

ROBERTA BORGES DE CASTRO

Influência da resistência insulínica na quantidade de RNA mensageiro do receptor glicocorticóide (GR α) em tecido adiposo, músculo e linfócitos.

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Medicina.

SÃO PAULO
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ROBERTA BORGES DE CASTRO

Influência da resistência insulínica na quantidade de RNA mensageiro do receptor glicocorticóide (GR α) em tecido adiposo, músculo e linfócitos.

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Medicina.

Área de Concentração: Pediatria

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Longui

SÃO PAULO
2010

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pela Biblioteca Central da
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo

Castro, Roberta Borges de

Influência da resistência insulínica na quantidade de RNA mensageiro do receptor glicocorticóide ($GR\alpha$) em tecido adiposo, músculo e linfócitos./ Roberta Borges de Castro. São Paulo, 2010.

Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Curso de Pós-Graduação em Medicina.

Área de Concentração: Pediatria

Orientador: Carlos Alberto Longui

1. Receptores de glucocorticóides/genética 2. Resistência à insulina 3. Dexametasona 4. Cirurgia torácica 5. Tecidos

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à minha família:

Aos meus pais, Nabor Antônio de Castro e Adaltiva Borges de Castro, que dedicados à minha formação moral e profissional, proporcionaram-me um alicerce familiar seguro e acolhedor.

Ao meu marido, Sílvio Camargos de Souza, por sua compreensão e carinho, e pela sua presença em todos os momentos.

Ao meu irmão, Leonardo Borges de Castro, de quem muito me orgulha.

A todos os meus amigos pelo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Longui, Professor Titular da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo e Chefe Clínico Adjunto do Departamento de Pediatria da Santa Casa de São Paulo, meu orientador, por despertar o meu interesse pela pesquisa científica, pelo exemplo, apoio, paciência e por tudo que me ensinou.

À Equipe de Cirurgia Cardíaca da Santa Casa de São Paulo, especialmente ao Prof. Dr. Luiz Antônio Rivetti, ao Dr. Wilson Lopes Pereira, ao Dr. Eduardo Gregório Chamlian, à Dra. Valquíria Pelisser Campagnucci, ao Dr. Sylvio Matheus de Aquino Gandra, à Dra. Ana Maria Rocha Pinto Silva e ao Dr. Daniel Bartholo de Hyppolito, pela parceria e por proporcionar a concretização deste trabalho.

À Dra. Cláudia Dutra Costantin Faria, médica assistente II da Unidade de Endocrinologia Pediátrica da Santa Casa de São Paulo, pelo exemplo de dedicação, pelos ensinamentos e carinho.

À Dra. Mylene Neves Rocha, Professora Instrutora do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo e Flávio Richetti, mestre em ciências fisiológicas e biólogo do Laboratório de Medicina Molecular, por me acolherem no Laboratório de Medicina Molecular e pelo auxílio operacional na realização deste trabalho.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ΔR_n - Diferença entre intensidade luminosa do receptor e emissor, depois e antes de uma fase de extensão da PCR

11 β -HSD- 11beta-hidroxiesteróide desidrogenase

AGEs- Produtos Finais de Glicação Avançada (*Advanced Glycation End Products*)

AP1- Proteína de Ativação 1

BCR- *Breakpoint Cluster Region*

CBG- Globulina Carreadora de Corticosteróide

CBP- *CREB-Binding Protein*

CCD- *Charged-Coupled-Device*

DNAc- DNA complementar

Ct- Ciclo-limite (“*Cycle Threshold*”)

DAC- Doença Arterial Coronariana

DCV- Doença Cardiovascular

DMSO- Dimetil-sulfóxido

ECA- Enzima Conversora de Angiotensina

FAM- 6-carboxi-fluoresceína

GLUT- Proteína Transportadora de Glicose

GR- Receptor Glicocorticóide

GRE- Elemento Responsivo ao Glicocorticóide

HHA- Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

HOMA- *Homeostatic Model Assessment*

hsp- Proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*)

IDF- *International Diabetes Federation*

IGF - *Insulin-like Growth Factor*

ISCMSP- Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo

IRS- Substratos do Receptor de Insulina (*Insulin Receptor Substrate*)

LPL- Lipoproteína Lipase

MAPK- *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MCP-1- Proteínas Quimioatraentes de Monócitos e Macrófagos 1

MR- Receptor Mineralocorticóide

mTOR- *Mammalian Target of Rapamycin*

RNAm- RNA mensageiro

NCBI- *National Center for Biotechnology Information*

NCEP-ATP III- *National Cholesterol Education Program - Third Adult Treatment Panel III*

NFκB- Fator nuclear κB

NO- Óxido Nítrico

PAI-1- Inibidor do Ativador de Plasminogênio 1 (*Plasminogen Activator Inhibitor -1*)

PAMPs- *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

PBS- Tampão Fosfatosalina (*Isotonic Phosphate Buffered Saline Solution*)

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase chain reaction*)

PI(3)K- *Phosphatidylinositol 3-Kinase*

PKB - Proteína Kinase B

PRRs - *Pattern Recognition Receptors*

RINDM- Resistente à Insulina Não-Diabético

STAT- *Signal Transducer and Activator of Transcription*

SUMO- *Small Ubiquitin-Related Modifier*

TAMRA- 6-carboxi-tetrametilrodamina

Taq- *Thermus Aquaticus*

TLRs - *Toll-like Receptor*

T_m- Temperatura de Dissociação

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral α

SUMÁRIO**PÁGINA**

1- INTRODUÇÃO.....	1
2- REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1- As doenças cardiovasculares.....	3
2.2- A síndrome metabólica.....	4
2.3- A resistência insulínica.....	4
2.4- O tecido adiposo como um órgão endócrino.....	8
2.5- Os glicocorticóides.....	11
2.6- O receptor glicocorticóide (GR).....	15
2.7- Avaliação da sensibilidade aos glicocorticóides.....	17
3- OBJETIVOS.....	21
4- CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	22
4.1- Teste de supressão com dose muito baixa de dexametasona intravenosa.....	25
4.2- Separação de células mononucleares.....	25
4.3- Extração de RNA.....	26
4.4- Reação enzimática de transcrição reversa.....	26
4.5- Escolha de oligonucleotídeos e sondas.....	27
4.6- Gene normalizador.....	28
4.7- A reação de PCR em tempo real.....	28
4.8- Análise estatística.....	33
5- RESULTADOS.....	34
5.1- Achados antropométricos.....	34
5.2- Achados laboratoriais.....	36
5.3- Quantificação do RNA mensageiro (RNAm) de GR α	37
5.4- Avaliação da sensibilidade hipotálamo-hipofisária aos glicocorticóides.....	42
5.5- Resultados apresentados em relação à presença ou ausência de síndrome metabólica.....	46
6- DISCUSSÃO.....	49
7- CONCLUSÕES.....	60
8- ANEXOS.....	61
9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
RESUMO.....	81
ABSTRACT.....	82
APÊNDICES.....	83

ÍNDICE DE TABELAS		PG
TABELA 1:	Reação de transcrição reversa.....	27
TABELA 2:	Preparo das soluções utilizadas na PCR em tempo real.....	31
TABELA 3:	Sexo, idade, dados antropométricos e pressão arterial de pacientes submetidos à cirurgia cardíaca divididos em grupos quanto à presença ou ausência de resistência à insulina, segundo HOMA IR.....	35
TABELA 4:	Parâmetros metabólicos dos grupos resistentes e não-resistentes à insulina, classificados pelo HOMA IR.....	36
TABELA 5:	Avaliação hormonal dos pacientes resistentes e não-resistentes à insulina, classificados pelo HOMA IR.....	37
TABELA 6:	Quantidade de RNAm de GR α /BCR nos linfócitos e tecidos adiposo subcutâneo, músculo, adiposo visceral dos pacientes submetidos à cirurgia cardíaca (n=35).....	38
TABELA 7:	Quantificação do RNAm do GR α (GR α /BCR) nos tecidos entre os grupos de resistentes e não-resistentes à insulina, classificados pelo HOMA IR.....	39
TABELA 8:	Coeficientes de correlação de Pearson da quantificação do RNAm do GR α em relação ao RNAm do gene normalizador BCR (GR α /BCR) nos diferentes tecidos dos pacientes submetidos à cirurgia cardíaca (n=35).....	40
TABELA 9:	Coeficientes de correlação de Pearson da quantificação do RNAm do GR α (GR α /BCR) nos diferentes tecidos dos pacientes não-resistentes à insulina, segundo classificação do HOMA IR (n=22).....	40
TABELA 10:	Coeficientes de correlação de Pearson da quantificação do RNAm do GR α (GR α /BCR) nos diferentes tecidos dos pacientes resistentes à insulina, segundo classificação HOMA IR (n=13).....	40
TABELA 11:	Coeficientes de correlação de Pearson da quantificação do RNAm do GR α (GR α /BCR) nos diferentes tecidos com o cortisol sérico e com o HOMA IR dos pacientes não-resistentes à insulina (n=22).....	41
TABELA 12:	Avaliação laboratorial e antropométrica de dezessete pacientes realizada no momento cirúrgico e 60 dias após a cirurgia.....	42

TABELA 13:	Coeficientes de correlação de Pearson entre o percentual de supressão do cortisol pós-dexametasona e as variáveis antropométricas e laboratoriais de pacientes com resistência insulínica (n=10).....	45
TABELA 14:	Coeficientes de correlação de Pearson entre o percentual de supressão do cortisol pós-dexametasona e as variáveis antropométricas e laboratoriais de pacientes com síndrome metabólica (n=13).....	45
TABELA 15:	Avaliação molecular do GR α (GR α /BCR) em diferentes tecidos de pacientes com ou sem síndrome metabólica.....	46
TABELA 16:	Achados clínicos dos pacientes de acordo com a presença ou ausência de síndrome metabólica.....	47
TABELA 17:	Resultados laboratoriais dos pacientes de acordo com a presença ou ausência de síndrome metabólica.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

PG

FIGURA 1:	Sensibilidade aos glicocorticóides e doença cardiovascular.....	2
FIGURA 2	Mecanismo dos glicocorticóides na patofisiologia da síndrome metabólica.....	13
FIGURA 3	Esquemática do mecanismo de ação do receptor glicocorticóide.....	16
FIGURA 4:	Desenho do estudo.....	24
FIGURA 5:	Representação da PCR em tempo real.....	29
FIGURA 6:	Gráfico de amplificação por PCR em tempo real.....	30
FIGURA 7:	Curva-padrão de GR α e BCR obtida em experimento.....	32
FIGURA 8:	Comparação da quantidade de RNAm de GR α entre os diferentes tecidos.....	38
FIGURA 9:	Quantificação do RNAm do GR α no tecido adiposo visceral epicárdico (VC) nos pacientes não-resistentes à insulina (NRI; n=22), resistentes à insulina não-diabéticos (RI; n=8) e diabéticos (DM; n=5).....	39
FIGURA 10:	Correlação do cortisol sérico com a unidade de expressão de GR α em músculo nos pacientes submetidos à cirurgia cardíaca (n=35)..	41
FIGURA 11:	Cortisol sérico no momento da cirurgia e cortisol basal sérico (F0) 60 dias após a cirurgia (n= 17).....	43
FIGURA 12:	Quantificação de RNAm do GR α (GR α /BCR) em linfócitos de quatorze pacientes avaliados no momento da cirurgia cardíaca (LINFÓCITOS 1) e 60 dias após a cirurgia (LINFÓCITOS 2).....	43
FIGURA 13:	Correlação do percentual de supressão do cortisol sérico após dexametasona e a insulinemia.....	44
FIGURA 14:	Correlação entre o percentual de supressão do cortisol sérico após dexametasona e o HOMA IR avaliado no dia do teste (HOMA IR 2).....	44
FIGURA 15:	Mecanismo adaptativo dos níveis de RNAm do GR α e sensibilidade glicocorticóide durante a resistência insulínica.....	56

ÍNDICE DE ANEXOS	PG
ANEXO 1: Definições de síndrome metabólica.....	61
ANEXO 2: Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes sem resistência insulínica, classificados pelo HOMA IR (n= 22).....	62
ANEXO 3: Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com resistência insulínica, classificados pelo HOMA IR (n= 13).....	65
ANEXO 4: Concentração de cortisol basal e após 120 minutos da dexametasona intravenosa, percentual de supressão do cortisol, concentração de glicemia, insulinemia, HOMA IR e quantidade de RNAm GR α /BCR em linfócitos obtidos sessenta dias após a cirurgia (n= 17).....	68

1- INTRODUÇÃO

Um grupo de doenças cardiovasculares faz parte do desfecho de uma cadeia de anormalidades metabólicas, conhecida como síndrome metabólica, que se caracteriza por aumento de circunferência abdominal, hipertensão arterial, hipertrigliceridemia, baixo HDL-colesterol (*High Density Lipoproteins*) e elevação glicêmica (Rosenbaum, Ferreira, 2003).

Existe um estreito elo entre a síndrome metabólica e a resistência insulínica (Reaven, 1988). A resistência insulínica, e o conseqüente hiperinsulinismo, estão implicados na gênese da hipertensão, da dislipidemia, da obesidade visceral, dos distúrbios do metabolismo da glicose, dos estados pró-inflamatórios e pró-trombóticos, o que permite uma associação direta de causa e efeito entre resistência insulínica, síndrome metabólica e as doenças cardiovasculares (Reaven, 2008).

