KITT (decaimento representado pelo valor de B) de ratos controle, tratados com dexametasona 3 dias e tratados com dexametasona 5 dias. Nesta fase experimental, quando comparado ao controle ambos os tratamentos apresentaram médias de decaimento significativamente menores e proporcional ao período de tratamento sendo expressas pelos seguintes valores $5,13 \pm 0,24$ controle X $2,90 \pm 0,31$ De 3 dias x $2,35 \pm 0,18$ De 5 dias e representam mudanças na dinâmica de captação da hexose, como classicamente delineada como estado de resistência. Cabe salientar que as maiores mudanças são observadas no tratamento durante 5 dias (Figura 3).

Frente ao *status* de resistência à insulina deflagrado pelo tratamento agudo com dexametasona avaliamos sua ação sobre as reservas de glicogênio de músculos participantes da dinâmica respiratória e no ventrículo. Neste contexto, inicialmente observamos que no tratamento com o glicocorticoide durante 3 dias promoveu uma significativa elevação nas reservas glicogênicas representadas por valores 200% maiores no diafragma ($0,29 \pm 0,02$ mg/100mg controle x $0,87 \pm 0,04$ mg/100mg De, $p < 0,05$), 77% no abdominal ($0,26 \pm 0,03$ mg/100mg controle x $0,46 \pm 0,04$ mg/100mg De, $p < 0,05$) e 83% no músculo ventricular ($0,18 \pm 0,01$ mg/100mg controle x $0,33 \pm 0,09$ mg/100mg De, $p < 0,05$) (Figura 4).

Ainda dentro desta abordagem, passamos a avaliar o comportamento destas reservas após 5 dias de administração da dexametasona e verificamos que, ao contrário do observado no tratamento anterior as reservas foram reduzidas em relação ao grupo controle para 55% no diafragma ($0,29 \pm 0,02$ mg/100mg controle x $0,13 \pm 0,01$ mg/100mg De, $p < 0,05$), não apresentando alteração significativa para as reservas de glicogênio no músculo abdominal e ventricular (Figura 4).

Uma vez caracterizado o quadro de resistência insulínica, passamos a estudar os eventos glicogênicos ligados ao fármaco anti-hiperglicemiante metformina avaliando o tratamento durante 3 e 5 dias. Escolhemos a metformina por tratar-se de uma droga que aumenta a utilização periférica da glicose pelos tecidos musculares na presença da insulina; potencializando a ação insulínica através do aumento da afinidade de ligação aos receptores teciduais de insulina.

No tratamento durante 3 dias comparando o grupo tratado com metformina com o grupo controle observamos aumentos expressivos na concentração de glicogênio muscular representados: diafragma 214% ($0,29 \pm 0,02$ mg/100mg controle x $0,91 \pm 0,06$ mg/100mg M, $p < 0,05$), abdominal 81% ($0,26 \pm 0,03$ mg/100mg controle x $0,47 \pm 0,03$ mg/100mg M, $p < 0,05$) e ventricular 44% ($0,18 \pm 0,01$ mg/100mg controle x $0,26 \pm 0,02$ mg/100mg M, $p < 0,05$) (Figuras 5).

No tratamento com metformina durante 5 dias comparando este com o grupo controle obtivemos resultados bastante semelhantes ao encontrado com o tratamento durante 3 dias: diafragma 227% ($0,29 \pm 0,02$ mg/100mg controle x $0,95 \pm 0,004$ mg/100mg M, $p < 0,05$), abdominal 81% ($0,26 \pm 0,03$ mg/100mg controle x $0,47 \pm 0,01$ mg/100mg M, $p < 0,05$) e ventricular 39% ($0,18 \pm 0,01$ mg/100mg controle x $0,25 \pm 0,01$ mg/100mg M, $p < 0,05$) (Figuras 6).

Decidimos então inserir no contexto da proposta um segundo fármaco que também atua sobre os sistemas implicados na resistência insulínica sendo selecionado o sensibilizador da insulina troglitazona. Os resultados mostraram que se compararmos o grupo troglitazona 3 e 5 dias com o grupo controle os valores são similares aos encontrados no tratamento com metformina, exceto no ventrículo. A elevação nas reservas de glicogênio durante o tratamento 3 dias foi: no diafragma 234% ($0,29 \pm 0,02$ mg/100mg controle x $0,97 \pm 0,08$ mg/100mg T, $p < 0,05$), no abdominal 96% ($0,26 \pm 0,03$ mg/100mg controle x $0,51 \pm 0,05$ mg/100mg T, $p < 0,05$) e ventricular 94% ($0,18 \pm 0,01$ mg/100mg controle x $0,35 \pm 0,07$ mg/100mg T, $p < 0,05$) (Figura 5). No tratamento com troglitazona durante 5 dias se comparado ao grupo controle observa-se aumento significativo para os músculos diafragma 224% ($0,29 \pm 0,02$ mg/100mg controle x $0,94 \pm 0,002$ mg/100mg T, $p < 0,05$), abdominal 88% ($0,26 \pm 0,03$ mg/100mg controle x $0,49 \pm$

0,002 mg/100mg T, $p<0,05$) e ventricular 94% ($0,18\pm 0,01$ mg/100mg controle x $0,35\pm 0,01$ mg/100mg T, $p<0,05$) (Figuras 6).

Comparamos ainda os efeitos da dexametasona 3 e 5 dias com o tratamento dexametasona associada a metformina no mesmo período. Neste experimento observamos que o tratamento (De+M) comparado com De durante 3 dias promoveu aumento significativo nas reservas de glicogênio somente para o músculo diafragma que foi da ordem de 23% ($0,87\pm 0,04$ mg/100mg De x $1,07\pm 0,02$ mg/100mg De+M, $p<0,05$) (Figura 7), os demais músculos não apresentaram mudança significativa (Figura 7). Por outro lado, o tratamento (De+M) comparado com De ambos realizado durante 5 dias mostrou que as reservas foram aumentadas de forma bastante significativa em todos os músculos; no diafragma 323% ($0,13\pm 0,01$ mg/100mg De x $0,55\pm 0,08$ mg/100mg De+M, $p<0,05$); no abdominal 325% ($0,16\pm 0,008$ mg/100mg De x $0,68\pm 0,02$ mg/100mg De+M, $p<0,05$) e ventricular 278% ($0,14\pm 0,01$ mg/100mg De x $0,53\pm 0,08$ mg/100mg De+M, $p<0,05$) (Figuras 8).

O tratamento com (De+T) comparado com De ambos durante 3 dias promoveu elevação significativa nas reservas de glicogênio somente para o músculo diafragma 14% ($0,87\pm 0,04$ mg/100mg De x $0,99\pm 0,005$ mg/100mg De+T, $p<0,05$), não havendo modificação significativa para o músculo abdominal e ventricular (Figuras 7).

Os resultados encontrados com (De+T) comparado à dexametasona durante o período de 5 dias mostraram elevação e significativa nas reservas de glicogênio: no diafragma 100% ($0,13\pm 0,01$ mg/100mg De x $0,26\pm 0,03$ mg/100mg De+T, $p<0,05$), no abdominal 337% ($0,16\pm 0,008$ mg/100mg De x $0,70\pm 0,06$ mg/100mg De+T, $p<0,05$) e ventricular 214% ($0,14\pm 0,01$ mg/100mg De x $0,44\pm 0,07$ mg/100mg De+T, $p<0,05$) (Figuras 8).

Há vários estudos relacionando o exercício físico e o aumento da captação de glicose no músculo. Trabalhos referem que um único período de exercício pode aumentar a taxa de captação de glicose no músculo esquelético em contração. Este processo é regulado pela translocação dos transportadores de glicose GLUT 4 para a membrana plasmática. O exercício e a insulina utilizam diferentes caminhos de sinalização que conduzem a ativação do transporte de glicose.

Passamos então avaliar se a estimulação diafragmática elétrica transcutânea teria o mesmo efeito uma vez que esta forma terapêutica promove a contração muscular.

Comparamos então o grupo que realizou estimulação diafragmática elétrica transcutânea durante o período de 5 dias com o grupo controle e observamos que as reservas de glicogênio aumentaram para os músculos: diafragma 148% ($0,29 \pm 0,02$ mg/100mg controle x $0,72 \pm 0,31$ mg/100mg E, $p < 0,05$) e abdominal 146% ($0,26 \pm 0,03$ mg/100mg controle x $0,64 \pm 0,06$ mg/100mg E, $p < 0,05$), não existindo diferença significativa para o músculo ventricular (Figura 9).

Sabendo-se que o glicocorticoide provoca resistência insulínica, avaliamos se a estimulação diafragmática elétrica transcutânea melhora este quadro. Analisamos as reservas de glicogênio entre o grupo (De+E) comparado ao grupo De ambos tratado durante 5 dias e observamos que as reservas de glicogênio tornaram-se elevadas nos músculos diafragma 115% ($0,13 \pm 0,01$ mg/100mg De x $0,28 \pm 0,03$ mg/100mg De+E, $p < 0,05$); abdominal 281% ($0,16 \pm 0,008$ mg/100mg De x $0,61 \pm 0,07$ mg/100mg De+E, $p < 0,05$) e ventricular 100% ($0,14 \pm 0,01$ mg/100mg De x $0,28 \pm 0,04$ mg/100mg De+E, $p < 0,05$) (Figura 9).