O estado de resistência insulínica é gerado por fatores que causam diminuição da captação periférica de glicose e aumento da síntese de glicose, provocando hiperglicemia e a hipersinsulinemia. Dentre estes fatores ressaltam-se os mecanismos de *down-regulation* dos receptores de insulina no músculo, mutações do receptor de insulina, diminuição da translocação do GLUT 4 (proteína transportadora de glicose 4) para a membrana celular, aumento da disponibilidade de substratos para a gliconeogênese e alterações de proteínas das vias pós-receptoras de sinalização intracelular (Bansilal et al, 2007).

Ainda como parte destes mecanismos geradores de resistência insulínica destaca-se os glicocorticóides, os quais são capazes de aumentar os substratos para gliconeogênese, diminuir a translocação do GLUT4 e modular a transcrição de substratos da via sinalizadora do receptor de insulina (Whorwood et al, 2001; Wang, 2005).

O metabolismo anormal dos glicocorticóides pode representar um fator independente, capaz de aumentar as complicações crônicas relacionadas à síndrome metabólica. A influência dos glicocorticóides na sensibilidade à insulina é aparente nas síndromes clínicas de hipercortisolismo, como na síndrome de Cushing, em que os pacientes desenvolvem quadros variáveis de intolerância a glicose, hipertensão arterial, obesidade central e dislipidemia (Stewart, 2005; Vegiopoulos, Herzig, 2007).

Indivíduos com maior sensibilidade aos glicocorticóides estão mais sujeitos aos efeitos metabólicos da resistência insulínica e conseqüentemente às doenças cardiovasculares (Vegiopoulos, Herzig, 2007). Esta sensibilidade ao esteróide pode ser avaliada *in vitro*, através da quantificação da densidade dos receptores glicocorticóides (GR), apresentando variação tecido-específica (Melo et al, 2004; Gross et al, 2009). *In vivo* a sensibilidade ao

glicocorticóide também pode ser estudada através da avaliação da resposta do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) após dose muito baixa de dexametasona. Este teste é capaz de discriminar, entre os indivíduos, diferentes graus de sensibilidade ao glicocorticóide. Neste teste, a amplitude de redução do cortisol reflete a sensibilidade hipotálamo-hipofisária à supressão exercida pela dexametasona (Faria et al, 2008).

Deste modo, no presente estudo realizado em indivíduos com doença cardiovascular já estabelecida, decidiu-se avaliar a expressão tecido-específica do receptor glicocorticóide, sua correlação com a sensibilidade *in vivo* aos glicocorticóides e com a resistência insulínica. Como citado anteriormente, a resistência insulínica e a síndrome metabólica, implicadas na origem da doença cardiovascular, seriam agravadas por um aumento da sensibilidade tecidual aos glicocorticóides, relacionadas ao padrão de expressão do receptor glicocorticóide em tecidos-alvo da ação insulínica, como músculo e tecido adiposo visceral (Fig.1).

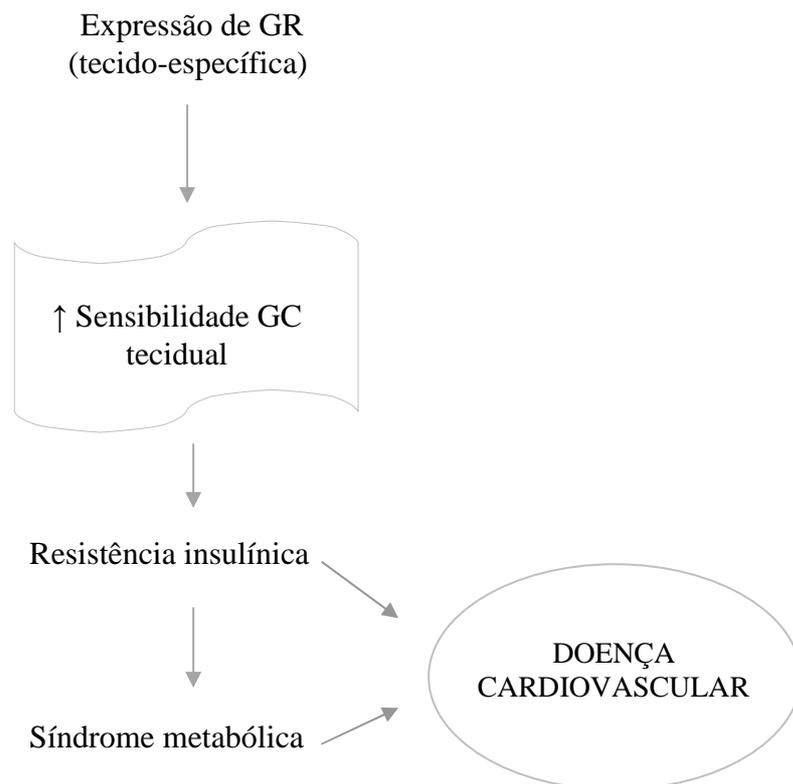


FIGURA 1: Sensibilidade aos glicocorticóides e doença cardiovascular: uma maior expressão do receptor glicocorticóide (GR) em tecidos-alvo de ação insulínica, como músculo e tecido adiposo visceral, aumentaria a sensibilidade destes tecidos aos glicocorticóides (GC), o que gera e/ou piora a resistência insulínica e a síndrome metabólica, ambas envolvidas na patofisiologia da doença cardiovascular.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- As doenças cardiovasculares

Os eventos cardiovasculares estão entre as principais causas de morte populacional no mundo, sendo dois terços destes atribuídos às doenças arteriais coronarianas (DAC). Os principais fatores de risco incluem a obesidade, hipertensão, dislipidemia, intolerância a glicose ou diabetes mellitus, os quais fazem parte de um conjunto de anormalidades metabólicas denominado síndrome metabólica, cujo mecanismo fisiopatológico central é a resistência insulínica (Rosenbaum, Ferreira, 2003).

Dados do Ministério da Saúde para o ano de 2006 apontam que a taxa de mortalidade específica de doenças isquêmicas do coração foi de 48,5 óbitos para 100000 habitantes no Brasil, chegando a 70,2 na região metropolitana de São Paulo.

Ao longo das décadas, com o avanço de métodos diagnósticos e terapêutica precoce, espera-se um declínio da letalidade das doenças cardiovasculares. Entretanto, há uma preocupante tendência de aumento da morbimortalidade em indivíduos jovens, que está associado ao aparecimento precoce da síndrome metabólica, em parte vinculado ao estresse, sedentarismo e aumento progressivo da obesidade.

A síndrome metabólica é um forte preditor de doença cardiovascular (Gorter et al, 2004; Benetos et al, 2008) e está presente em 45% dos pacientes com manifestações clínicas de aterosclerose (Wassink et al, 2008). Estudo realizado por Chung et al (2007) avaliou pacientes com idade menor ou igual a 45 anos que sofreram de infarto agudo do miocárdio e foram submetidos a cateterismo coronariano, constatou que 47% destes indivíduos preenchem critérios para síndrome metabólica. Na Holanda, dentre 1117 pacientes acompanhados por doença vascular aterosclerótica, a síndrome metabólica estava presente em 41% dos indivíduos com doença arterial coronariana, em 58% daqueles com doença vascular periférica, em 43% dos pacientes com doenças cerebrovasculares e em 47% dos portadores de aneurisma da aorta abdominal (Gorter et al, 2004). Na Austrália, 54% dos pacientes admitidos com diagnóstico de infarto agudo do miocárdio tinham síndrome metabólica (Prasad et al, 2009).

Em estudo realizado na Turquia (Deveci et al, 2009), demonstrou-se que pacientes euglicêmicos com doença arterial coronariana apresentavam maiores taxas de insulina sérica e maiores índices de resistência insulínica. Neste estudo não houve diferença na presença de síndrome metabólica entre grupo doente e controle, o que sugere que a avaliação da resistência insulínica talvez fosse um indicador mais sensível do risco de DAC.

2.2- A síndrome metabólica

Em 1988 Reaven denominou de síndrome X o que hoje é reconhecido como síndrome metabólica, e descreveu o elo destas anormalidades metabólicas como a resistência insulínica e a hiperinsulinemia (Reaven, 1988).

Após 10 anos, a Organização Mundial de Saúde (OMS) introduziu a primeira definição “oficial” de síndrome metabólica e propôs como critérios a presença de resistência insulínica identificada por hiperinsulinemia e/ou intolerância a glicose ou diabetes mellitus associada a dois ou mais dos seguintes critérios: HDL-colesterol baixo e/ou triglicérides elevado, hipertensão arterial sistêmica, aumento da relação cintura-quadril e/ou obesidade e microalbuminúria (Cornier et al, 2008).

Em 2001, de acordo com a definição estabelecida pela *National Cholesterol Education Program – Third Adult Treatment Panel* (NCEP- ATP III), a síndrome metabólica seria caracterizada pela presença de três ou mais dos seguintes critérios: resistência insulínica ou glicemia de jejum alterada, triglicérides elevado, baixo HDL-colesterol, hipertensão e aumento da circunferência abdominal. No ano de 2003, este conceito foi revisto (NCEP-ATP III Revisada) com modificação da definição de glicemia de jejum alterada e adição de pacientes em tratamento para dislipidemia, hipertensão e diabetes. Em 2004, a *International Diabetes Federation* (IDF) propôs novos pontos de corte para os critérios acima citados, ressaltando como um pré-requisito a presença da circunferência abdominal aumentada (Anexo 1) (van den Hooven et al, 2006; Benetos et al, 2008; Cornier et al, 2008; Wassink et al, 2008).

2.3- A resistência insulínica

A resistência insulínica é uma anormalidade metabólica na qual a insulina plasmática em concentrações normais não consegue promover adequadamente a captação periférica de glicose, suprimir a gliconeogênese hepática e inibir a liberação de lipoproteínas de baixa densidade (Eyzaguirre, Mericq, 2009). Conseqüentemente, há uma tendência à elevação da glicemia, que por sua vez leva ao hiperinsulinismo.

A resistência à ação da insulina (e suas anormalidades metabólicas) é a ponte entre a síndrome metabólica e as doenças cardiovasculares (Reaven, 1988). Já se demonstrou que indivíduos obesos sensíveis à insulina não apresentam o conjunto de fatores de risco para doenças cardiovasculares (DCV), como observado nos obesos resistentes à insulina (Reaven, 2008). Isto implica dizer que a resistência insulínica tem um papel central na origem da síndrome metabólica e no desfecho para DCV.

Dentre os fatores envolvidos na gênese da resistência insulínica destacam-se os mecanismos que provocam diminuição da expressão dos receptores de insulina, diminuição da translocação do GLUT4 para a membrana celular, aumento da disponibilidade de substratos para gliconeogênese, alterações de proteínas sinalizadoras pós-receptor e mutações do receptor de insulina (Bansilal et al, 2007).

Como mecanismo pós-receptor de resistência insulínica, propõe-se que o sensor mTOR (*mammalian target of rapamycin*), responsável pelo controle do crescimento e do metabolismo celular em resposta aos nutrientes, hormônios, fatores de crescimento, energia celular e estress (Fraenkel et al, 2008), esteja implicado em doenças como obesidade, diabetes mellitus e câncer (Hall, 2008). O mTOR é composto de dois complexos proteicos distintos: o TORC1, um complexo sensível a rapamicina que regula o controle temporal do crescimento celular através dos mecanismos de tradução, transcrição, transporte de nutrientes e apoptose; e o TORC2, um complexo resistente a rapamicina, mediador do controle espacial do crescimento celular através da regulação da actina no citoesqueleto (Hall, 2008).

Há evidências de que o complexo TORC1 aumenta a fosforilação de IRS (*Insulin Receptor Substrate*), gerando maior degradação de IRS1 e 2 e resistência insulínica (Fraenkel et al, 2009). Sabe-se que a redução de IRS2 nas células β provoca apoptose celular (Lingohr et al, 2003; Leibowitz et al, 2008). Assim, o aumento da fosforilação de IRS2 pela ativação do complexo TORC1 por aminoácidos, glicose, IGFs, resulta em apoptose de células β (Briaud et al, 2005) e conseqüente falência pancreática na produção de insulina.

No estado de resistência insulínica há um aumento do fluxo de ácidos graxos para o fígado, o que promove a produção hepática de VLDL (*Very Low Density Lipoproteins*). Sendo a atividade da lipase lipoproteica dependente de insulina e diminuída durante a resistência insulínica, a captação periférica de triglicerídeos pelo VLDL também está diminuída, o que causa a hipertrigliceridemia observada nesta situação (Wilcox, 2005).

A hiperinsulinemia serve para compensar a resistência insulínica e manter a homeostase da glicose. Entretanto, os pacientes com hiperinsulinemia, mas ainda sem alterações glicêmicas estão propensos a aterosclerose, hipertensão, hipercoagulação sanguínea, síndrome dos ovários policísticos, esteatose hepática e alguns tipos de câncer, como câncer de colon, endométrio, mama, dentre outros (Eyzaguirre, Mericq, 2009).

A resistência insulínica é um estado crônico de inflamação sistêmica que está ligado a alterações metabólicas e vasculares (Bansilal et al, 2007). A exposição de células ao TNF α estimula a fosforilação dos resíduos serina do IRS-1 que reduz a fosforilação dos resíduos

tirosina em resposta à insulina e inibe a cascata de sinalização intracelular da insulina, o que gera resistência insulínica (Wellen, Hotamisligil, 2005).

Várias serina/treonina quinases causam este mecanismo de resistência insulínica, como as quinases do grupo JNK e o IKK β . O grupo JNK é composto por serina/treonina quinases e causa fosforilação da Ser307 do IRS1, prejudicando a ação insulínica (Hirosumi et al, 2002). O IKK β causa resistência insulínica por fosforilar o resíduo serina da IRS1, além de fosforilar e degradar o inibidor do NF- κ B (I κ B), agindo como um ativador do NF- κ B que é responsável por estimular a secreção de inúmeros mediadores inflamatórios (Wellen, Hotamisligil, 2005). Drogas como salicilatos, que inibem NF- κ B e IKK β , estão sendo usadas na prevenção de DAC (Wellen, Hotamisligil, 2005; Wajchenberg et al, 2009).

Recentes evidências sugerem que a ativação do sistema imune esteja associada aos TLRs (*toll-like receptor*), da família dos PRRs (*pattern recognition receptors*) (Fessler et al, 2009), e particularmente as quinases do grupo JNK e o IKK β são ativadas pelos TLRs (Wellen, Hotamisligil, 2005).

Os TLRs são receptores de membrana tipo 1, que reconhecem os patógenos PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) e ativam a resposta inflamatória via NF- κ B (Gu et al, 2009). O TLR2 e TLR4 reconhecem lipídios de membrana e são estimulados por ácidos graxos saturados e inibidos por ácidos graxos poliinsaturados ω -3 e ω -6 (PUFAs ω -3 e ω -6) (Fessler et al, 2009). A ativação do TLR4 nos fibroblastos da adventícia vascular regula inúmeras citocinas e propicia a proliferação da camada muscular vascular. Já se demonstrou que em artérias de ratos submetidos a stress crônico há um aumento na expressão do gene TLR4 o que propicia a doença cardiovascular aterosclerótica (Gu et al, 2009). Ainda, sabe-se que os ácidos graxos saturados ao ativar TLR4 no hipotálamo desencadeiam uma resposta inflamatória central que resulta em resistência aos sinais anorexigênicos (Fessler et al, 2009).

A progressão da resistência insulínica para diabetes mellitus é paralela à progressão da disfunção endotelial para a aterosclerose (Bansilal et al, 2007). A ativação dos receptores de insulina leva ao recrutamento de células da musculatura lisa vascular, bem como de células inflamatórias e do sistema imune, mecanismos em que a resistência insulínica potencializa a aterosclerose (Bansilal et al, 2007).

A disfunção endotelial associada à resistência insulínica é o resultado do desequilíbrio entre duas vias de ação da insulina: a via MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*; via pró-aterogênica) que aumenta a produção de endotelina 1 e a via PI(3)K (*phosphatidylinositol 3-kinase*; via anti-aterogênica) responsável pela produção de óxido nítrico (Bansilal et al, 2007). O óxido nítrico (NO) causa relaxamento vascular, diminui a secreção de citocinas pró-

inflamatórias e inibe a agregação plaquetária, a adesão celular e a proliferação da camada muscular do vaso sanguíneo. Apesar da produção de NO pelas células endoteliais serem estimuladas pela insulina e por IGFs (*Insulin-like Growth Factor*), no estado de resistência insulínica o aumento de ácidos graxos livres prejudica a atividade da enzima óxido nítrico sintase, que associado à redução de tetrahydrobiopterina (cofator para síntese de NO), reduz a síntese de NO, prejudicando a resposta vasodilatadora. Por outro lado, a hiperinsulinemia compensatória promove liberação de endotelinas vasoconstrictoras, como a endotelina 1, com conseqüente aumento da permeabilidade vascular, recrutamento de células inflamatórias, estímulo da proliferação de células da musculatura lisa dos vasos e aumento dos fatores pró-coagulantes, como o PAI-1 (*Plasminogen activator inhibitor -1*) (Wilcox, 2005; Bansilal et al, 2007).

A hiperglicemia causa ainda efeito direto, acelerando a progressão da aterosclerose através da glicação não-enzimática de proteínas e lipídeos com formação de AGEs (*Advanced Glycation end Products*), bem como por induzir a expressão de proteínas pró-coagulantes, aumentar a apoptose de células endoteliais e diminuir a proliferação destas, além de inibir a fibrinólise (Bansilal et al, 2007).

O *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico é considerado o padrão-ouro para a avaliação da ação insulínica, pois permite examinar a sensibilidade à insulina ao nível muscular e hepático, bem como examinar a resposta da célula β pancreática à glicose. Porém, é um método invasivo, de maior custo e de difícil realização (Geloneze, Tambascia, 2006).

O HOMA (*Homeostatic Model Assessment*) é um modelo matemático que permite reconhecer a função da célula β pancreática e a sensibilidade insulínica (Wallace et al, 2004). É um método de menor custo, mais fácil de ser realizado e considerado um método aceitável para o desenvolvimento de estudos clínicos (Geloneze, Tambascia, 2006). O índice HOMA pode ser calculado pelas seguintes equações:

$$\text{HOMA IR} = (\text{glicemia de jejum [mmol/l]} \times \text{insulinemia [\mu U/ml]}) / 22,5$$

$$\text{HOMA } \beta = 20 \times \text{insulinemia (\mu U/ml)} \div (\text{glicemia de jejum [mmol/l]} - 3,5)$$

Uma avaliação do HOMA que utiliza um programa computacional, conhecido como HOMA Calculator Version 2.2.2, tem sido considerado um método mais preciso para avaliação da resistência insulínica, por refletir com maior acurácia as bases fisiológicas da homeostase glicose-insulina (Levy et al, 1998).

No Brasil, em estudo denominado BRAMS (*Brazilian Metabolic Syndrome Study*), estabeleceu-se como valor de corte para o diagnóstico da resistência insulínica o HOMA IR maior ou igual a 2,71 (Geloneze et al, 2006) e para o diagnóstico de síndrome metabólica o

HOMA IR $>2,3$ (Geloneze et al, 2009). Recentemente, definiu-se para o mesmo estudo o valor do HOMA Calculator maior que 1,8 para detectar resistência insulínica e HOMA Calculator $>1,4$ para o diagnóstico de síndrome metabólica (Geloneze et al, 2009).

2.4- O tecido adiposo como um órgão endócrino

Nos últimos anos, o tecido adiposo passou a ser reconhecido não somente como um reservatório de energia, mas também como um órgão endócrino (Kershaw, Flier, 2004).

O adipócito recebe influências diversas, como de insulina, cortisol, catecolaminas, e em resposta a esses fatores secreta peptídeos bioativos relacionados à sensibilidade insulínica, regulação do balanço energético, sistemas imunológico e neuroendócrino, remodelação vascular, fenômenos trombóticos e pró-inflamatórios, estabelecendo com isto fontes convergentes entre adiposidade, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (Iglesias et al, 2006). Algumas dessas substâncias secretadas apresentam papel fundamental na sensibilidade tecidual à insulina, tendo a adiposidade intra-abdominal um significativo impacto sobre a deterioração desta sensibilidade (Kershaw, Flier, 2004; Ribeiro Filho et al, 2006).

O comportamento metabólico da gordura intra-abdominal difere do tecido adiposo subcutâneo, uma vez que aquele é mais sujeito à lipólise, expressa um maior número de receptores glicocorticóides, é mais sensível às catecolaminas por apresentar maior expressão do receptor β_3 associado a menor função α_2 -adrenérgica, e apresenta menor expressão de IRS1 (Frayn, 2000; Ribeiro Filho et al, 2006). Adipócitos das regiões femural e glútea tem menor expressão de receptores β -adrenérgicos e conseqüentemente uma reduzida lipólise em resposta às catecolaminas quando comparados aos adipócitos provenientes do subcutâneo abdominal (Wajchenberg, 2000; Henry et al, 2006).

O tecido adiposo visceral é considerado como o tecido metabolicamente mais ativo, devido sua intensa atividade lipolítica em resposta às catecolaminas e cortisol. Apresenta ainda menor sensibilidade à supressão da lipólise induzida pela insulina, o que promove maior liberação de ácidos graxos livres para o fígado e músculo (Ribeiro Filho et al, 2006). O aumento da disponibilidade destes ácidos graxos livres não-esterificados para o fígado ativa a gliconeogênese e eleva a glicemia. No músculo, a oxidação predominante de ácidos graxos livres determina diminuição no transporte e utilização de glicose, o que também predispõe ao aumento da glicemia. Ao longo prazo, a maior produção e menor utilização de glicose determinam a hiperinsulinemia, a qual provoca *down-regulation* dos receptores de insulina no músculo, caracterizando o estado de resistência insulínica. Esta resistência insulínica promove

aumento adicional dos ácidos graxos livres (principalmente os não-esterificados), reduzindo a secreção de insulina pelas células pancreáticas (lipotoxicidade) (Wilcox, 2005; Phillips, Prins, 2008; Rosito et al, 2008), podendo culminar com intolerância à glicose e diabetes mellitus.

Além de fornecer ácidos graxos livres, o tecido adiposo, principalmente o visceral, destaca-se como importante fonte de fatores inflamatórios. As adipoquinas, mediadores bioativos produzidos não somente pelos adipócitos, mas também por outras células presentes no tecido adiposo, como pré-adipócitos, macrófagos e células endoteliais, têm ação autócrina, parácrina e endócrina nas vias do metabolismo de lipídeos e homeostase de glicose, além de atuarem na angiogênese, processos tumorais, imunidade e formação óssea (Wajchenberg et al, 2009).

Adipoquinas inflamatórias, como interleucina 6, inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1), fator de necrose tumoral α , liberadas do omento, via circulação portal, atingem diretamente o fígado, estimulando a liberação hepática de proteínas inflamatórias de fase aguda, como a proteína C reativa, induzindo resistência insulínica e inflamação sistêmica crônica (Wajchenberg et al, 2009).

Por outro lado, adipoquinas anti-inflamatórias, como adiponectina, aumentam a sensibilidade insulínica, a captação muscular de glicose e a oxidação de ácidos graxos livres, além de diminuírem a produção hepática de glicose e a produção intracelular de triglicerídeos.

A enzima 11beta-hidroxiesteróide desidrogenase tipo 1 (11 β -HSD1), que converte cortisona em cortisol, parece estar mais ativa no tecido adiposo visceral, o que amplifica a ação glicocorticóide neste tecido. A hipersensibilidade visceral ao cortisol provoca alterações similares às observadas na síndrome de Cushing, agravando manifestações como a hipertensão arterial, dislipidemia e diabetes mellitus tipo 2 (Stewart, 2005).

Apesar do importante papel da gordura visceral intra-abdominal na resistência insulínica, deve-se ressaltar a participação do tecido adiposo depositado em outros locais (gordura intramuscular, gordura hepática). O conteúdo de gordura intramuscular está diretamente relacionado à redução da captação periférica de glicose e resistência insulínica, assim como o conteúdo lipídico intra-hepático está associado à sensibilidade insulínica. Por outro lado, o tecido adiposo subcutâneo glúteo-femoral e o subcutâneo abdominal superficial parecem exercer função protetora no que se refere à resistência insulínica (Wajchenberg, 2000; Hermsdorff, Monteiro, 2004; Wang, 2005).

O tecido adiposo subcutâneo é ainda dividido em dois planos, o superficial e o profundo, que possuem diferenças metabólicas e na secreção de adipoquinas, apresentando o

tecido adiposo subcutâneo profundo uma maior correlação com a resistência insulínica (Monzon et al, 2002).

Além destas diferenças regionais, há diferenças na expressão e secreção de adipoquinas quando se compara indivíduos não obesos, obesos com resistência insulínica e obesos sem resistência insulínica (MacLaren et al, 2008).

A gordura intra-abdominal e a epicárdica, durante a embriogênese, são provenientes do tecido adiposo marrom (Iacobellis et al, 2005; Sacks, Fain, 2007). A alta atividade lipolítica da gordura epicárdica sugere que este tecido também sirva como fonte de ácidos graxos não-esterificados (Baker et al, 2006).

O tecido adiposo epicárdico, assim como o omento, expressa amplamente os mediadores pró-inflamatórios e trombóticos (resistina, fator de necrose tumoral α , interleucina 6, interleucina 1, proteínas do sistema renina-angiotensina, inibidor do ativador de plasminogênio 1, proteínas quimioatraentes de monócitos e macrófagos, visfatina, leptina, entre outros) (Mazurek et al, 2003; Kershaw, Flier, 2004).

Pacientes com DAC tem maior expressão de MCP-1 (*Monocyte Chemotactic Protein*) e citocinas pró-inflamatórias (interleucina 6, interleucina 1 β , fator de necrose tumoral α) no tecido adiposo epicárdico do que no subcutâneo, especulando-se que o tecido adiposo epicárdico tenha uma função parácrina nas doenças que afetam as artérias coronarianas e o miocárdio (Mazurek et al, 2003). Sabe-se ainda que a adiponectina (considerada como fator protetor) tem menor expressão no tecido adiposo epicárdico (Baker et al, 2006; Iglesias et al, 2006).

Recentemente, tem sido proposta a medida ecocardiográfica do tecido adiposo epicárdico para estimar o tecido adiposo visceral. A espessura do tecido adiposo epicárdico correlaciona-se negativamente com o HDL-colesterol e a adiponectina, e positivamente com o tecido adiposo visceral intra-abdominal, a circunferência abdominal, a pressão diastólica, a insulinemia, o LDL-colesterol e as doenças arteriais coronarianas (Iacobellis et al, 2003).

A relação entre gordura epicárdica e insulinemia ou concentração de adiponectinas, sugere que este tecido seja altamente resistente à insulina. Indivíduos com resistência insulínica e baixos níveis de adiponectina, independentemente do índice de massa corporal (IMC), mostraram uma maior espessura da gordura epicárdica (Iacobellis et al, 2003).

Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos moleculares presentes no tecido adiposo visceral e sua correlação com a síndrome metabólica. Tendo em vista que diversas anormalidades metabólicas e fenotípicas da síndrome metabólica se assemelham à síndrome de Cushing, melhor compreensão sobre os mecanismos moleculares envolvidos na

via de ação dos glicocorticóides pode contribuir para o entendimento das complicações presentes na síndrome metabólica.

2.5- Os glicocorticóides

Os glicocorticóides são produzidos e secretados pelo córtex adrenal e participam da adaptação a situações de estresse. Agem sobre o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos, modulam o equilíbrio hidroeletrólítico e as funções cardiovasculares, hematopoiéticas, imunes, endócrinas, muscular esquelética, renal e do sistema nervoso. Regulam o tônus muscular dos vasos e a sensibilidade às aminas simpatomiméticas; reduzem a migração tecidual dos leucócitos e estabilizam a membrana celular, atuando desta forma na resposta inflamatória (Schimmer, Parker, 1996). Os glicocorticóides exercem tanto efeitos positivos quanto negativos sobre o crescimento celular, agindo na maioria das células com efeitos anti-proliferativo e pró-apoptótico (Longui et al, 2000; Longui et al, 2005).

No metabolismo dos carboidratos, os glicocorticóides têm ação hiperglicemiante. São potentes antagonistas da insulina por diminuir a translocação do GLUT4 para a membrana celular, o que reduz a captação periférica de glicose (Whorwood et al, 2001; Wang, 2005). Possuem ainda efeitos deletérios sobre as células beta pancreáticas (Gesina et al, 2006). Provocam estímulo para a liberação de aminoácidos a partir do tecido muscular esquelético e de ácidos graxos e glicerol do adiposo; além disso, aumentam a expressão de enzimas, como a fosfoenolpiruvato carboxiquinase, para a promoção da gliconeogênese (Wang, 2005). O excesso de glicocorticóides resulta em resistência insulínica, intolerância à glicose e/ou diabetes mellitus.

Os glicocorticóides promovem a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos. Há aumento da lipólise e da oxidação lipídica, devido ao aumento da resistência insulínica periférica. Determinam acúmulo de triglicérides com predomínio na gordura visceral, uma vez que estimulam a atividade da enzima LPL (lipoproteína lípase). No fígado, estimulam a atividade de enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos, como a acetil-CoA carboxilase (Diamant, Shafir, 1975) e aumentam a secreção de lipoproteínas (Wang et al, 1995), contribuindo para o quadro de dislipidemia (Hauner et al, 1987; Wajchenberg, 2000; Wang, 2005; Fernandez-Rodriguez et al, 2009).

No músculo, além do prejuízo causado pela resistência insulínica, os glicocorticóides em excesso provocam proteólise, acompanhada de diminuição da captação de aminoácidos e da síntese protéica (Fernandez-Rodriguez et al, 2009).

Os glicocorticóides agem como agonistas ao nível dos receptores mineralocorticóides, determinando retenção renal de sal e água. Promovem aumento da resistência vascular pela maior sensibilidade da musculatura lisa dos vasos a agentes pressóricos como catecolaminas e angiotensina II, o que ocasiona, em vigência de hipercortisolismo, hipertensão arterial (Buckingham, 2006).

Assim, o aumento da ação glicocorticóide determina obesidade central, hipertensão, dislipidemia e intolerância à glicose, sugerindo que a ação glicocorticóide excessiva possa ser uma das vias fundamentais na fisiopatologia da síndrome metabólica (Fig. 2).

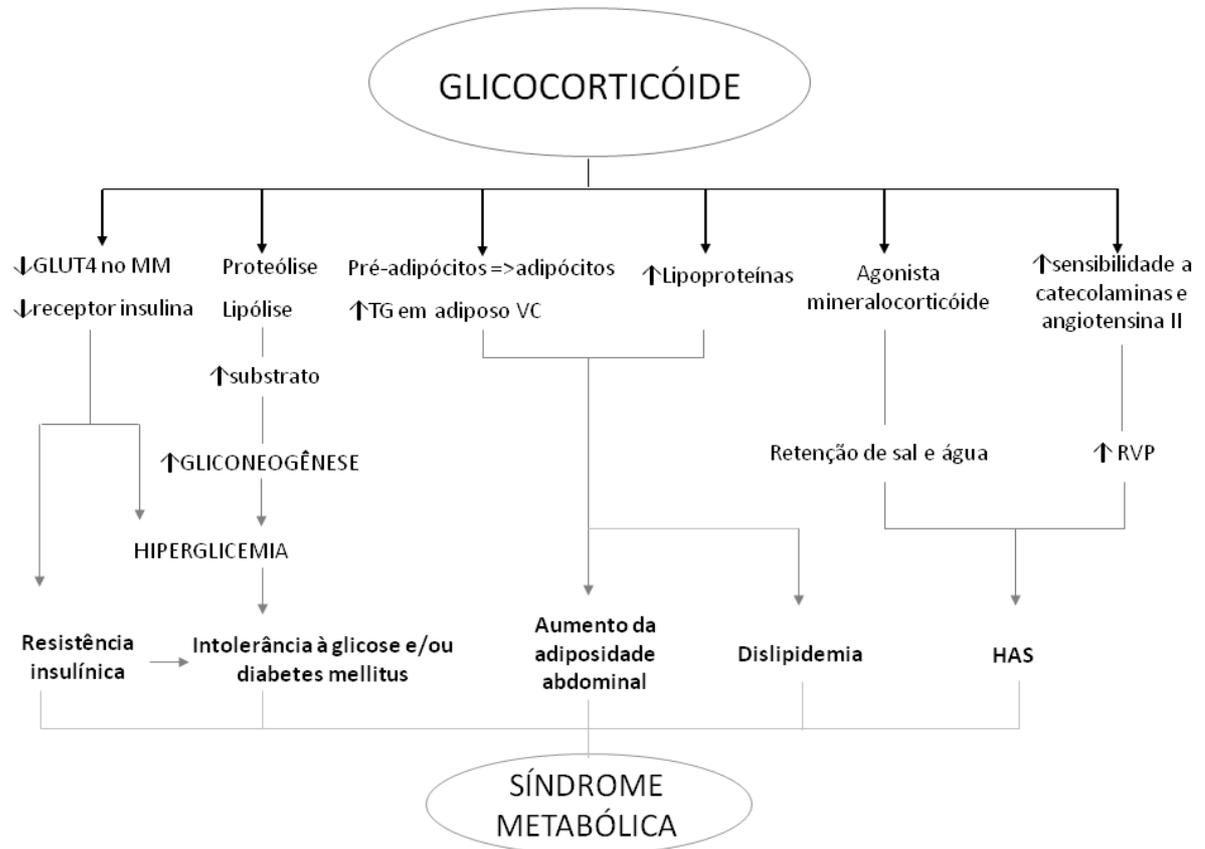


FIGURA 2: Mecanismo dos glicocorticóides na fisiopatologia da síndrome metabólica. Os glicocorticóides provocam diminuição da translocação do GLUT4 no músculo, alterações dos receptores de insulina, proteólise e lipólise, causando resistência insulínica e hiperglicemia com conseqüente intolerância à glicose e/ou diabetes mellitus. Este esteróide também é responsável pelo aumento da adiposidade abdominal e dislipidemia, visto que provoca diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos, bem como estoque de triglicérides em gordura visceral e aumento de lipoproteínas. Os glicocorticóides são agonistas dos receptores mineralocorticóides, provocando retenção de sal e água, além de aumentarem a sensibilidade a catecolaminas e angiotensina II, causando hipertensão arterial. Assim, os efeitos metabólicos dos glicocorticóides determinam anormalidades semelhantes às observadas na síndrome metabólica. GLUT4: proteína transportadora de glicose tipo 4; MM: músculo; TG: triglicérides; VC: visceral; RVP: resistência vascular periférica; HAS: hipertensão arterial sistêmica; ↓: diminuição; ↑: aumento

A concentração circulante de cortisol é regulada pela atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), modulada por fatores como o ritmo circadiano e a sensibilidade do *feedback* negativo exercido pelo próprio cortisol na região hipotálamo-hipofisária (Faria, Longui, 2006). Regulação anormal do eixo é observada tanto em doenças que cursam com hipercortisolismo, como a síndrome de Cushing, quanto em estados descritos como pseudo-Cushing, que incluem o alcoolismo, a depressão e a obesidade (Fernandez-Rodriguez et al, 2009).

Várias alterações na atividade do eixo HHA já foram descritas em obesos, embora haja considerável divergência, dependendo da gravidade e tipo de obesidade. A obesidade já foi associada a concentrações séricas de cortisol tanto baixas, quanto elevadas ou normais (Jessop et al, 2001).

A redução da concentração sérica de cortisol foi relacionada ao aumento da leptina que ocorre em obesos, e que seria capaz de inibir o eixo HHA (Korbonits et al, 1997). Outros estudos indicam que a hipocortisolemia em obesos seja decorrente de um aumento do *clearance* renal de cortisol, acompanhado de diminuição da produção hepática do cortisol decorrente da menor atividade da 11 β -HSD1 (Jessop et al, 2001).

Por outro lado, o aumento do cortisol sérico às vezes observado pode se dever à maior atividade do eixo HHA, secundária à menor produção hepática de cortisol, por diminuição da atividade hepática da 11 β -HSD1, e conseqüentemente menor *feedback* negativo sobre o eixo (Rask et al, 2002).

Aproximadamente 6% do cortisol está ligado à albumina e 90% ligado à globulina carreadora de corticosteróide (CBG). Uma vez que somente o cortisol livre é ativo, a ligação com a CBG pode restringir o acesso de cortisol às células-alvo e regular a biodisponibilidade e o *clearance* metabólico (Wang, 2005). Sabe-se que as concentrações de CBG estão inversamente correlacionadas ao IMC e que a deficiência de CBG está associada com maior proliferação e diferenciação dos pré-adipócitos (Joyner et al, 2003).

A biodisponibilidade intracelular do hormônio é modulada pelas enzimas 11 β -hidroxiesteróide desidrogenases. A 11 β -HSD1 atua como uma óxido-redutase que catalisa a reação do corticosteróide inativo (cortisona) em ativo (cortisol) e está expressa em grande quantidade no fígado e tecido adiposo. Já a isoforma 11 β -HSD tipo 2, com atividade desidrogenase, é encontrada principalmente em tecidos como rins, colon e glândulas salivares, onde atua protegendo o receptor mineralocorticóide (MR) contra a ação dos glicocorticóides (Stewart, 2005). Evidências sugerem que a maior expressão e atividade da 11 β -HSD1 no

tecido adiposo visceral, amplifica a ação glicocorticóide no adipócito, por permitir maior concentração intracelular de cortisol, aumentando a disponibilidade do hormônio ativo e sua ligação ao receptor glicocorticóide. Tal ação favorece a diferenciação de pré-adipócitos, promovendo acúmulo de gordura visceral e anormalidades metabólicas comuns na síndrome metabólica (Kershaw, Flier, 2004; Stewart, 2005; De Sousa Peixoto et al, 2008). Um efeito metabólico protetor foi observado em ratos geneticamente modificados, que tiveram deleção do gene da 11 β -HSD1 (Morton, Seckl, 2008) ou uma superexpressão da 11 β -HSD2 no tecido adiposo (Kershaw et al, 2005).

Quanto ao mecanismo de ação hormonal, os glicocorticóides exercem a maioria de seus efeitos através da interação com receptores de alta afinidade (receptores de glicocorticóides – GR). O complexo hormônio-receptor modula a transcrição de genes-alvo ao se ligar ao elemento de resposta ao glicocorticóide, seqüência conservada localizada próximo ao sítio de iniciação da transcrição gênica (Faria, Longui, 2006).

A expressão de GR sofre importantes mecanismos de *down e up-regulation* exercendo influência sobre a sensibilidade aos glicocorticóides (Faria, Longui, 2006). Foi descrita uma maior expressão do GR em tecidos como o adiposo visceral e músculo, principais tecidos-alvo da ação insulínica na captação de glicose, o que resulta em maior sensibilidade ao cortisol. Este fenômeno parece correlacionar-se à resistência insulínica nestes tecidos e à presença da síndrome metabólica (Whorwood et al, 2002).

2.6- O receptor glicocorticóide (GR)

A estrutura proteica codificada pelo gene do GR é característica da família de receptores nucleares. Os receptores nucleares são proteínas que traduzem o sinal determinado por seu hormônio ligante intracelular. Inicialmente, o hormônio se liga ao receptor com alta afinidade e, em seguida, o complexo hormônio-receptor forma dímeros, transloca-se para o núcleo onde reconhece sítios específicos de ligação ao DNA, ligando-se a essas seqüências e regulando a transcrição de genes-alvo (Fig. 3). Os dímeros podem ser formados por meio da união de duas cópias da mesma isoforma proteica (homodímeros) ou mesmo pela união a outra isoforma ou até mesmo a outro receptor nuclear (heterodímeros).