Analisamos então as proteínas totais de grupo tratado com De 5 dias comparado ao grupo controle e não verificamos mudança significativa para o músculo diafragma. No entanto para o músculo abdominal tivemos aumento de 75% ($7,08 \pm 0,30$ g/dL controle x $12,39 \pm 1,22$ g/dL De, $p < 0,05$) (Figura 10).

Por sua vez, realizamos a contagem dos linfócitos do timo do grupo E comparado ao grupo controle verificamos aumento de 65% ($98,24 \pm 7,79$ controle x $162,43 \pm 7,94$ E, $p < 0,05$) e do grupo De+E comparado ao controle houve elevação de 115% ($98,24 \pm 7,79$ controle x $211,2 \pm 15,91$ De+E), ambos os tratamentos foram realizados no período de 5 dias (Figura 11). Por outro lado, ao avaliarmos a leucometria entre os grupos acima descritos, não observamos mudança significativa (Figura 12).

Por fim, avaliamos a glicemia comparando o grupo E 5 dias com grupo controle e o grupo De+E no mesmo período com o controle não observamos mudança significativa para ambos os grupos apesar de haver uma tendência a elevação (Figura 13).

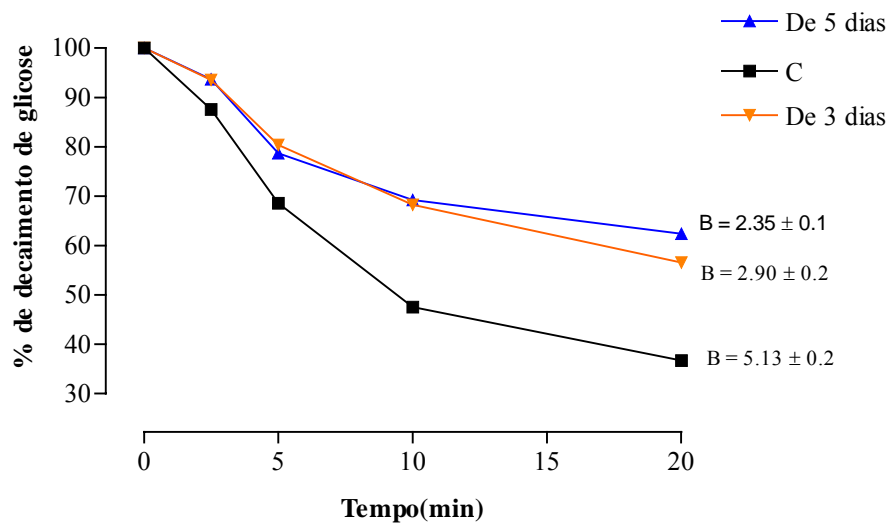


Figura 3. Porcentagem de decaimento da glicose após a administração de insulina regular (1U/Kg iv) após a coleta de amostra no tempo zero (T0). Os valores estão expressos em porcentagem, tomando como 100% a glicose no T0. Os grupos estão assim representados: Controle (C), tratado com Dexametasona por 3 dias (De 3 dias) e 5 dias (De 5 dias).

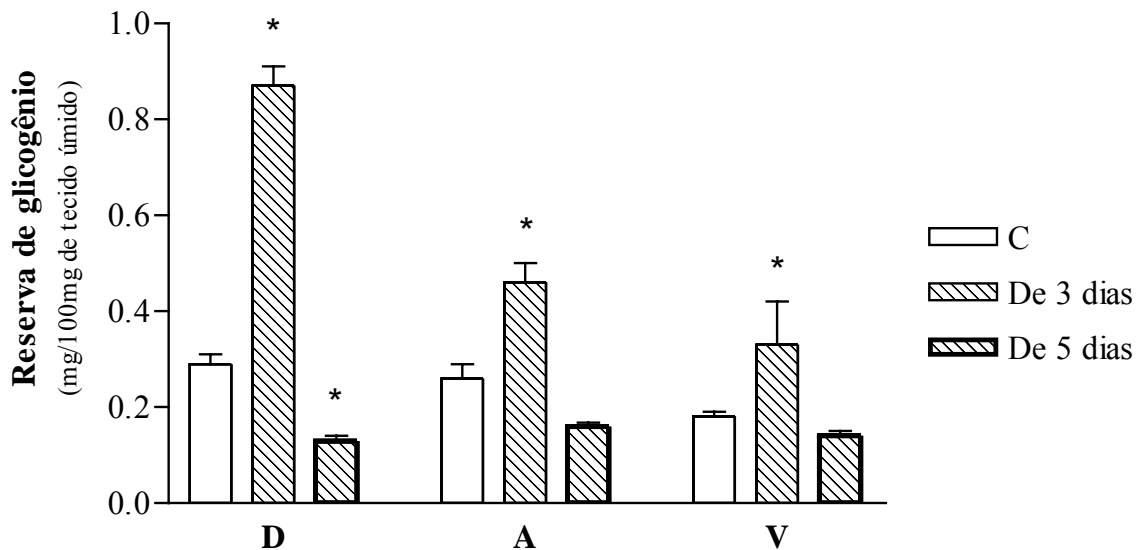


Figura 4. Reserva de glicogênio nos músculos Diafragma (D), Abdominal (A) e Ventricular (V) dos grupos Controle (C), tratado com Dexametasona (1mg/Kg) por 3 dias (De 3 dias) e 5 dias (De 5 dias). Valores expressos em média \pm epm. * $p < 0.05$ comparado ao C.

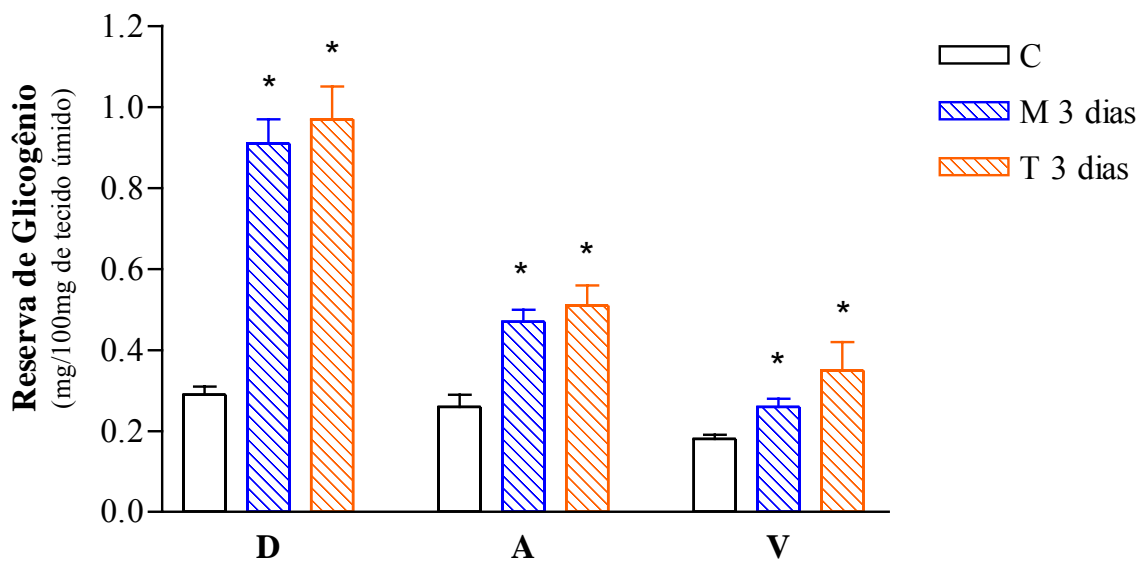


Figura 5. Reserva de glicogênio nos músculos Diafragma (D), Abdominal (A) e Ventricular (V) dos grupos Controle (C), tratado com Metformina (1.4mg/ml) por 3 dias (M 3 dias) e Troglitazona (0.8mg/Kg) por 3 dias (T 3 dias). Valores expressos em média \pm epm. * $p < 0.05$ comparado ao C.

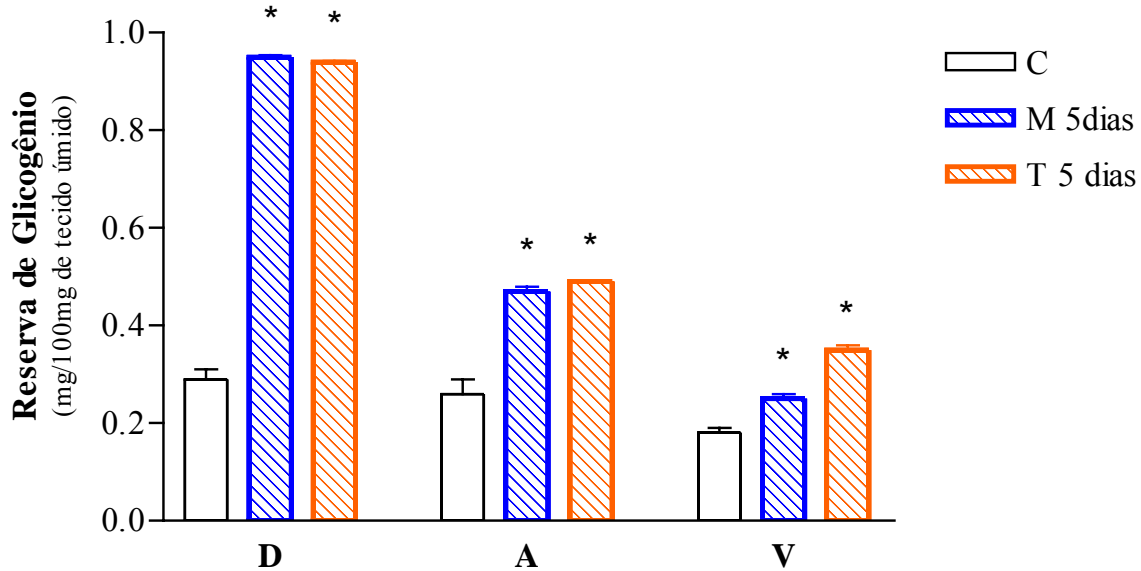


Figura 6. Reserva de glicogênio nos músculos Diafragma (D), Abdominal (A) e Ventricular (V) dos grupos Controle (C), tratado com Metformina (1.4mg/ml) por 5 dias (M 5 dias) e Troglitazona (0.8mg/Kg) por 5 dias (T 5 dias). Valores expressos em média \pm epm. * $p < 0.05$ comparado ao C.

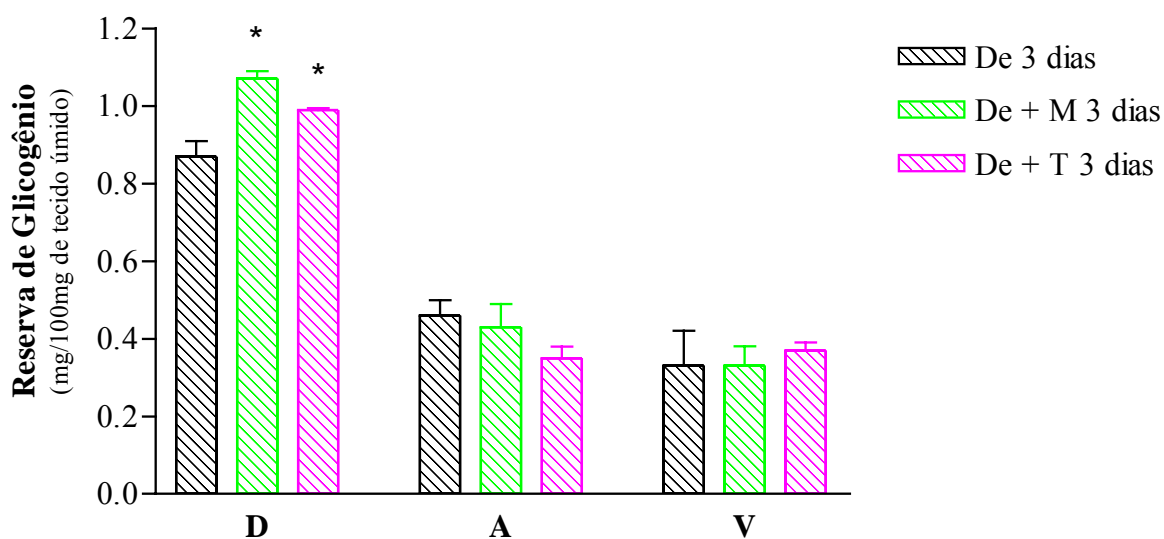


Figura 7. Reserva de glicogênio nos músculos Diafragma (D), Abdominal (A) e Ventricular (V) dos grupos tratado com Dexametasona (1mg/Kg) por 3 dias (De 3 dias) tratado com Dexametasona + Metformina (1.4mg/ml) por 3 dias (De+M 3 dias) e Dexametasona+Troglitazona (0.8mg/Kg) por 3 dias (De+T 3 dias). Valores expressos em média \pm epm, * $p < 0.05$ comparado ao De 3 dias.

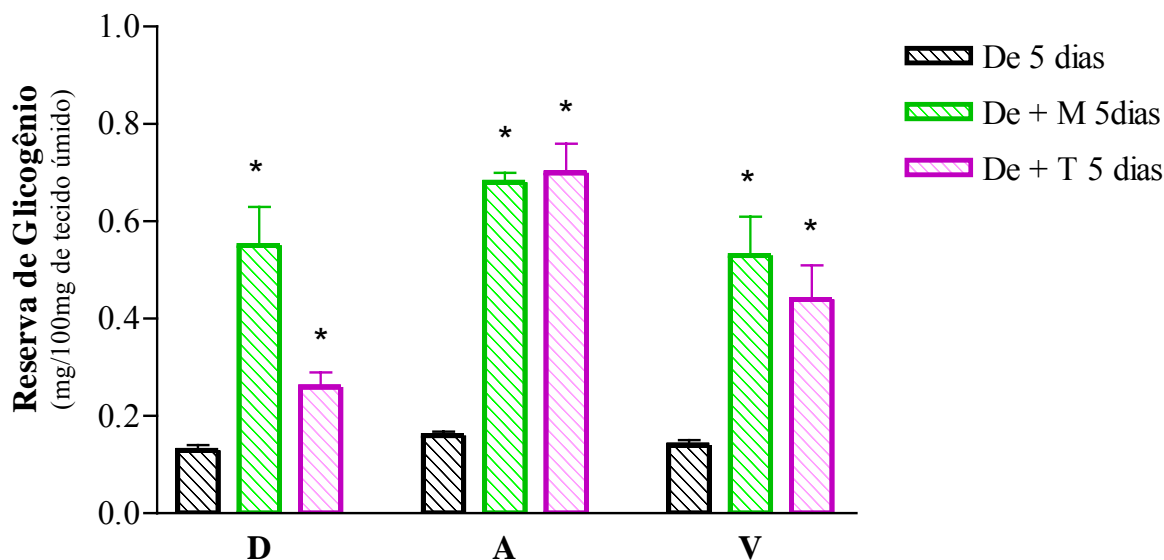


Figura 8. Reserva de glicogênio nos músculos Diafragma (D), Abdominal (A) e Ventricular (V) dos grupos tratados com Dexametasona (1mg/Kg) por 5 dias (De 5 dias) com Dexametasona+Metformina (1.4mg/ml) por 5 dias (De+M 5 dias) e Dexametasona+Troglitazona (0.8mg/Kg) por 5 dias (De+T 5 dias). Valores expressos em média \pm epm. * $p < 0.05$ comparado ao De 5 dias.

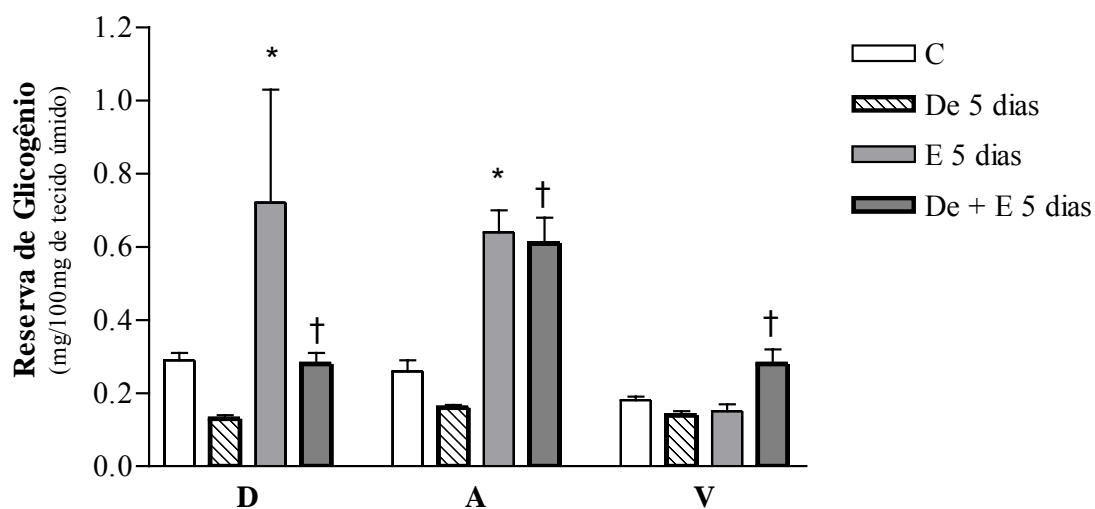


Figura 9. Reserva de glicogênio nos músculos Diafragma (D), Abdominal (A) e Ventricular (V) dos grupos Controle (C), tratados com Dexametasona (1mg/Kg) por 5 dias (De 5 dias), com Eletroestimulação por 5 dias (E 5 dias) e Dexametasona+Eletroestimulação por 5 dias (De+T 5 dias). Valores expressos em média \pm epm, * $p < 0.05$ comparado ao C, † $p < 0.05$ comparado ao De 5 dias.