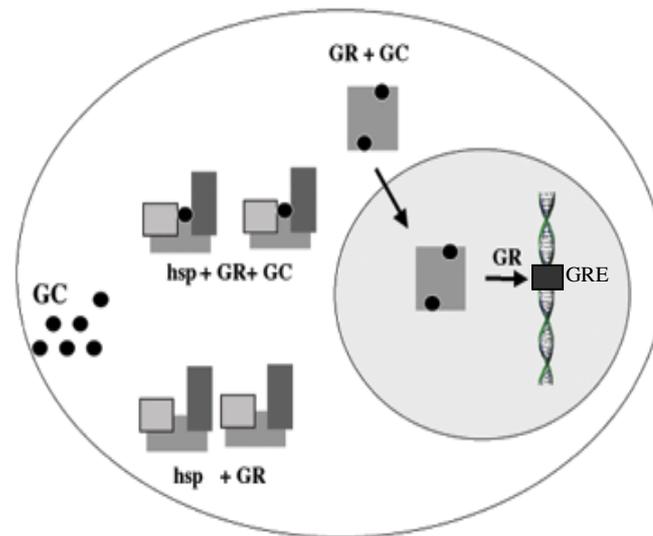


FIGURA 3: Esquemática do mecanismo de ação do receptor glicocorticoide: após a interação hormonal, o GR dissocia-se do complexo com as hsp (*heat shock proteins*), forma dímeros, transloca-se para o núcleo, interage com o elemento responsivo aos glicocorticóides (GRE), bem como com outros fatores de transcrição, modulando a expressão de genes-alvo. Fonte: Faria, Longui, 2006.

Um dos principais determinantes da responsividade aos glicocorticóides é a concentração intracelular da proteína GR (Gross et al, 2009), relacionada à fase do ciclo celular (Cidlowski, Michaels, 1977), envelhecimento celular (Chang, Roth, 1979), as alterações primárias do receptor e concentração hormonal (hiper ou hipocortisolismo). Os moduladores mais estudados são os próprios glicocorticóides, que promovem uma redução na concentração de GR por um processo conhecido como *down-regulation* homólogo (Burnstein, Cidlowski, 1992).

O gene do receptor de glicocorticoide está localizado no braço longo do cromossomo cinco (5q31-32) (Franke, Foellmer, 1989). O *splicing* alternativo dá origem a cinco isoformas do GR (GR α , GR β , GR γ , GR-A, GR-P). As diferentes isoformas do GR exibem um padrão tecido-específico de expressão, bem como diferenças na localização intracelular e na atividade transcricional (Gross et al, 2009). A mais conhecida é a isoforma β (GR β) e sua característica é o efeito dominante negativo devido sua capacidade de heterodimerizar com a isoforma GR α , impedindo sua ação na modulação da transcrição gênica (Bamberger, 1995; Rosmond et al, 2006).

Depois de traduzido, o GR serve como substrato para várias quinases e fosfatases. Apesar do papel de cada fosforilação específica ser pouco conhecido, mutações nos sítios de

fosforilação apresentam impacto na estabilidade do receptor, meia-vida e capacidade de sinalização (Webster et al, 1997).

2.7- Avaliação da sensibilidade aos glicocorticóides

O amplo espectro de resposta clínica aos glicocorticóides varia desde uma resistência severa, observada em quadros de asma córtico-resistente, artrite reumatóide, dentre outros, até a uma alta sensibilidade vista na síndrome de lise tumoral, em que há uma maciça resposta citolítica das células linfóides tumorais após tratamento com glicocorticóide (Shahidi et al, 1999).

A variabilidade da resposta também é tecido-específica e reconhecer esta sensibilidade tem implicações adicionais no envolvimento do cortisol na patofisiologia da síndrome metabólica.

Vários fatores influenciam a cascata de eventos que levam à ação final dos glicocorticóides. Dentre os de maior relevância estão:

- Disponibilidade do hormônio às células-alvo e o seu *clearance* metabólico: regulado pela CBG;
- Disponibilidade intracelular do hormônio: modulada pelas isoformas da enzima 11 β -HSD;
- Expressão quantitativa do GR: está estreitamente correlacionada à magnitude da resposta mediada pelos glicocorticóides, variando de modo tecido-específico (Miller et al, 1990);
- Afinidade da ligação hormonal: a potência do GR como regulador da transcrição depende de sua afinidade à ligação hormonal. Mutações pontuais no domínio de ligação esteroideal que alterem sua afinidade aos glicocorticóides (Hurley et al, 1991; Rosmond et al, 2006) e/ou a estabilidade do complexo ligante-receptor (Ashraf, Thompson, 1993) são associadas a síndromes clínicas de resistência aos glicocorticóides;
- Mutações das *hsp* e alteração conformacional do GR: a ligação do hormônio ao receptor provoca uma mudança conformacional com alteração espacial da molécula proteica, o que induz a dissociação do complexo GR-*hsp* e permite a atividade do complexo glicocorticóide-GR. Mutações que provoquem alteração conformacional inadequada, e conseqüentemente impedem a dissociação do complexo GR-*hsp* podem ser responsáveis por resistência aos glicocorticóides (Bodine, Litwack, 1988);
- Capacidade de translocação nuclear do complexo hormônio- receptor;

- Capacidade de interação com o elemento responsivo ao glicocorticóide, bem como com outros fatores de transcrição nucleares;
- Modificações pós-traducionais como fosforilação, ubiquitinação, SUMOilação são capazes de influenciar na localização sub-celular do GR, além de regular a estabilidade proteica e atividade transcricional do receptor;
- Variantes polimórficas: pequenas modificações gênicas do GR capazes de alterar a expressão do receptor ou sua interação com o DNA e outras proteínas, determinando manifestações clínicas de resistência ou hipersensibilidade ao cortisol. A maioria das variantes descritas correlaciona-se com resistência aos glicocorticóides (Yudt, Cidlowski, 2002), como a presença do polimorfismo ER22/23EK que está associado à menor incidência de diabetes mellitus tipo 2 e menor risco de DCV (van Rossum, Lamberts, 2004).

Diversos métodos *in vivo* e *in vitro* são utilizados para avaliar a responsividade e sensibilidade tecidual aos glicocorticóides.

Em humanos, os linfócitos circulantes são células periféricas úteis na avaliação da sensibilidade aos glicocorticóides. São facilmente obtidas, expressam adequadamente receptores glicocorticóides e são sensíveis tanto *in vitro* quanto *in vivo* aos efeitos induzidos pelos glicocorticóides (Homo-Delarche, 1984).

In vitro, a sensibilidade ao glicocorticóide pode ser determinada indiretamente através da avaliação do efeito glicocorticóide no transporte de glicose, de aminoácidos, de incorporação de precursores da síntese protéica, síntese de RNA e até mesmo síntese de DNA. Essa sensibilidade também pode ser determinada por meio de ensaios que avaliem a taxa de proliferação celular ou morte celular por apoptose, visto que em diversos tipos celulares os glicocorticóides são considerados agentes pró-apoptóticos, levando à interrupção do crescimento celular, seguido de ativação dos mecanismos de morte celular (Homo-Delarche, 1984).

Avaliação in vivo da sensibilidade hipotálamo-hipofisária ao glicocorticóide através do teste de supressão com dexametasona

Os testes de supressão do cortisol com dexametasona avaliam a integridade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e são utilizados no diagnóstico da síndrome de Cushing, situação na qual o *feedback* negativo ao nível hipotálamo-hipofisário encontra-se alterado. A base fisiológica destes testes envolve a presença do GR nas células corticotróficas da hipófise.

Portanto, o grau de supressão do cortisol induzido pela dexametasona é útil na avaliação da sensibilidade hipofisária ao glicocorticóide (Faria et al, 2008).

A utilização de altas doses de dexametasona (10-20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ou 300-600 $\mu\text{g}/\text{m}^2$) provoca supressão completa do eixo HHA em indivíduos normais, sendo o teste empregado no diagnóstico da síndrome de Cushing (Longui et al, 2003).

No estudo de Hindmarsh, Brook (1985) o teste de supressão foi realizado com dexametasona *overnight*, oferecido por via oral, em crianças eutróficas com doses de 100, 300 e 500 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ no intuito de determinar a mínima dose capaz de suprimir o eixo HHA. Os resultados mostraram que as doses de 300 e 500 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ provocaram supressão em todas as crianças normais e com a dose de 100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ somente duas, dentre sete crianças, apresentaram supressão do eixo. Esses autores sugeriram que o uso de dexametasona via oral em dose única *overnight* de 300 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ seria capaz de suprimir o cortisol de indivíduos normais e identificar os indivíduos suspeitos para a síndrome de Cushing.

Portanto, doses suprafisiológicas de dexametasona acima citadas são empregadas em quadros suspeitos de síndrome de Cushing. Por outro lado, por provocar supressão completa do eixo HHA em indivíduos normais, não permitem discriminar o grau de sensibilidade de indivíduos normais aos glicocorticóides.

Estudo publicado por nosso grupo (Longui et al, 2003) com o objetivo de identificar a sensibilidade *in vivo* ao glicocorticóide, utilizou o teste de supressão com dose muito baixa de dexametasona (75 $\mu\text{g}/\text{m}^2$) por via oral e identificou um amplo espectro de redução do cortisol em diferentes crianças, permitindo a discriminação da sensibilidade ao glicocorticóide em crianças com e sem obesidade.

Classicamente, os testes de supressão do cortisol utilizam a via oral para administração da dexametasona, mas quando oferecida por esta via a concentração sérica da dexametasona pode sofrer variações significantes entre os indivíduos devido a interferências na absorção intestinal e metabolização hepática (Meikle, 1982).

Em estudo prévio realizado por nosso grupo (Faria et al, 2008) determinou-se que a dose de 20 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ intravenosa de dexametasona permite a discriminação de sensibilidade individual ao glicocorticóide. O teste pode ser simplificado com a determinação de cortisol sérico nos tempos 0 e 120 minutos após infusão de dexametasona. A avaliação de 87 indivíduos normais em diferentes faixas etárias permitiu estabelecer valores de referência para o teste de supressão com dexametasona intravenosa em crianças, adolescentes e adultos jovens (Faria et al, 2008).

Quantificação da concentração de RNAm do Gene GR α

A avaliação dos receptores glicocorticóides teve início com os estudos que medem a capacidade de ligação em células intactas, sugestivas da densidade de receptores de localização nuclear e citoplasmática. Tal método determina o número de receptores com capacidade de ligação à dexametasona, ou seja, da isoforma GR α . Seu maior inconveniente é a competição de quantidades desconhecidas de ligante endógeno ou exógeno não marcado radioativamente, além de ser um método trabalhoso, com várias etapas passíveis de erro, necessidade do uso de compostos radioativos, bem como a possibilidade de ligação do ligante marcado com um receptor heterólogo diminuindo sua especificidade (Svec, Rudis, 1981; Cidlowski, Cidlowski, 1981).

A clonagem do gene GR permitiu investigar suas concentrações de modo independente da capacidade de ligação ao receptor. A partir das seqüências clonadas de DNA complementar (DNAc), foram sintetizadas sondas altamente específicas para os receptores, utilizadas em *northern blots* e que permitiram avaliação semiquantitativa de RNA mensageiro (RNAm) do GR (Okret et al, 1986).

A análise do fenômeno de *down-regulation* homólogo do receptor por meio da técnica de *western blotting* tornou-se possível pelo desenvolvimento de anticorpos contra a proteína GR α (Dong et al, 1988). A detecção imunológica da concentração do receptor depende de anticorpos altamente específicos não disponíveis para todas as isoformas do receptor.

Em 2001 descreveu-se o uso da PCR para quantificar os transcritos específicos das diferentes isoformas de GR (Breslin et al, 2001). Nesse estudo utilizou-se um competidor interno comum, o QuantumRNA 18S (Ambion), o que permitiu uma mensuração semiquantitativa.

Recentemente, melhorou-se a acurácia das quantificações de RNAm com o desenvolvimento da PCR em tempo real. Nosso grupo descreveu uma nova técnica de quantificação da isoforma α do receptor glicocorticóide, utilizando a PCR em tempo real, no qual se empregou como gene normalizador o BCR (*Breakpoint Cluster Region*) e como calibradores as curvas-padrão utilizando células linfoblásticas Jurkat (Clone E6-1), o que possibilitou a quantificação absoluta do RNAm do GR. O método apresenta um coeficiente de variação intraensaio de 2% e interensaio de 7% (Melo et al, 2004).

3- OBJETIVOS

- 3.1- Quantificar o RNAm do receptor glicocorticóide, isoforma α , em tecidos provenientes de indivíduos submetidos à cirurgia cardíaca;
- 3.2- Determinar a sensibilidade hipotálamo-hipofisária ao glicocorticóide;
- 3.3- Correlacionar a sensibilidade hipotálamo-hipofisária à quantidade de RNAm do GR α ;
- 3.4- Determinar a influência da resistência insulínica na quantidade de RNAm do GR α e na sensibilidade hipotálamo-hipofisária tecidual.

4- CASUÍSTICA E MÉTODOS

Avaliou-se trinta e seis indivíduos adultos, de ambos os sexos, com idades entre 30 e 75 anos, os quais foram submetidos à cirurgia cardíaca, na Unidade de Cirurgia Cardíaca da Santa Casa de São Paulo. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMSP e, antes de serem incluídos no estudo, todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pela instituição.

Os critérios de exclusão foram: a) uso prévio de glicocorticóides ou de medicamentos capazes de alterar a esteroidogênese, b) pacientes com alterações laboratoriais de hormônios tireoidianos, c) pacientes com quadro de alcoolismo, d) pacientes com diagnóstico de depressão.

No dia que antecedeu a cirurgia, as medidas de peso, estatura, circunferência abdominal e pressão arterial (PA) foram obtidas pelo pesquisador. O desenho do estudo é mostrado na Fig. 4.

As medidas de peso e estatura foram usadas para o cálculo do índice de massa corporal através da seguinte fórmula: $IMC = \text{Peso (quilogramas)} / \text{Estatura}^2 \text{ (metros)}$. O dado de pressão arterial apresentado no estudo foi o resultado da média entre as pressões arteriais obtidas na véspera da cirurgia e as obtidas nas duas últimas consultas ambulatoriais (revisado em prontuário médico).