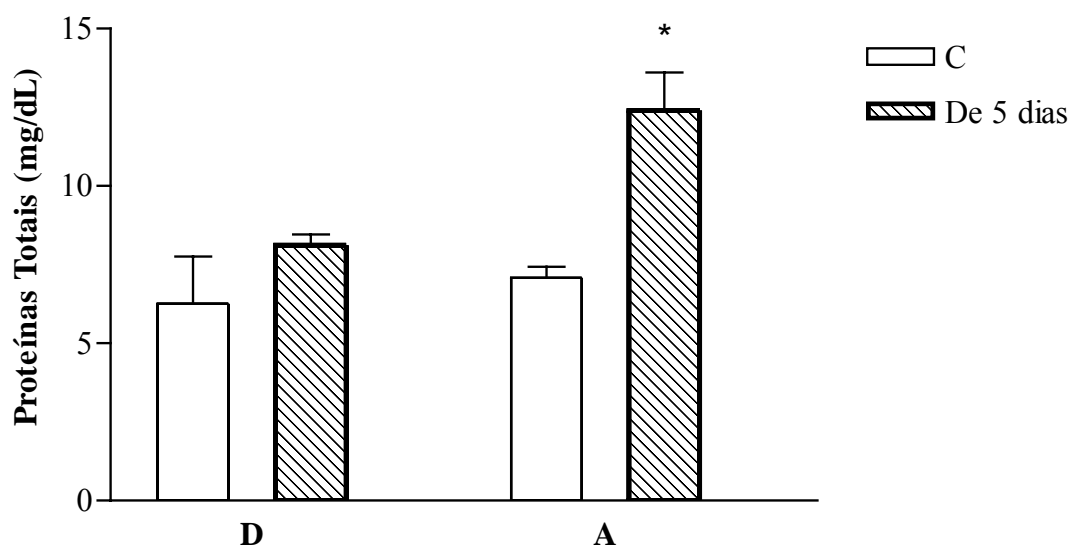


Figura 10. Concentração de proteínas totais (g/dL) nos músculos Diafragma (D) e Abdominal (A) dos grupos Controle (C) e tratado com Dexametasona (1mg/Kg) por 5 dias (De 5 dias). Valores expressos em média \pm epm. * $p < 0.05$ comparado ao C.

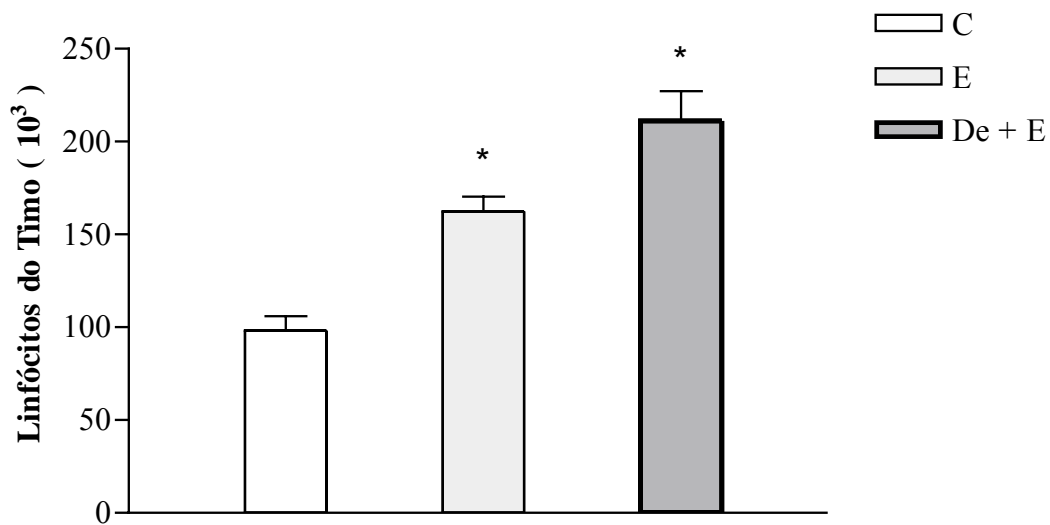


Figura 11. Número de linfócitos do timo (10^3) do grupo Controle (C), tratado com estimulação diafragmática elétrica transcutânea (E) e Tratado com Dexametasona (1mg/Kg) + E (De + E) durante 5 dias. Valores expressos em média \pm epm. * $p < 0.05$ comparado ao C.

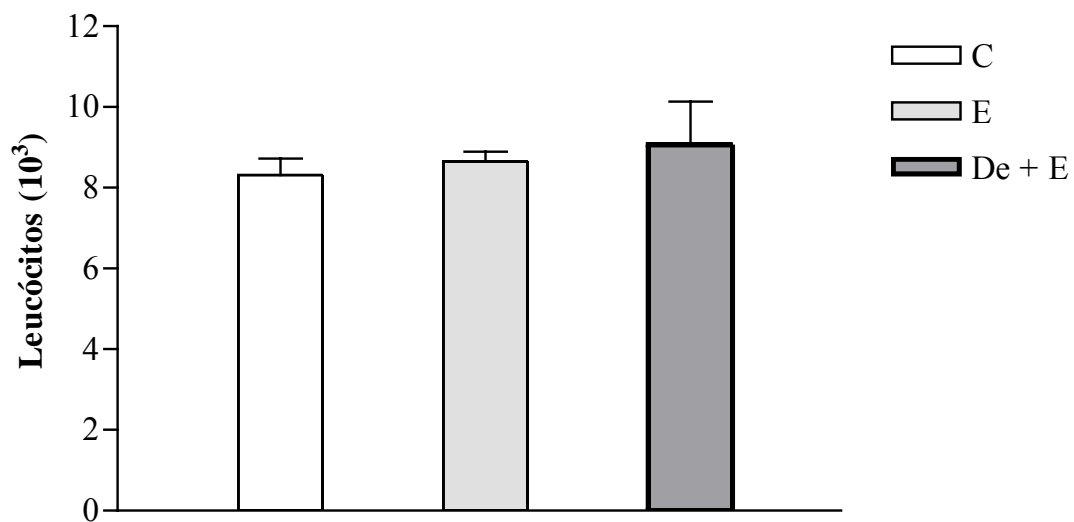


Figura 12. Número de leucócitos (10^3) do grupo Controle (C), tratado com estimulação diafragmática elétrica transcutânea (E) e Tratado com Dexametasona (1mg/Kg) + E (De + E) durante 5 dias. Valores expressos em média \pm epm, $p < 0.05$ comparado ao C.

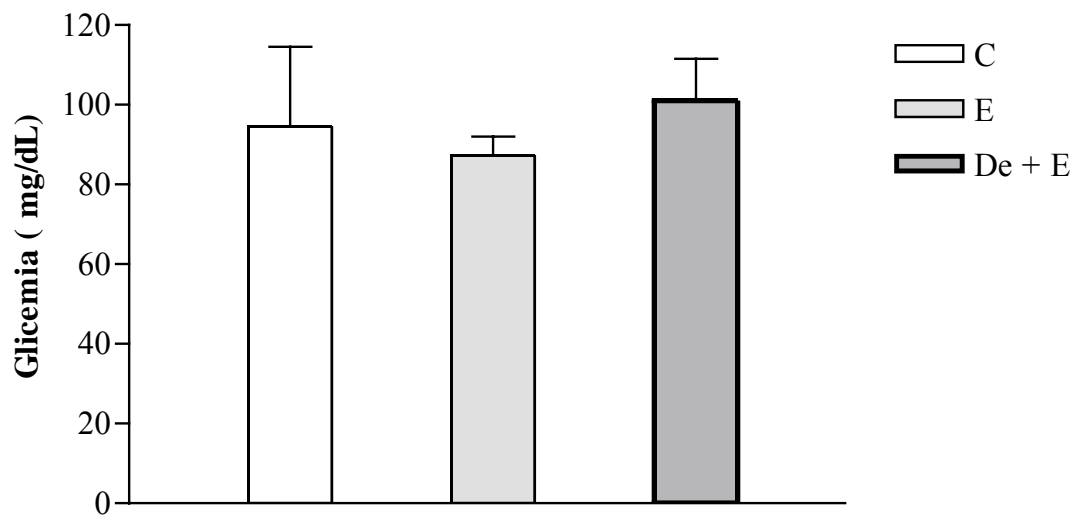


Figura 13. Glicemia (mg/dL) do grupo Controle (C), tratado com estimulação diafragmática elétrica transcutânea (E) e Tratado com Dexametasona (1mg/Kg) + E (De + E) durante 5 dias. Valores expressos em média ± epm. $p < 0.05$ comparado ao C.

DISCUSSÃO

5- DISCUSSÃO

Dentre as ações metabólicas ligadas aos glicocorticóides merece destaque sua participação no metabolismo intermediário de proteínas, lipídeos e carboidratos onde, observa-se aumento do catabolismo protéico, lipólise, aumento da glicogênese e da gliconeogênese hepática. Além disso, tem sido observado que concomitante ao tratamento com glicocorticóide desencadeia-se modificações na sensibilidade dos tecidos periféricos à insulina. Em especial, nos pacientes diabéticos, os glicocorticóides também promovem elevação na concentração plasmática de lipídeos e aumentam a formação de corpos cetônicos. Observam-se ainda, inúmeros efeitos dos glicocorticóides sobre os demais sistemas e tecidos merecendo destaque o tecido ósseo, o sistema cardiovascular, o sistema renal, as reservas teciduais do cálcio, além do crescimento tecidual (CASTRO e CASTRO, 1999).

A resistência insulínica é um quadro clínico bem conhecido que pode ser desenvolvido farmacologicamente frente ao excesso de glicocorticóide ou ainda em um estado patológico onde há hiperplasia da zona fasciculada da supra-renal. Na década de 90, um estudo onde foram utilizadas células sanguíneas, fibroblastos e adipócitos, mostrou que os glicocorticóides promovem diminuição na taxa de transporte de glicose estimulada pela insulina bem como alteração na eficácia da ligação da insulina ao seu receptor (TANAKA et al., 1992). Em ratos, a administração de cortisol não afeta o número ou afinidade dos receptores de insulina no músculo esquelético, mas reduz a fosforilação do receptor tirosina quinase pela insulina, sugerindo que os efeitos ocorrem na interface pós-receptor levando a uma diminuição indireta do transporte de glicose mediado pela insulina (BLOCK et al., 1989). No músculo esquelético, foi demonstrado que o excesso de glicocorticóides não diminui o conteúdo de transportadores GLUT-4, mas inibe a ação dos transportadores de glicose de forma indireta (DIMITRIADIS et al., 1997).

Neste estudo, optamos por utilizar o glicocorticóide sintético dexametasona visto sua ampla utilização na clínica, por ter ação 30 vezes maior que o cortisol e apresentar baixa atividade mineralocorticóide. A dose utilizada foi 1mg/kg/dia pela via intraperitoneal (3 e 5 dias) de acordo com a proposta de Saad et al. (1993).

Queremos salientar que o foco inicial do estudo foi avaliar a implantação do quadro de resistência à insulina e se este promove alterações nas reservas glicogênicas da musculatura respiratória.

Iniciamos este trabalho realizando um teste de tolerância à insulina (ITT) em ratos tratados com dexametasona durante 3 dias. No ITT apresentado na Figura 3, pode-se observar que o decaimento percentual de glicose (valor de B) passou de $5,13 \pm 0,2\%/min$ no grupo controle para $2,90 \pm 0,3\%/min$ no grupo tratado com dexametasona durante 3 dias, representando redução de 43% no índice de decaimento da glicose. Avaliação similar realizada em um grupo de ratos tratados com dexametasona durante 5 dias mostra o decaimento percentual de glicose (valor de B) que estava em $5,13 \pm 0,2/min$ no grupo controle passou para $2,35 \pm 0,01/min$ no grupo tratado com dexametasona, representando 54% no índice de decaimento da glicose. Este índice é indicativo de uma velocidade de decaimento menor do que a observada no grupo tratado com o glicocorticóide durante 3 dias, que representa o estado de resistência à insulina acompanhando Saad et al.,1993.

Com relação ao comportamento das reservas glicogênicas dos músculos diafragma, abdominal e ventricular durante o tratamento de 3 dias com dexametasona (Figura 4), observamos que houve elevação nas reservas, fato importante pois aponta e acompanha os estudos que verificaram que a dexametasona ativa as células β das ilhotas de Langerhans aumentando a concentração de AMPcíclico e conseqüentemente elevando a secreção de insulina induzida pela glicose (PHILIPPE et al., 1992). Esta hipótese foi recentemente reiterada por Bosqueiro et al. (2002) que ao avaliarem *in vitro* a secreção de insulina de ilhotas isoladas de ratos tratados com dexametasona observaram elevação na secreção induzida pela glicose. Esta insulinemia elevada pode, indiretamente, ser determinante e responsável pela elevação na formação destas reservas glicogênicas.

Ao avaliarmos o conteúdo de glicogênio da musculatura tratada com dexametasona durante 5 dias (Figura 4), observamos que neste período houve redução nas reservas diafragmáticas demonstrando que a implantação do estado de resistência insulínica acompanha a diminuição na atividade das vias glicogênicas e atinge este importante músculo participante do processo respiratório. Isto, possivelmente, pode estar ligado à redução na efetividade das vias insulínicas do músculo diafragma, evento

que se torna pronunciado a partir do quinto dia do tratamento. Assim, o hiperinsulinismo dessensibilizaria o tecido alvo (SAAD et al., 1993, 1992). Nosso trabalho acompanha ainda um recente estudo que demonstrou em ratos e camundongos tratados com dexametasona a redução na fosforilação tanto na subunidade IRS-1 quanto na enzima Akt hepática e muscular reiterando que a resistência à insulina envolve baixa na eficiência da sinalização insulínica (ROJAS et al., 2003). Destacamos que, nosso trabalho é pioneiro em demonstrar que a resistência insulínica atinge a musculatura respiratória com especial ação no diafragma sem observarmos expressão no músculo ventricular e abdominal.

Frente ao status de resistência insulínica, buscamos alternativas farmacológicas que pudessem auxiliar contra a redução da eficiência sinalizadora da insulina. Neste sentido, optamos por fármacos denominados sensibilizadores da insulina, representados pela biguanida metformina e pela tiazolinediona troglitazona.

Na seqüência experimental, direcionamos nossas ações para demonstrar a ação da metformina em relação às reservas de glicogênio tanto no tratamento com dexametasona durante 3 dias quanto durante 5 dias. Nesta condição, não observamos mudanças nas reservas de glicogênio se comparado ao grupo tratado com dexametasona 3 dias que já apresentava altas reservas em decorrência da ação do glicocorticoide. Isto indica que possivelmente há um ponto máximo de formação das reservas limitado pelas modificações no índice de hidratação celular e pelo gradiente osmótico. Assim, este ponto máximo pode ter sido atingido pela ação indireta da dexametasona, que tem sido apontado como agente insulínico (BOSQUEIRO et al., 2002). Por outro lado, quando avaliamos a ação da metformina após 5 dias de tratamento com o grupo controle, observamos que houve um aumento generalizado na formação das reservas musculares de glicogênio no diafragma, abdominal e ventricular, resultados muito semelhantes ao do tratamento com metformina 3 dias indicando que a biguanida foi eficaz em manifestar sua ação ativadora como substância sensibilizadora da insulina e assim ativar as vias de sinalização que podem estar comprometidas neste período de tratamento com dexametasona (WIERNSPERGER, 1996, GUNTON et al., 2003).

Nossos resultados mostram que, há uma inter-relação no tripé tempo de administração de glicocorticoide/alterações metabólicas/correção com sensibilizadores ou estimulação elétrica neuromuscular, e possivelmente a metformina interfira em

passos-chave do desencadeamento da resistência preservando a formação destas reservas energéticas.

Dentre uma nova classe de sensibilizadores da insulina denominada tiazolinedionas escolhemos a troglitazona no intuito de saber se o tratamento interfere nos passos da resistência insulínica induzida pela dexametasona. Neste sentido, nossos resultados mostram que, na presença da tiazolinediona apresentou uma expressiva elevação no conteúdo de glicogênio de forma generalizada, incluindo o diafragma, o abdominal e o ventricular, efeito que se expressou nos tratamentos durante 3 e 5 dias (Figuras 5 e 6). Estes dados têm apoio na literatura científica que mostra a troglitazona enquanto agente ativador de receptores nucleares chamados PPARs, os quais regulam a transcrição genética, a translação de proteínas envolvidas no metabolismo da glicose e lipídeos, estimulam a enzima PI-3quinase e Akt que são sistemas-chave na sinalização da insulina, normalizam a fosforilação, elevam a população muscular de receptores de insulina e a síntese de glicogênio (WILLSON et al., 2000; HEVENER et al., 2000; KIM et al., 2002).

Cabe ressaltar que o grupo tratado com troglitazona 3 dias se comparado ao grupo controle mostra maiores reservas glicogênicas dentro de um índice praticamente igual ao tratamento durante 5 dias e muito semelhante ao tratamento com metformina, exceto para o músculo ventricular que apresentou elevação nas reservas de glicogênio maior no grupo tratado com troglitazona 3 e 5 dias (Figuras 5 e 6) acompanhando outro estudo (PETERSEN e SHULMAN, 2002).

Um ponto que merece destaque é que o tratamento dexametasona mais metformina e dexametasona mais troglitazona durante período de 3 dias mostra aumento significativo, porém discreto apenas na musculatura diafragmática que foi de 23% e 14% respectivamente, não apresentando alteração para o músculo abdominal e ventricular, efeito atribuído a ação insulínica da dexametasona durante o período de 3 dias (BOSQUEIRO et al., 2002). Podemos a partir dos resultados sugerir que a resposta diafragmática esteja vinculada a responsividade deste músculo que pela sua importância no processo respiratório pode hierarquicamente ajustar suas dinâmicas antecedendo os demais músculos.

No transcorrer do nosso experimento, observamos que o grupo tratado com troglitazona associado ao glicocorticóide durante 5 dias, apresentou elevação nas

reservas glicogênicas assim como no grupo tratado com metformina mais dexametasona no mesmo período, exceto para o músculo diafragma que aumentou mais as reservas de glicogênio frente ao tratamento com metformina. Isto indica que a metformina também pode interferir na ação do glicocorticoide propiciando melhores condições energéticas (MATHIEU-COSTELLO et al., 2003)

O aprimoramento dos métodos fisioterapêuticos tem relação direta com a evolução da ciência experimental, principalmente porque permite o refinamento das análises e conseqüentemente dos parâmetros metodológicos buscando as melhores respostas do organismo com baixo comprometimento de outras funções. É neste contexto que está inserido a estimulação elétrica neuromuscular, visto que já foi demonstrado que inúmeros sistemas celulares são ativados na presença da corrente elétrica, destacando-se a integração entre a dinâmica metabólica e as vias sinalizadoras celulares, a ativação ou inibição de vias específicas buscando manter o músculo mais ativo indicando uma gama de opções terapêuticas clínicas em casos de fraqueza muscular, distensão muscular, incontinência, elevação ou perda do tônus muscular, espasticidade, imobilização muscular, desuso muscular (ROBINSON E SNYDER-MACKLER, 2001; JAFFE e STERN, 1979).