No momento cirúrgico, após um tempo médio de trinta minutos da indução anestésica e antes da incisão torácica obteve-se amostras de sangue e, após a abertura do tórax, colheu-se amostras de tecidos: muscular esquelético peitoral, adiposo subcutâneo superficial e adiposo visceral epicárdico. Colheu-se 7 ml de sangue em tubo com heparina sódica (Vacutainer, Becton-Dickinson) para extração de linfócitos e 3 ml em tubo seco para quantificação de glicemia, insulinemia, cortisol sérico e hormônios tireoidianos. Os tecidos muscular e adiposo foram colocados imediatamente em solução estabilizadora de RNA (RNAlater Cat.No.76106 QIAGEN) e em seguida armazenados em freezer com temperatura de -80 °C. O sangue foi encaminhado para a extração de linfócitos, os quais também foram armazenados a -80 °C para posterior avaliação molecular.

Sessenta dias após a cirurgia, os pacientes foram convocados para serem submetidos ao teste de supressão com dose muito baixa de dexametasona IV (n = 17), nova avaliação antropométrica e nova realização de exames laboratoriais (glicemia, insulinemia), bem como nova obtenção de linfócitos para avaliação molecular do GR (n = 14). Em três pacientes que

fizeram o teste de supressão não foi possível a obtenção de material de qualidade para o estudo molecular.

Em estudo piloto prévio, doze pacientes recrutados para cirurgia eletiva de colecistectomia submeteram-se ao teste de supressão com dose muito baixa de dexametasona IV, realizado no dia anterior ou na manhã do procedimento cirúrgico. Nestes pacientes não se observou a supressão do cortisol em 41% dos casos. Aumento do cortisol pré-operatório e um pico de secreção deste esteróide é esperado no primeiro dia de pós-operatório (Song et al, 2008; Vogeser et al, 2003). Assim, na tentativa de eliminar a interferência desse estresse agudo sobre o eixo HHA, optou-se por realizar o teste 60 dias após a cirurgia.

Os hormônios foram quantificados por técnicas padronizadas. A insulina e o cortisol foram quantificados por quimioluminescência (Immulyte 2000, SIEMENS, Los Angeles, CA, USA), o TSH por imunofluorimetria (AutoDELFIA, PerkinElmer, Turku, Finland), taxas de tiroxina, tiroxina livre e triiodotironina mensurados por fluoroimunoensaio (AutoDELFIA, PerkinElmer, Turku, Finland). A glicemia medida por método colorimétrico/enzimático (Bayer, São Paulo, Brasil). Os dados de colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol e triglicérides avaliados no estudo foram os realizados na última consulta antes do procedimento cirúrgico e estes foram medidos pelo método colorimétrico/enzimático (Bayer, São Paulo, Brasil).

Utilizou-se os critérios clínicos e laboratoriais de acordo com os pontos de corte estabelecidos pelo IDF para classificar o paciente como portador de síndrome metabólica.

O HOMA IR utilizado para classificar o paciente como resistente à insulina foi o maior HOMA IR obtido nas diferentes medidas realizadas durante o estudo, visto que nos pacientes que fizeram o teste de supressão houve a oportunidade de se avaliar novamente este índice. O valor de $\text{HOMA IR} \geq 2,71$ foi utilizado como o ponto de corte para definição de resistência à insulina e $\text{HOMA IR} > 2,3$ para detectar portadores de síndrome metabólica.

Com objetivo de aprimorar a avaliação da resistência insulínica calculamos o HOMA Calculator através do programa HOMA Calculator v2.2.2, no qual consideramos como ponto de corte para resistência insulínica um HOMA Calculator maior que 1,8 e para síndrome metabólica o HOMA Calculator maior que 1,4 (Geloneze et al, 2009).

Através da avaliação laboratorial prevista no protocolo do estudo, um paciente com hipertireoidismo foi diagnosticado e excluído, restando um total de 35 pacientes avaliados.

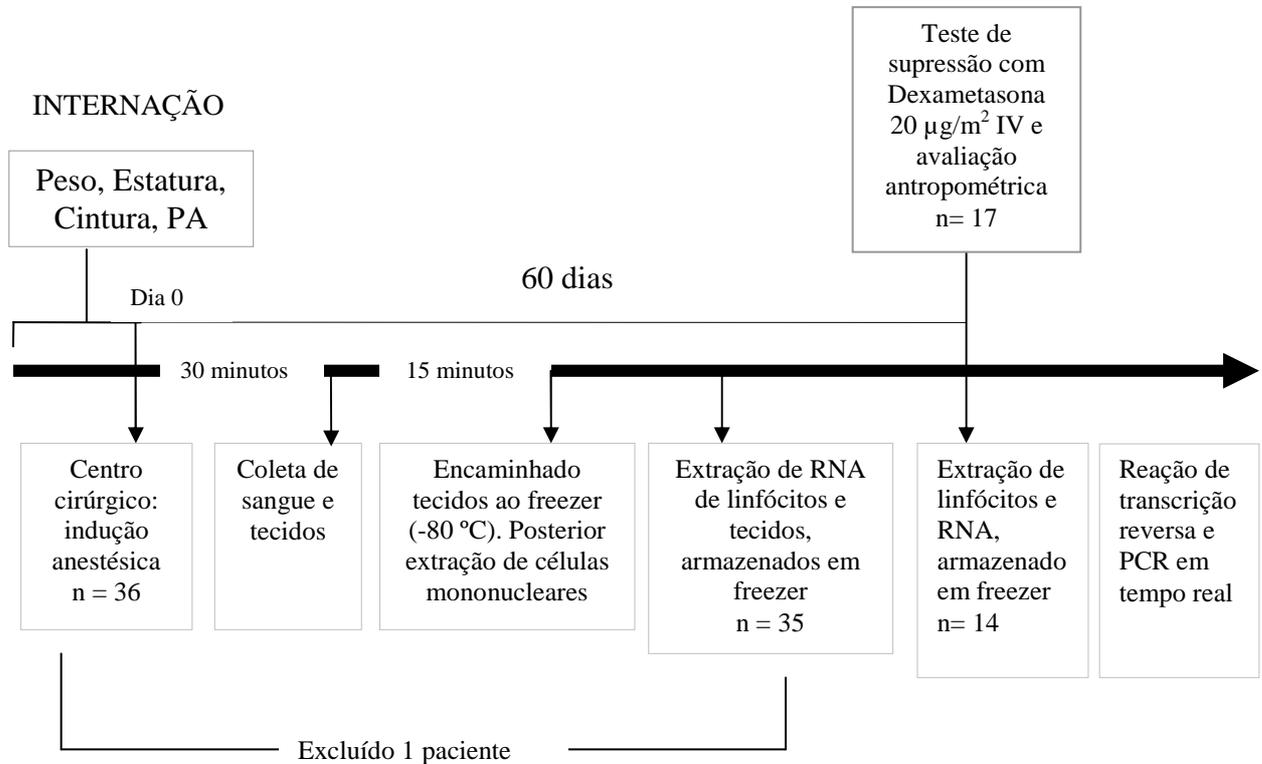


FIGURA 4: Desenho do estudo. No momento da internação do paciente as medidas de peso, estatura, cintura e pressão arterial (PA) foram obtidas. Considerou-se como dia 0 o dia em que o paciente foi submetido à cirurgia cardíaca, sendo 36 o total de pacientes avaliados. Um paciente com hipertireoidismo foi excluído da pesquisa (n = 35). Após 30 minutos da indução anestésica, colheu-se o material para o estudo (sangue e tecidos muscular, adiposo subcutâneo superficial, adiposo visceral epicárdico), sendo que num tempo médio de 15 minutos os tecidos foram armazenados em freezer a -80 °C e iniciado a extração de células mononucleares de sangue que posteriormente também foram armazenadas em freezer. Extraiu-se RNA de linfócitos e tecidos e este foi armazenado em freezer a -80 °C. Posteriormente, foi feita a reação de transcrição reversa para obtenção de DNA complementar (DNAc), permitindo a realização da avaliação molecular por PCR em tempo real. Sessenta dias após a cirurgia realizou-se o teste de supressão com dexametasona intravenosa (IV) e avaliação antropométrica de 17 pacientes. Em quatorze pacientes que realizaram o teste obteve-se linfócitos para avaliação molecular.

4.1- Teste de supressão com dose muito baixa de dexametasona intravenosa

Realizou-se o teste de supressão intravenosa (IV) com fosfato dissódico de dexametasona (DECADRON® 2mg/ml - Prodome Química e Farmacêutica Ltda - Indústria Brasileira) em dezessete pacientes.

Imediatamente antes do início do teste, diluiu-se 1 ml da solução de dexametasona (2 mg/ml) em 19 ml de solução fisiológica 0,9%, obtendo-se uma concentração final de 100 µg/ml.

Para a realização do teste de supressão, submeteu-se o paciente, após um período noturno de 12 horas em jejum, à coleta de 3 ml de sangue (tempo 0) para quantificação do cortisol sérico, insulinemia e glicemia, e 7 ml para separação de células mononucleares.

Após a coleta da amostra basal, injetou-se dexametasona intravenosa, em *bolus*, na dose de 20 µg/m². A coleta subsequente de sangue, para quantificação de cortisol, foi feita após 120 minutos da administração do fármaco, o que possibilitou o cálculo do percentual de redução do cortisol, por meio da fórmula: $\%F = 100 - (F_{120 \text{ min}} \times 100) / F_0 \text{ min}$; em que %F é o percentual de supressão do cortisol, F_{120 min} é o cortisol quantificado após 120 minutos da administração de dexametasona e F₀ é o cortisol basal.

4.2-Separação de células mononucleares

Antes da administração IV da dexametasona, obteve-se 7 ml de sangue venoso colocado em um tubo com heparina sódica (Vacutainer, Becton-Dickinson). Este foi transferido para um Falcon® estéril onde se adicionou a mesma quantidade (7 ml) de Histopaque® (Sigma, Cat.Nº 10771), e imediatamente submeteu-se à centrifugação a 800xg por 30 minutos, em temperatura ambiente.

As células mononucleares, separadas pelo gradiente de densidade, foram aspiradas com pipeta estéril Pasteur® e transferidas para outro Falcon®, no qual se adicionou 10 ml de tampão fosfatosalina (PBS; *Isotonic Phosphate Buffered Saline Solution; Phosphate Buffered saline tablets*, Sigma) seguido de nova centrifugação a 800xg por 10 minutos. Obteve-se um precipitado de células, que foram ressuspensas em 1 ml de PBS adicionados de 100 microlitros (µl) de dimetil-sulfóxido (DMSO, Sigma) para armazenamento em freezer (-80°C).

4.3- Extração de RNA

Utilizou-se para a extração de RNA o reagente tiocianato de guanidina (Trizol®, INVITROGEN, Cat N° 15596018), adicionado à suspensão celular na proporção de 1 ml para cada milhão de células mononucleares viáveis. Através de vigorosa pipetagem e pela ação caotrópica da guanidina, associada ao detergente sarcosil presente no Trizol®, rompem-se as células.

Adicionou-se a esta solução 200 µl de clorofórmio para cada mililitro de Trizol®. Agitou-se o tubo vigorosamente por 15 segundos, seguido de repouso por 2 a 3 minutos e centrifugação a 800xg por 15 minutos a 4°C. Nesta etapa, forma-se uma interfase, sobre a qual se identifica a fase aquosa contendo o RNA, que é transferida ao tubo Eppendorf®.

Para a precipitação do RNA, adicionou-se à fase aquosa 500 µl de isopropanol 100%, agitou-se vigorosamente o tubo, seguindo de repouso por 10 minutos em temperatura ambiente. Centrifugou-se novamente a 800xg por 10 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e acrescentou-se 1000 µl de etanol 85% ao precipitado, com posterior agitação e centrifugação a 700xg por 8 minutos a 4°C.

Retirou-se completamente o etanol e eluiu-se o precipitado de RNA em 40 µl de água pura (DNase/ RNase-free water, INVITROGEN, Cat. N° 10977023), adicionando-se 1 µl da enzima inibidora de RNase (RNase Inhibitor, Applied Biosystems, Cat. N° N8080119) para armazenamento a -80 °C. A concentração de RNA foi determinada por meio de espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 e 280 nanômetros.

Para a extração de RNA em tecidos muscular e adiposo, utilizou-se em média 30 mg de tecido. Retirou-se o tecido da solução de RNA later, macerou-se o músculo submerso em 1 ml de Trizol® e o tecido adiposo foi macerado submerso em 1 ml do reagente QIAzol® (QIAzol®, QIAGEN Cat N° 79306). As etapas seguintes foram iguais ao realizado para linfócitos.

4.4-Reação enzimática de transcrição reversa

Para a síntese do DNA complementar (DNAC) submeteu-se o RNA a uma reação enzimática modulada pela enzima transcriptase reversa. A reação foi preparada conforme a orientação do fabricante (TaqMan Reverse Transcription Reagents, Cat N° N8080234, Applied Biosystems).

Inicialmente, preparou-se a reação em temperatura ambiente, permanecendo apenas o RNA e a enzima em banho de gelo. Os volumes utilizados na reação estão descritos na Tab. 1.

TABELA 1: Reação de transcrição reversa.

Componentes	100 µl de reação	Concentração final
Buffer TaqMan RT 10X	10	1X
25 mM MgCl ₂	22	5,5 mM
DeoxyNTP	20	500 µM por dNTPs
Random Primers	5	2,5 µM
Inibidor de RNase	2	0,4 U/µl
Transcriptase Reversa MultiScribe	2,5	1,25 U/µl
Água pura	27,5
RNA	11	1 µg/11 µl
Total	100

TaqMan™ Reverse Transcription Reagents Kit, N8080234, Applied Biosystems

Colocou-se o tubo em termociclador que estabiliza a temperatura dos componentes da reação a 25°C por 10 minutos e alcança a temperatura ótima da reação a 48°C, mantida por 30 minutos, seguida da inativação da enzima com o aquecimento a 95°C por cinco minutos. O DNAc obtido foi posteriormente armazenado a -20 °C.