Nosso trabalho centrou suas ações na avaliação da estimulação diafragmática elétrica transcutânea em um modelo de resistência insulínica deflagrado pela administração do glicocorticoide dexametasona. Cabe ressaltar que o protocolo escolhido foi embasado na indução de contração da musculatura da caixa torácica de forma que a corrente elétrica chegasse a induzir contração diafragmática.

Neste aspecto e vinculado nos parâmetros elétricos utilizados neste trabalho observamos que a terapêutica promoveu uma expressiva elevação no conteúdo de glicogênio nos músculos diafragma e abdominal sem expressão no músculo ventricular refletindo as inter-relações funcionais existentes entre a elevação na frequência contrátil e as dinâmicas musculares de captação de glicose, uma vez que, ao iniciar a atividade contrátil a população de transportadores do tipo Glut 4 da membrana eleva-se favorecendo a captação de 25-50% maior (IHLEMANN et al., 2000). Tendo em vista que as amostras foram coletadas 24 horas após a finalização das sessões de estimulação elétrica, sugerimos a existência de um efeito residual sobre as reservas energéticas, uma vez que, tem sido relatado a existência de uma inter-relação funcional descrita pela

elevação na sensibilidade tecidual à insulina, na demanda energética, na captação da hexose e potencialização na atividade das vias responsáveis pela síntese de glicogênio, fato que persiste por 18h (CARTEE et al., 1989; AAS et al., 2002).

Na seqüência experimental avaliamos o comportamento das reservas glicogênicas na associação de tratamentos dexametasona/estimulação elétrica sendo observado um aumento generalizado e manifesto nos músculos diafragma e abdominal. Estes resultados sugerem que as ações ligadas a estimulação elétrica se expressam enquanto aumento na atividade das vias sinalizadoras da insulina que se apresenta reduzida na presença do glicocorticóide como demonstrado por SAAD et al.1993.

Consideração especial deve ser feita com relação ao comportamento das reservas glicogênicas ventriculares, uma vez que após a estimulação elétrica se comparado ao grupo controle, não verificamos modificação nas reservas de glicogênio. Diversos estudos “*in vitro*” realizados com cardiomiócitos constataram que as reservas glicogênicas ventriculares são moduladas por inúmeros fatores como a insulina, inervação autonômica ou controle serotoninérgico (FISCHER et al., 1996; ZORZANO et al., 1997). É provável que pelas características fisiológicas intrínsecas do músculo cardíaco a influência isolada da estimulação elétrica não modifique o padrão de contratilidade autônoma dos cardiomiócitos mantendo assim inalterada as reservas de glicogênio.

Assim, concomitante a elevação na atividade contrátil induzida eletricamente há elevação na atividade da proteína quinase ativada (AMPK) induzindo elevação na translocação do GLUT4 em resposta ao trabalho de contração ativando a captação da hexose (ZHENG et al., 2001). Possivelmente haja um controle fino de caráter protetor sobre a formação desta reservas, uma vez que o acúmulo de glicogênio na musculatura ventricular pode modificar parâmetros da fisiologia cardíaca, como já constatado no ventrículo de diabéticos que apresentam grandes reservas glicogênicas e conseqüentemente desenvolvem aumento na atividade da enzima glicogênio fosforilase, aumento no tempo da sístole representado pelo aumento no intervalo QT do eletrocardiograma tornando o coração mais susceptível aos efeitos de uma isquemia (HIGUCHI et al., 1995; da Silva et al.,2003).

Por outro lado ao avaliarmos o comportamento das reservas glicogênicas ventriculares na associação de tratamentos dexametasona/estimulação elétrica

observamos um aumento significativo nestas reservas. Isto sugere que a ação conjunta da estimulação elétrica com a dexametasona por 5 dias gerou neste músculo de características próprias um sinergismo evidenciado pelo aumento significativo nas reservas de glicogênio que não foram detectadas quando com a utilização da estimulação elétrica isoladamente refletindo em um novo status metabólico que prepondera a ativação das vias sinalizadoras insulínicas. No entanto, não descartamos que se trata de uma resposta ainda mais refinada envolvendo o aumento na aferência de sinais gerados na caixa torácica que migram em direção ao tronco encefálico ajustando finamente a dinâmica metabólica do sistema cardio-respiratório.

A seguir, ao avaliarmos na musculatura respiratória o conteúdo de proteínas totais observamos que no tratamento associado (dexametasona/estimulação elétrica) houve um aumento significativo somente no músculo abdominal, fato que possivelmente esteja vinculado ao espriamento da corrente elétrica da caixa torácica em direção ao abdome e com isto impondo um novo ritmo de atividade contrátil em forma de somatório àquela ativada no trabalho expiratório fisiológico, possivelmente a maior exigência funcional seja compensada por modificação no conteúdo proteico, porém um maior refinamento e definição da real resposta fisiológica somente será possível com outro estudo mais aprofundado.

Ao avaliarmos a glicemia observamos que as ações isoladas ou combinadas dos tratamentos não modificaram os parâmetros de normoglicemia, por isso não estão apresentados.

Por fim direcionamos nosso estudo na avaliação da leucometria e contagem de linfócitos no timo no grupo submetido a estimulação elétrica. Nesta fase experimental constatamos que não houve alterações no número de leucócitos circulantes, porém no timo a contagem de linfócitos foi expressivamente elevada. Estes dados estão referenciados nas fortes relações imunogênica geradas pelo aumento na contração muscular uma vez que há formação de citocinas locais e sistêmicas como o TNF, interleucinas 1 e 6 e interferon. Estes mediadores agem sobre a capacidade mitogênica dos leucócitos e efetivamente da resposta final celular e humoral (MOLDOVEANU et al., 2001).

É oportuno ressaltar que a utilização de corticosteróides e a estimulação diafragmática elétrica transcutânea são fatores que potencialmente podem interagir com

o sistema imunológico gerando uma resposta imunogênica secundária ao estresse farmacológico ou mecânico que inclui a leucocitose e o aumento e ativação de mediadores locais e sistêmicos da resposta inflamatória (NAKAGAWA et al., 1998; NATALE et al., 2003).

O conjunto de dados mostra que os benefícios da estimulação elétrica diafragmática estão vinculados à melhora nas condições metabólicas minimizando o status de resistência e propiciando uma melhor resposta imune.

CONCLUSÃO

6- CONCLUSÃO

Concluimos que a indução do status de resistência insulínica e suas alterações metabólicas foram estabelecidas com a administração de dexametasona durante 5 dias e atingiu a musculatura diafragmática. As alterações do metabolismo de glicose induzidas pela dexametasona nos músculos diafragma, abdominal e cardíaco foram minimizadas com o uso dos sensibilizadores da insulina (metformina e troglitazona). A estimulação elétrica mostrou ser um recurso fisioterapêutico aplicado à musculatura respiratória que promove uma melhora substancial nas condições energéticas. As substâncias sensibilizadoras da insulina e a estimulação elétrica são recursos disponíveis no tratamento de pacientes com resistência insulínica ou no tratamento de pacientes pneumopatas que fazem uso agudo ou crônico de corticosteróides, propiciando a melhora nas reservas energéticas e assim minimizando quadros de descompensação respiratória.

Por fim sugerimos que mais estudos nesse sentido devem ser desenvolvidos visando propiciar uma análise mais aprimorada que auxilie no tratamento fisioterapêutico e repercuta na melhora da qualidade de vida desses pacientes.

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAS, V. et al. Electrical stimulation improves insulin responses in a human skeletal muscle cell model of hyperglycemia. **Ann N Y Acad Sci**, v.967, p.506-15, 2002.

ALJADA, A.; DANDONA, P. Effect of insulin on human aortic endothelial nitric oxide synthase. **Metabolism**, v.49, p.147-150, 2000.

AMATRUDA, J. M.; LIVINGSTON, J. N.; LOCKWOOD, D. H. Cellular mechanisms in selected states of insulin resistance human obesity, glucocorticoid excess, and chronic renal failure. **Diabetes Metab Rev**, v.1, n.3, p.293-317, 1985.

ARODA, V. R.; HENRY, R. R. Thiazolidinediones: potential link between insulin resistance and cardiovascular disease. **Diabetes Spectrum**, v.16, n.2, p.120-5, 2003.

ARONOFF, S. et al. Pioglitazone hydrochloride monotherapy improves glycemic control in the treatment of patients with type 2 diabetes: A 6-month randomized placebo-controlled dose-response study. **Diabetes Care**, v.23, p.1605-11, 2000.

ASKARI, A.; VIGNOS, P.J. Jr.; MOSKOWITZ, R. W. Steroid myopathy in connective tissue disease. **Am J Med**, v.61, n.4, p.485-92, 1976.

BAILEY, C. J. Biguanide and NIDDM. **Diabetes Care**, v.15, p.755-72, 1992.

BAILEY, C. J. Metformin, and update. **Gen Pharmacol**, v.24, n.6, p.1299-309, 1993.

BEVAN, P. Insulin signaling. **J Cell Sci**, v.114, n.8, p.1429-30, 2001.

BLOCK, N. E.; BUSE, M. G. Effects of hypercortisolemia and diabetes on skeletal muscle insulin receptor function in vitro and in vivo. **Am J Physiol**, v.256, n.1, p.39-48, 1989.

BOSQUEIRO, J. R.; CARNEIRO, E. M.; BOSCHERO, A. C. Tratamento com dexametasona estimula a secreção de insulina pelas ilhotas de Langerhans. **V Congresso Paulista de Diabetes e Metabolismo**. Sociedade Paulista de Diabetes e Metabolismo. São Pedro, S.P, 2002.

BURANT, C. F. Mammalian glucose transporters: esturcture and molecular regulation. **Recent Prog Horm Res**, v. 47, p.349-88, 1991.

CAMPBELL, I. W. Management of type 2 diabetes mellitus with special reference to metformin therapy. **Diabete Metab**, v.17, n.2, p.191-6, 1991.

CAREY, D. G. Effect of rosiglitazone on insulin sensitivity and body composition in type 2 diabetic patients. **Obes Res**, v.10, p.1008-15, 2002.

CARTEE G. D. et al. Prolonged increase in insulin-stimulated glucose transport in muscle after exercise. **Am J Physiol**, v.256, n.4, p. E 494-9, 1989.

CARTER-SU, C.; OKAMOTO, K. Inhibition of hexose transport in adipocytes by dexamethasone: role of protein synthesis. **Am J Physiol**, v.248, n.1, p.215-23, 1985.

CASEY, C. Metformin: absorption and disposition in healthy subjects and in diabetic patients. **Br J Clin Pharmacol**, v.8, n.4, p.382-3, 1979.

CASTRO F. M.; CASTRO M. L. **Corticosteróides nas alergias respiratórias**. São Paulo: Vivali, 1999.

da SILVA, E. C. **Modificações das reservas metabólicas em ratos sedentários e treinados tratados com metformina**. Monografia de Graduação da Faculdade de Educação Física da Universidade de Campinas (UNICAMP), 1998.

da SILVA E. C. et al. Cardiac function in isolated heart of diabetic rat. Effect of metformin treatment under ischemia. XVIII Reunião Annual da Federação da Sociedade de Biologia Experimental- FeSBE, 27 a 30 de agosto, n. 03,040,2003.

DAWIS, S. N.; GRANNER, D. K. Insulin, oral hypoglycemic agent and pharmacology of the pancreas. In: GOODMAN; GILMAN'S **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9^o ed., Mc Graw Hill, 1996, p.1487-1517.

DeFRONZO, R. A.; BARZILAI, N.; SIMONSON, D. C. Mechanism of metformin action in obese and lean noninsulin-dependent diabetes subjects. **J Clin Endocrinol Metab**, v.73, n.6, p.1294-301, 1991.

DeFRONZO, R. A. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. **Ann Intern Med**, v.131, p.281-303, 1999.

DIMITRIADIS, G. et al. Effects of glucocorticoid excess on the sensitivity of glucose transport and metabolism to insulin in rat skeletal muscle. **Biochem J**, v.321, n.3, p.707-12, 1997.

EBELING, P. et al. Concentration of the complement activation product, acylation-stimulating protein, is related to C-reactive protein in patients with type 2 diabetes. **Metabolism**, v.50, p.283-7, 2001.

EXTON, J. H. et al. Carbohydrate metabolism in perfused livers of adrenalectomized and steroid – replaced rats. **Am J Physiol**, v.230, n.1, p.163-70, 1976.

EXTON, J. H. Mechanisms of hormonal regulation of hepatic glucose metabolism. **Diabetes Metab Rev**, v.3, n.1, p.163-83, 1987.

FANTUS, I. G.; BROSSEAU, R. Mechanism of action of metformin: insulin receptor and post-receptor effects in vitro and in vivo. **J Clin Endocr**, v.63, n.4, p.898-905, 1986.

FESTA, A. et al. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: The insulin resistance atherosclerosis study. **Circulation**, v.102, p.42-7, 2000.

FREED, M. I. et al. Effects of rosiglitazone alone and in combination with atorvastatin on the metabolic abnormalities in type 2 diabetes mellitus. **Am J Cardiol**, v.90, p.947-52, 2002.

FISCHER Y. et al. Signals mediating stimulation of cardiomyocyte glucose transport by the α -adrenergic agonist phenylephrine. **Am J Physiol**, v.270, p. 1211-20C, 1996.

FOLEY, J. E. et al. Improvement in vitro insulin action after one month of insulin therapy in obese noninsulin – dependent diabetics: measurements of glucose transport and metabolism, insulin binding, and lipolysis in isolated adipocytes. **J Clin Invest**, v. 72, p.1901, 1983.

FOLLI, F.; SAAD, M. J.; KAHN, C. R. Insulin receptor / IRS-1 / PI 3-kinase signalling system in corticosteroid – induced insulin resistance. **Acta Diabetol**, v.33, n.3, p.185-92, 1996.

GALUSKA, D. et al. Metformin increases insulin - stimulated glucose transport in insulin resistant human skeletal muscle. **Diabete & Metabolism**, v.17, p.159-63, 1991.

GOLDFINE, I. D. The insulin receptor: molecular biology and transmembrane signaling. **Endocr Rev**, v.8, n.3, p.235-55, 1987.

GUNTON, J. E. et al. Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. **J Clin Endocrinol Metab**, v.88, n.3, p.1323-32, 2003.

HABER, R. S.; WEINSTEIN, S. P. Role of glucose transporters in glucocorticoid-induced insulin resistance. GLUT4 isoform in rat skeletal muscle is not decreased by dexamethasone. **Diabetes**, v.41, n.6, p.728-35, 1992.

HAFFNER, S. M. et al. Insulin sensitivity in subjects with type 2 diabetes. Relationship to cardiovascular risk factors: The insulin resistance atherosclerosis study. **Diabetes Care**, v.22, p.562-68, 1999.

HEVENER, A. L.; REICHART, D.; OLEFSKY, J. Exercise and thiazolidinedione therapy normalize insulin action in the obese Zucker fatty rat. **Diabetes**, v.49, p.2154-59, 2000.

HIGUCHI M. et al. Role of high glycogen in underperfused diabetic rat hearts with added norepinephrine. **J Cardiol Pharm**, v.26, p.899-907, 1995.

HOWLETT, H. C. S.; BAILEY, C. J. A risk-benefit assessment of metformin in type 2 diabetes mellitus. **Drug Safety**, v.20, n.6, p.489-503, 1999.

HUDLICKA, O . Growth of capillaries in skeletal and cardiac muscle. **Circ Res**, v.50 n.4, p. 451-61, 1982.

IHLEMANN J. et al. Effect of stimulation frequency on contraction-induced glucose transport in rat skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.279, n.4, p.E862-7, 2000.

YOSHIDA, N. et al. Electrical stimulation prevents deterioration of the oxidative capacity of disuse-atrophied muscle in rats. **Aviat Space Environ Med**, v.74, n.3, p.207-11, 2003.

JACKSON, R. A. Mechanism of metformin action in non-insulin-dependent diabetes. **Diabetes**, v.36, n.5, p.632-40, 1987.

JAFFE, L. F.; STERN, C. D. Strong electrical currents leave the primitive streak of chick embryos. **Science**, v.206, n.4418, p.569-71, 1979.

JOHNSON, M. D. Review and assessment of its role in the treatment of patients with impaired glucose tolerance and diabetes mellitus. **Ann Pharmacother**, v.32, p.337-48, 1998.

KABURAGI, Y. The mechanism of insulin-induced signal transduction mediated by the insulin receptor substrate family. **Endocr J**, v.46, p.25-34, 1999.

KATZ, J.; MCGARRY, J. D. The glucose paradox. Is glucose a substrate for liver metabolism? **J Clin Invest**, v.74, p.1901-9, 1984.

KIM, Y. B. Troglitazone but not metformin restores insulin-stimulated phosphoinositide 3-kinase activity and increases p110 [β] protein levels in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects. **Diabetes**, v.51, p.443-8, 2002.

KIM H. I. et al. Peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma upregulates glucokinase gene expression in beta-cells. **Diabetes**, v.51, n.3, p.676-85, 2002.

KLIP, A.; PAQUET, M. R. Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. **Diabetes Care**, v.13, p.228-43, 1990.

KLIP, A. Stimulation of hexose transport by metformin in L6 muscle cells in culture. **Endocrinology**, v.130, n.5, p.2535-44, 1992.

KOENIG, W. C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men. **Circulation**, v.99, p.237-42, 1999.

KUHL, C. The effect of metformin on the arginine induced insulin-and glucagon release in pigs. **Acta Pharmacol Toxicol** , v.44, n.3, p.235-7, 1979.

KUHNE, M. R. et al. The insulin receptor substrate 1 associates with the SH2 – containing phosphotyrosine phosphatase Syp. **J Biol Chem**, v.268, n.16, p.11479-81, 1993.

LAVAN, B. E.; LANE, W. S.; LIENHARD, G. E. The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin – treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. **J Biol Chem**, v.272, n.17, p.11439-43, 1997.

LEBOVITZ, H. E. Rosiglitazone monotherapy is effective in patients with type 2 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v.86, p.280-8, 2001.

LEIGHTON, B. et al. Effects of dexamethasone treatment on insulin – stimulated rates of glycolysis and glycogen synthesis in isolated incubated skeletal muscles of the rat. **Biochem J**, v.246, n.2, p.551-4, 1987.