4.5- Escolha de oligonucleotídeos e sondas

O desenho de *primers* iniciadores, bem como da sonda, foi baseado em seqüência depositada no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e disponíveis pela Internet na página do OMIM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=138040>.

A sonda foi desenhada impedindo-se a formação de estrutura secundária entre ela e a região alvo, bem como longas repetições de um único nucleotídeo (especialmente guanina) ou híbridos sonda-*primers*. Como a sonda não é estendida pela reação enzimática, sua hibridização precisa ser mais estável, sendo necessária uma maior temperatura de dissociação (T_m), idealmente 5 °C maior que o anelamento e 10 °C maior que a temperatura de dissociação dos *primers*. Em nosso estudo tal temperatura variou entre 68-70 °C.

No desenho dos *primers*, evitou-se longas repetições de um único nucleotídeo (especialmente mais de quatro guaninas) e com T_m entre 58-60 °C. Os *primers sense* e anti-*sense* ficaram o mais próximo possível da sonda. A temperatura de anelamento da reação foi estabelecida em 5 °C abaixo do T_m dos *primers*.

Seguindo os critérios acima descritos, definiu-se a seguinte combinação de *primers* e sondas para a determinação da expressão da isoforma α do GR (seqüência de orientação 5' \rightarrow 3'):

- *Primer Sense*: GAAGGAAACTCCAGCCAGAA
- *Primer anti-sense*: CAGCTAACATCTCGGGGAAT
- Sonda: 6-FAM-CTTCCAAACATTTTTGGATAAGACCAT-TAMRA

4.6- Gene normalizador

Uma das principais etapas para a análise da expressão gênica por meio de PCR em tempo real envolve a escolha de um controle endógeno.

Embora não exista consenso quanto aos melhores genes para normalização, em nosso estudo o gene BCR (*Breakpoint Cluster Region*) foi escolhido, pois sua expressão é praticamente constante ao longo do tempo, além de ser expresso em quantidade semelhante ao GR (Collins et al, 1987). Como a expressão de BCR é estável, sua função é controlar eventuais alterações em algumas das fases do processo analítico, como viabilidade celular, extração do RNA, eficiência da transcrição reversa ou a presença de inibidores da reação de quantificação.

A utilização do gene BCR também exigiu a construção de uma curva-padrão em estudo prévio realizado em nosso serviço (Melo, 2004).

A seqüência da sonda e dos *primers* para o gene BCR estão descritos abaixo:

- *Primer Sense*: CCTTCGACGTCAATAACAAGGAT
- *Primer anti-Sense*: CCTGCGATGGCGTTCAC
- Sonda: 6-FAM-TCCATCTCGCTCATCATCACCGACA-TAMRA

4.7- A reação de PCR em tempo real

O método explora a atividade 5' nuclease da *Taq* polimerase em clivar uma sonda de hibridização não-extensível durante a fase de extensão da PCR. A abordagem utiliza sonda de hibridização marcada por dois fluorocromos, chamada atualmente de sondas TaqMan (Lee et al, 1993). Um fluorocromo, FAM (6-carboxi-fluoresceína), serve como emissor de fluorescência, sendo seu espectro de onda absorvido pelo outro fluorocromo, inibidor,

TAMRA (6-carboxi-tetrametilrodamina). Enquanto a sonda estiver intacta, ocorre transferência da energia fluorescente, sendo a emissão de luz fluorescente absorvida pelo fluorocromo inibidor. Durante a fase de extensão da PCR, a sonda de hibridização é clivada pela ação nucleolítica 5' → 3' da *Taq* polimerase. Com a quebra da sonda, a emissão fluorescente de FAM já não é mais transferida eficazmente para o fluorocromo inibidor TAMRA, resultando em incremento a emissão fluorescente com pico do espectro em 518 nm (Fig. 5).

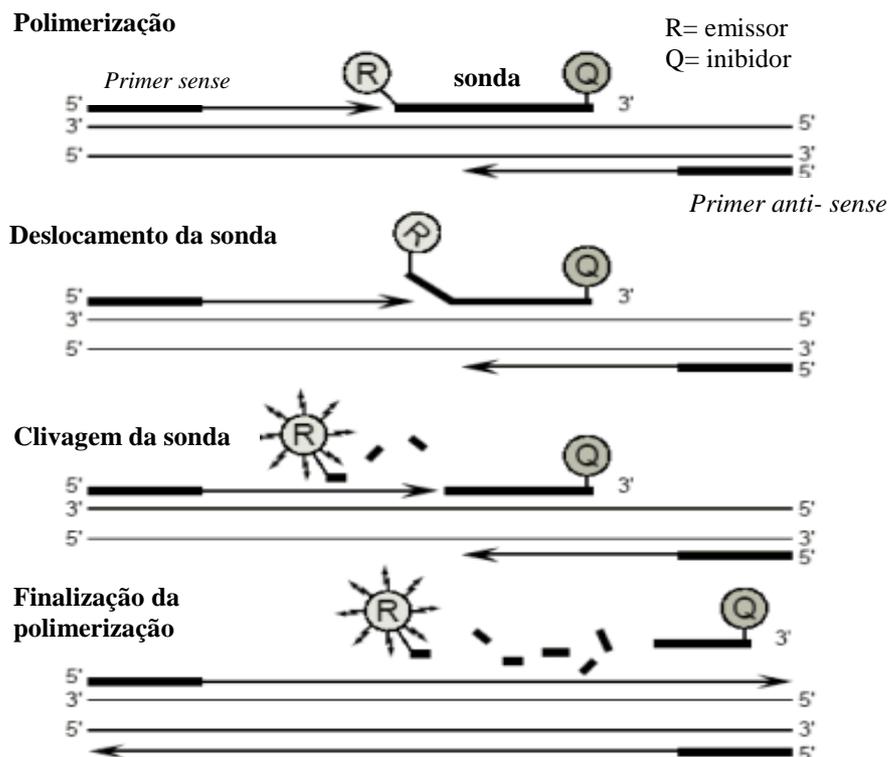


FIGURA 5: Representação da PCR em tempo real. A sonda de hibridização intacta não emite fluorescência. Com a atividade da *Taq* polimerase a sonda é clivada e o fluorocromo emissor (R) se afasta do inibidor (Q) que perde a capacidade de absorver sua energia, permitindo a emissão da fluorescência.

Como a fluorescência é uma emissão de energia luminosa de menor energia em relação ao estímulo inicial, foi desenvolvido um sistema de excitação por *laser*, com posterior captação da fluorescência por uma câmera CCD (*charged-coupled-device*). O programa computacional calcula um valor chamado ΔR_n , que é diferença entre a relação da intensidade luminosa do emissor e inibidor, depois e antes de uma fase de extensão da PCR. O valor médio de três medidas de ΔR_n em cada ciclo é representado graficamente em um *amplification plot*, onde os valores de ΔR_n são representados na ordenada e o tempo, representado pelo número de ciclos, na abscissa (Fig. 6).

O programa calcula automaticamente a variabilidade da emissão entre os ciclos 1 e 15 e determina a linha de corte, dez desvios-padrão acima da média da emissão destes ciclos. Determinada a linha de corte, forma-se uma intersecção entre esta e a curva de amplificação obtida em cada reação amplificada. Este ponto é denominado ciclo-limite (Ct) e é expresso como o número do ciclo nesta intersecção. O valor de Ct correlaciona-se fortemente com a quantidade inicial de seqüências-alvo na reação de PCR (Fig. 6) (Heid et al, 1996).

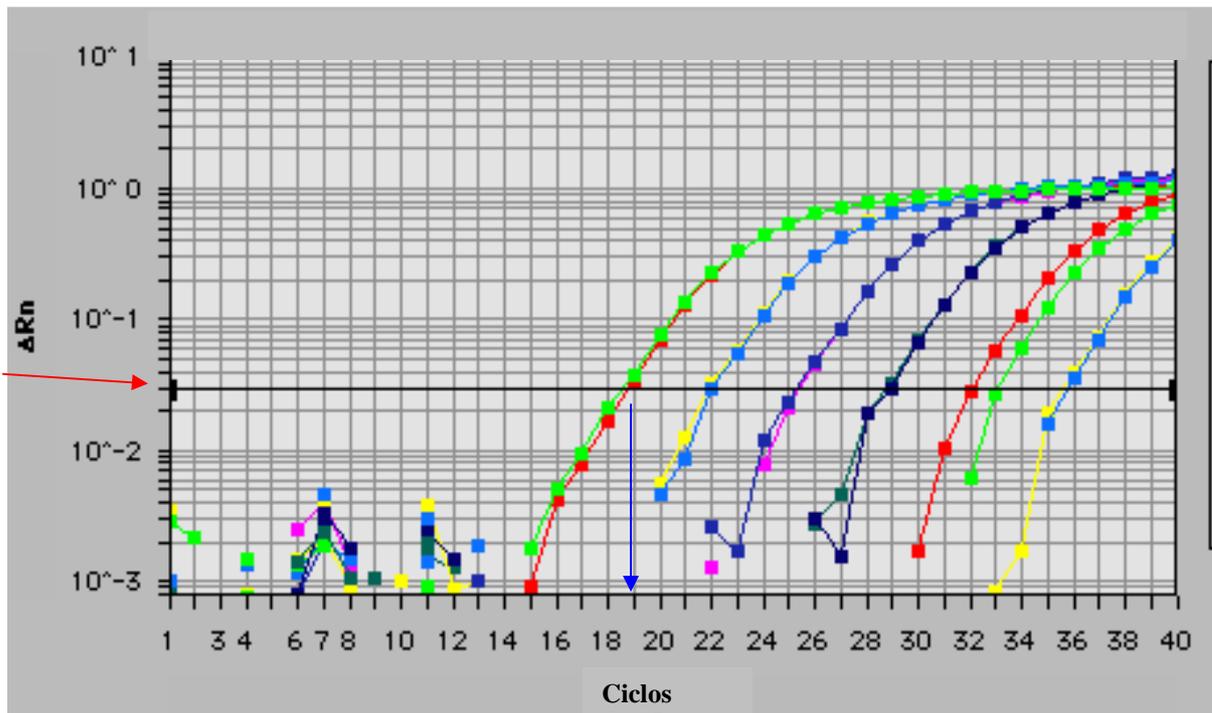


FIGURA 6: Gráfico de amplificação por PCR em tempo real. A seta vermelha indica a linha de corte e a seta azul indica o ciclo-limite (Ct) da amostra mais concentrada, na intersecção de sua curva de amplificação com a linha de corte (Ct = 19). Fonte: Melo, 2004.

No preparo das reações de PCR em tempo real, utilizou-se uma “solução-mãe” para cada gene (GR e BCR), preparadas de acordo com o número de amostras, em duplicata, a serem determinadas (Tab. 2).

TABELA 2: Preparo das soluções utilizadas na PCR em tempo real.

Componente	Volume por reação (µl)	Concentração final após adição de 5µl de cDNA
<i>Buffer TaqMan A 10X</i>	2,5	1X
25 mM MgCl ₂	4,5	4,5 mM
DeoxyNTP	2	500 µM de cada
<i>Primer sense</i>	0,5	200 nM
<i>Primer anti-sense</i>	0,5	200 nM
Sonda	0,5	100 nM
<i>AmpliTaq Gold 5U/mcl</i>	0,13	0,025 U/µl
Água pura	9,37
Total	20

TaqMan™ PCR Core Kit, N8080228, Applied Biosystems, Branshburg, New Jersey, USA.

O tampão específico para a reação (*TaqMan Buffer A*) contém um fluorocromo passivo (ROX™ - referência passiva) para corrigir as flutuações da fluorescência interna das amostras em função do volume ou da concentração da reação, favorecendo a precisão do experimento.

Adicionou-se 20 µl da “solução-mãe” em tubos de 200 µl utilizados para PCR em tempo real (*Optical Tubes, Applied Biosystems*) e 5 µl de DNAC, vedando com tampa de alta transparência (*Optical Caps, Applied Biosystems*). Uma vez que a quantificação é baseada na passagem de luz através do tubo e na captação da fluorescência gerada pela sonda, torna-se essencial a utilização de tubos e tampas de alta transparência.

Colocou-se os tubos no termociclador de tempo real (*ABI 7500, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). A programação de temperatura compreendeu uma ativação inicial da *Taq Gold* polimerase (*AmpliTaq Gold*). Esta ativação ocorreu a 95 °C por 10 minutos, seguida de 45 ciclos a 95 °C por 15 segundos (desnaturação) e a 60 °C por 90 segundos (anelamento e extensão dos *primers*).

Para evitar resultados falsos positivos devido à quebra da sonda não relacionada à amplificação, a representação gráfica de cada uma das reações foi examinada visualmente, garantindo haver elevação exponencial da fluorescência com o decorrer dos ciclos. A ocorrência de resultados falso-positivos decorrentes de contaminação das reações com DNAC de origem desconhecida foi controlada com a utilização dos controles negativos em cada análise.

O programa permite a visualização da curva-padrão de cada gene (Fig. 7), e a partir desta transforma os dados obtidos de Ct em número de células Jurkat, sendo calculada a

média do número de células de cada duplicata de cada um dos genes (GR e BCR), proporcionando o número de equivalentes de expressão gênica para GR α e BCR, e finalmente o cálculo da razão da expressão de GR α por BCR (GR α / BCR).