MARQUIE, G. Effect of metformin on lipid metabolism in the rabbit aortic wall. **Atherosclerosis**, v.30, n.3, p.165-75, 1978.

MATHIEU-COSTELLO O. et al. Regulation of skeletal muscle morphology in type 2 diabetic subjects by troglitazone and metformin: relationship to glucose disposal. **Metabolism**, v.52, n.5, p.540-6, 2003.

MATTHAEI, S.; GRETEN, H. Evidence that metformin ameliorates cellular insulin-resistance by potentiating insulin-induced translocation of glucose transporters to the plasma membrane. **Diabetes Metab**, v.17, n.2, p.150-8, 1991.

MEACHAM, L. R. et al. Predictors of change in insulin sensitivity during glucocorticoid treatment. **Horm Metab Res**, v.29, n.4, p.172-5, 1997.

MERIDEN, T. Progress with thiazolidinediones in the management of type 2 diabetes mellitus. **Clinical Therapeutics**, v.26, n.2, p.177-90, 2004.

MIYAZAKI, Y. Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. **J Clin Endocrinol Metab**, v.87, p.2784-91, 2002.

MISAWA, A. The effects of therapeutic electric stimulation on acute muscle atrophy in rats after spinal cord injury. **Arch Phys Med Rehabil**, v.82, n.11, p.1596-603, 2001.

MYERS, M. G. Jr.; WHITE, M. F. Insulin signal transduction and the IRS proteins. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.36, p.615-58, 1996.

MOLDOVEANU A. I.; SHEPHARD R. J.; SHEK P.N. The cytokine response to physical activity and training. **Sports Med**, v.31, n.2, p. 115-44, 2001.

MOLLER, D. E. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. **Nature**, v.414, p.821-27, 2001.

MUECKLER, M. Family of glucose-transporter genes. Implications for glucose homeostasis and diabetes. **Diabetes**, v.39, n.1, p.6-11, 1990.

NAKAGAWA M. et al. Glucocorticoid-induced granulocytosis: contribution of marrow release and demargination of intravascular granulocytes. **Circulation**, v.98, n.21, p.2307-13, 1998.

NATALE V. M. et al. Effects of three different types of exercise on blood leukocyte count during and following exercise. **São Paulo Med J**, v.121, n.1, p.9-14, 2003.

NOLAN, J. J. Improvement in glucose tolerance and insulin resistance in obese subjects treated with troglitazone. **N Engl Med**, v.331, p.1188-93, 1994.

NOSADINI, R. Effect of metformin on insulin stimulated glucose turnover and insulin binding to receptors in type II diabetes. **Diabetes Care**, v.10, p.62-7, 1987.

OVALLE, F.; BELL, D.S. Lipoprotein effects of different thiazolidinediones in clinical practice. **Endocr Pract**, v.8, p.406-10, 2002.

OVALLE, F.; BELL, D. S. Clinical evidence of thiazolidinedione-induced improvement of pancreatic β -cell function in patients with type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Obes Metab**, v.4, p.56-9, 2002.

PARK, K. S. Troglitazone effects on gene expression in human skeletal muscle of type 2 diabetic subjects involve upregulation of PPAR gamma. **J Clin Endocrinol Metab**, v.83, p.2830-35, 1998.

PARULKAR, A. A. et al. Nonhypoglycemic effects of thiazolidinediones. **Ann Intern Med**, v.134, p.61-71, 2001.

PÉNICAUD, L. Hipoglycaemic effect of metformin in genetically obese (fa/fa) rats results from an increase utilization of blood glucose by intestine. **Biochem J**, v.262, p.881-5, 1989.

PENTIKAINEN, P. J.; NEUVONEN, P. J.; PENTTILA, A. Pharmacokinetics of metformin after intravenous and oral administration to man. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 16, p.195-202, 1979.

PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. **Am J Cardiol**, v.90, n.5, p.11-18, 2002.

PHILIPPE, J. et al. Cyclic adenosine monophosphate prevents the glucocorticoid-mediated inhibition of insulin gene expression in rodent islet cells. **J Clin Invest**, v.90, p.2228-33, 1992.

POLACOW, M. L. O. et al. Estudo morfológico do músculo sóleo denervado de ratos tratados pela associação de metformina e estimulação elétrica. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v.7, n.1, p. 57-64, 2003.

PORTER, L. E. Rosiglitazone reduces proinsulin/insulin ratio and improves β -cell function in type 2 diabetes. **Diabetologia**, v.43, (Suppl 1), p.A191, 2000.

RICCIO, A. Glucose and lipid metabolism in non-insulin- dependent diabetes. Effect of metformin. **Diabete Metab**, v.17, n.2, p.180-4, 1991.

RICHARDSON, J.M. et al. Differential regulation of glucose transport activity and expression in red and white skeletal muscle. **J Biol Chem**, v. 266, p.12690-4, 1991.

ROBINSON, A. J.; SNYDER-MACKLER L. **Eletrofisiologia Clínica**. 2^oed. Porto Alegre: Artmed, 2001.

ROJAS, F. A.; HIRATA, A. E.; SAAD, M. J. Regulation of insulin receptor substrate-2 tyrosine phosphorylation in animal models of insulin resistance. **Endocrine**, v.21, n.2, p.115-22, 2003.

ROSEN, O. M. After insulin binds. **Science**, v.237, n.4821, p.1452-8, 1987.

SAAD, M. J. et al. Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. **J Clin Invest**, v.90, n.5, p.1839-49, 1992.

SAAD, M.J. et al. Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. **J Clin Invest**, v.92, n.4, p.2065-72, 1993.

SAAD, M. J. et al. Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK 2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. **J Biol Chem**, v.271, n.36, p.22100-4, 1996.

SALTIEL, A. R.; OLEFSKY, J.M. Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. **Diabetes**, v. 45, p.1661-9, 1996.

SCHAFER, G. Biguanides. A review of history, pharmacodynamics and therapy. **Diabete Metab**, v.9, n.2, p.148-63, 1983.

SCHLESSINGER, J. Mutational analysis of the epidermal growth factor – receptor kinase **Biochem Soc Symp**, v.56, p.13-19,1990.

SESTI, G. Molecular mechanism of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: role of the insulin receptor variant forms. **Diabetes Metab Res Rev** , v.17, n.5, p.363-73, 2001.

SILVA, E. Evaluation of electromyographic activity and heart rate responses to isometric exercise. The role played by muscular mass and type. **Braz J Med Biol Res**, v.32, n.1, p.115-20, 1999.

SIU, L. O.; RUSSEAU, J. C.; TAYLOR, A. W. Determination of glycogen in small tissue samples. **J Appl Physiol**, v.28, n.2, p.234-36, 1970.

SPIEGELMAN, B. M. PPAR- γ : adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. **Diabetes**, v.47, p.507-14, 1998.

SUN, X. J. et al. Structure of the insulin receptor substrate IRS – 1 defines a unique signal transduction protein. **Nature**, v.352, n.6330, p.73-7, 1991.

TAYLOR, R. Insulin action. **Clin Endocrin**, v.34, p.159-71, 1991.

TAMEMOTO, H. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. **Nature**, v.372, n.6502, p.182-6, 1994.

TANAKA, H. et al. Glucocorticoid receptor and inhibition of 3-O-methyl-D-glucose uptake by glucocorticoids in peripheral blood leukocytes from normal humans: correlation between receptor level and hormone effect in vitro. **Acta Endocrinol**, v.126, n.1, p.29-36, 1992.

TAPPY, L. Regulation of hepatic glucose production in healthy subjects and patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabete Metab**, v.21, n.4, p.233-40, 1995.

WAKIM, K. G.; KRUSEN, F. H. The influence of electrical stimulation on the work output and endurance of denervated muscle. **Arch Phys Med Rehabil**, v.36, n.6, p.370-6, 1955.

WIDEN, E. I. M.; ERIKSSON, J. G.; GROOP, L. C. Metformin normalizes nonoxidative glucose metabolism in insulin-resistant normoglycemic first-degree relatives of patients with NIDDM. **Diabetes**, v.41, p.354-58, 1992.

WIERNSPERGER, N. F. Preclinical pharmacology of biguanides. **Handb Exp Pharmacol**, v.119, p.305-58, 1996.

WILLSON, T. M. et al. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. **J Med Chem**, v.43, p.527-50, 2000.

WU, M. S. et al. Effect of metformin on carbohydrate and lipoprotein metabolism in NIDDM patients. **Diabetes Care**, v.13, p.1-8, 1990.

VANSTAPEL, F. et al. Induction of hepatic glycogen synthesis by glucocorticoids is not mediated by insulin. **Mol Cell Endocrinol**, v.27, n.1, p.107-14, 1982.

VIGNERI, R. et al. Comparison of the in vitro effect of biguanides and sulfonylureas on insulin binding of its receptors in target cells. **J Clin Endocrinol Metab**, v.54, n.1, p.95-100, 1982.

ZHENG D. et al. Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase. **J Appl Physiol**, v.91, p.1073-83, 2001.

ZORZANO A. et al. Regulation of glucose transport, and glucose transporters expression and trafficking in the heart studies in cardiac myocytes. **Am J Cardiol**, v.80, n.3A, p.65-76A, 1997.