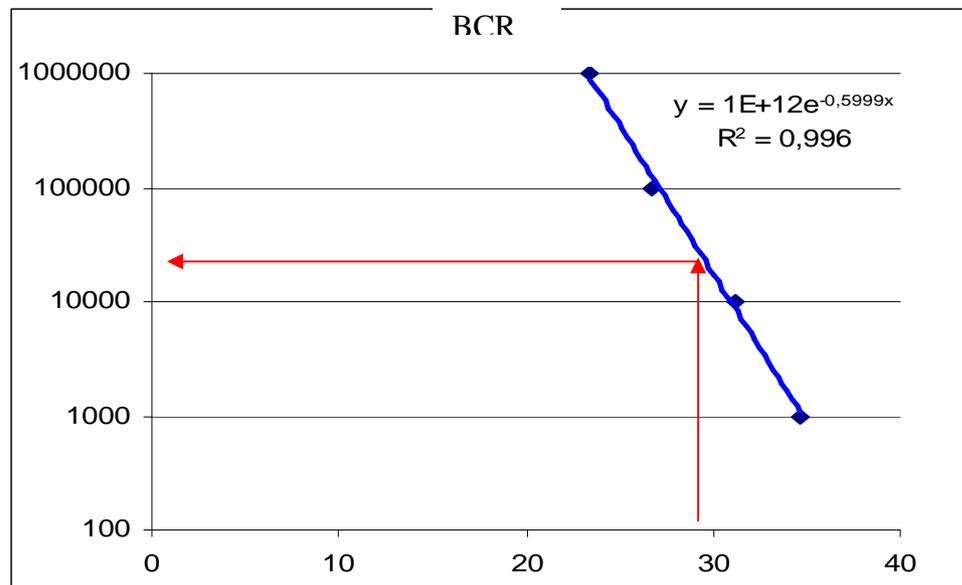
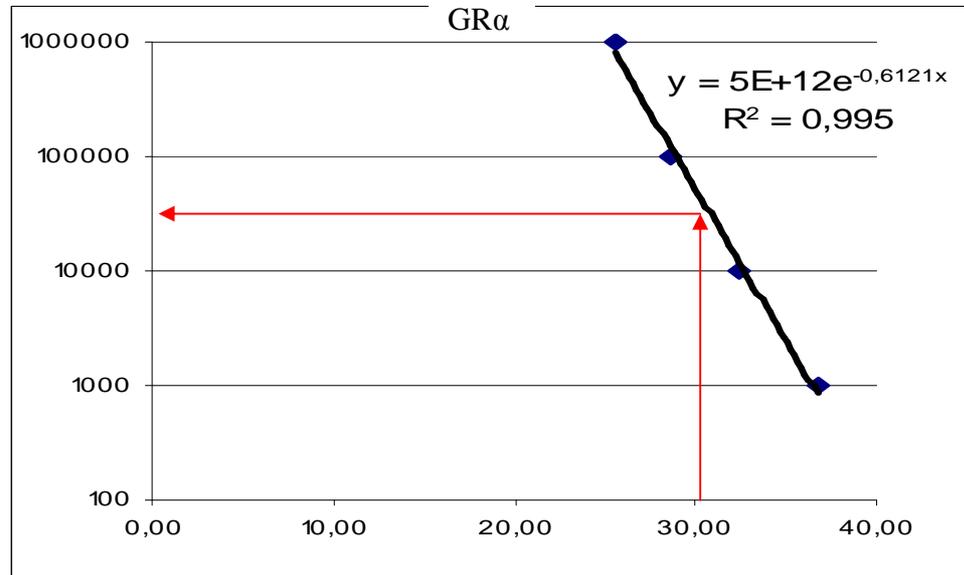


FIGURA 7: Curva-padrão de GR α e BCR obtida em experimento. O eixo da abscissa representa o Ct, enquanto que a ordenada representa o número equivalente de células Jurkt.

4.8- Análise estatística

Na análise estatística empregou-se o *software SigmaStat 3.5 for Windows (SPSS, Point Richmond, CA, USA)*.

Para análise da mesma variável em dois grupos utilizou-se o *t-test* para variável de distribuição paramétrica ou *Mann-Whitney rank sum test* para variável de distribuição não-paramétrica.

Ao avaliar a mesma variável em três ou mais grupos os testes empregados foram *ANOVA one way* para variável de distribuição paramétrica ou *ANOVA on ranks* para variável de distribuição não-paramétrica, com análise de covariância pelo teste de Kruskal-Wallis e comparações múltiplas entre os pares pelo método de *Student-Newman-Keuls*.

Para comparar a mesma variável, de um mesmo indivíduo, em dois tempos diferentes, utilizou-se *paired t-test* para variável de distribuição paramétrica ou *Wilcoxon signed rank test* para variável de distribuição não-paramétrica.

As diversas variáveis de um mesmo indivíduo foram correlacionadas através da correlação de Pearson e análise de regressão linear. Estabeleceu-se como significante um $p < 0,05$.

5- RESULTADOS

Foram avaliados 35 pacientes, com idade variando entre 30 e 75 anos [média (DP) = 54,4 (11,1) e mediana (p25-p75) = 54,0 (45,2-64,5) anos]. Vinte e seis eram do sexo masculino, com idade média (DP) = 53,7 (10,8) e mediana (p25-p75) = 53,5 (45,0-63,0) anos. Nove eram do sexo feminino, com idade média (DP) = 56,1 (12,6) e mediana (p25-p75) = 56,0 (47,2-68,0) anos; sem diferença significativa de idade entre os sexos (*t-test*; $p=0,59$).

Dentre os pacientes 26/35 (74,3%) eram brancos. O diagnóstico de doença arterial coronariana (DAC) foi estabelecido em 27 pacientes (77,2%), sendo os outros pacientes acompanhados com diagnóstico de: insuficiência aórtica (4 pacientes), cardiopatia congênita (2 pacientes) e dissecção de aorta (2 pacientes). Ocorreram 6 óbitos, dos quais 5 pacientes tinham insuficiência coronariana e 1 com dissecção de aorta. Eram tabagistas 19/35 casos (54,3%). Usavam inibidores de ECA (enzima conversora da angiotensina) e estatinas, respectivamente, 29/35 casos (82,8%) e 24/35 casos (68,5%).

De acordo com o grau de resistência insulínica identificado pelo HOMA IR, os pacientes foram separados em dois grupos: os não-resistentes à insulina (NRI) composto por 22 pacientes que apresentavam HOMA IR menor que 2,71; e os resistentes à insulina (RI; $n=13$) em que foram incluídos 8 pacientes com HOMA IR $\geq 2,71$ e 5 pacientes com diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2.

Quando utilizamos o HOMA Calculator, no primeiro grupo (NRI) 25 pacientes não tinham resistência insulínica (HOMA Calculator $\leq 1,8$) e no segundo grupo (RI) cinco pacientes apresentavam HOMA Calculator $> 1,8$ e cinco pacientes com diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 foram incluídos ($n=10$).

É válido salientar que o HOMA não foi calculado para os pacientes diabéticos.

5.1-Achados antropométricos

Houve diferença significativa (*t-test*; $p= 0,03$) entre os sexos apenas para o IMC, com o sexo feminino apresentando uma média (DP) de 30,1 (3,2) kg/m^2 e o masculino com média (DP) de 26,5 (4,3) kg/m^2 . A proporção de mulheres no grupo RI não foi diferente do grupo NRI (*z-test*; $p= 0,9$ para HOMA IR e $p=0,4$ para HOMA Calculator).

As variáveis sexo, idade, dados antropométricos e pressão arterial dos grupos estão representados na Tab. 3.

TABELA 3: Sexo, idade, dados antropométricos e pressão arterial de pacientes submetidos à cirurgia cardíaca divididos em grupos quanto a presença ou ausência de resistência à insulina, segundo HOMA IR.

Variável média (DP) mediana (p25-p75)	NRI n= 22	RI n= 13	TOTAL n= 35
Sexo M:F	17:5	9:4	26:9
Idade (anos)	55,4 (11,2) 55,5 (45,0-65,0)	52,7 (11,2) 53,0 (44,2-57,7)	54,4 (11,1) 54,0 (45,2-64,5)
IMC (kg/m ²)	26,0 (4,0) 26,5 (22,8-28,0)	29,3 (3,5)* 30,3 (27,0-31,8)	27,4 (4,3) 27,5 (23,8-31,1)
Cintura (cm)	92,0 (8,7) 93,0 (86,0-96,0)	103,40 (8,7)* 101,00 (97,2-109,5)	96,2 (10,2) 95,0 (91,0-101,7)
PAS (mmHg)	136,36 (30,6) 140,0 (110,0-160,0)	137,70 (24,2) 130,0 (125,0-160,0)	136,8 (28,0) 140,0 (112,5-160,0)
PAD (mmHg)	81,8 (15,0) 80,0 (70,0-90,0)	87,0 (18,0) 90,0 (70,0-90,0)	83,7 (16,1) 90,0 (70,0-90,0)

PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; NRI: não-resistente à insulina; RI: resistente à insulina; RINDM: resistente à insulina não-diabético; DM: diabético.

**t-test*; $p < 0,05$ ao se comparar com grupo NRI.

Quando a idade, IMC, cintura abdominal e pressão arterial foram comparados entre os grupos RI e NRI (segundo HOMA IR) observou-se diferença significativa do IMC e da cintura (Tab. 3). A diferença do IMC deve-se aos pacientes com resistência insulínica não-diabéticos [(n=8; média (DP)=29,5 (3,6); mediana (p25-p75)= 29,2 (27,2-32,2)] quando comparados com não-resistentes (*Student-Newman-Keuls*; $p=0,037$). A diferença da cintura deve-se tanto aos pacientes diabéticos [(n=5; média (DP)= 106,2 (8,0) e mediana (p25-p75)= 109,0 (99,5-112,0); *Student-Newman-Keuls*; $p=0,007$)], quanto aos resistentes não-diabéticos [(n=8; média (DP)=101,62 (9,2) e mediana (p25-p75)= 99,5 (96,0-104,5); *Student-Newman-Keuls*; $p=0,012$)] quando comparados com não-resistentes. Todos os pacientes resistentes à insulina tinham aumento de cintura abdominal, com destaque para os diabéticos que apresentaram a maior medida de cintura abdominal (*ANOVA one way*; $p= 0,002$). O mesmo ocorre quando se classifica a resistência insulínica pelo HOMA Calculator.

Eram obesos (IMC maior que 30), 18,2% (4/22) dos NRI e 53,8% (7/13) dos pacientes do grupo RI, segundo classificação pelo HOMA IR. Quando se utilizou o HOMA Calculator, 20% (5/25) dos NRI e 60% (6/10) do grupo RI tinham obesidade. O IMC teve correlação com a medida de cintura abdominal (Análise de regressão linear; $p < 0,001$; $r = 0,747$).

A hipertensão arterial esteve presente em 88,5% (31/35) dos pacientes.

5.2-Achados laboratoriais

O diagnóstico de glicemia de jejum alterada foi estabelecido em 18% (4/22) dos não resistentes à insulina e em 25% (2/8) dos resistentes não-diabéticos.

Quando o HOMA IR, a insulinemia, o colesterol total e frações foram comparados entre os grupos RI e NRI, observou-se diferença significativa da insulinemia e do HOMA IR (Tab. 4).

Setenta e três por cento (16/22) dos não-resistentes e 92,3% (12/13) dos resistentes à insulina tinham dislipidemia e usavam estatina. Todos os diabéticos eram dislipidêmicos e usavam estatina.

TABELA 4: Parâmetros metabólicos dos grupos resistentes e não-resistentes à insulina, classificados pelo HOMA IR.

Parâmetros metabólicos média (DP) mediana (p25-p75)	NRI n= 22	RI n= 13
CT (mg/dl)	176,68 (53,2) 166,50 (136,0-190,0)	192,60 (57,0) 167,0 (154,0-207,0)
HDL (mg/dl)	40,6 (8,2) 37,0 (35,0-43,0)	40,1 (7,3) 41,0 (35,0-45,0)
TG (mg/dl)	157,78 (72,0) 139,50 (101,0-189,0)	226,92 (177,60) 163,0 (122,0-233,0)
LDL (mg/dl)	110,13 (36,4) 107,50 (87,0-133,0)	119,46 (43,3) 110,0 (85,0-143,0)
GLC (mg/dl) †	94,0 (11,7) 93,5 (87,0-100,0)	92,0 (8,7) 89,5 (86,0-97,0)
INS (µU/ml) †	5,8 (2,7) 6,0 (3,0-8,0)	16,8 (7,1)* 14,0 (12,0-20,0)
HOMA IR †	1,5 (0,6) 1,5 (1,1-1,9)	5,2 (2,4) 4,9 (3,1-6,4) §

CT: colesterol total; GLC: glicemia; HDL: HDL-colesterol; HOMA IR: modelo homeostático de avaliação de resistência à insulina; INS: insulinemia; LDL: LDL-colesterol; TG: triglicerídeos; NRI: não-resistente à insulina; RI: resistente à insulina.

† Valores de pacientes diabéticos (n=5) não estão incluídos. Nestes pacientes a média (DP) e mediana (p25-p75) foram: glicemia: 154,20 (52,2) e 153,0 (124,0-174,0); insulinemia: 11,8 (6,4) e 12,0 (5,0-17,0). Nos pacientes diabéticos o HOMA não foi calculado.

* *t-test*; $p < 0,01$.

§ *Mann-Whitney rank sum test*; $p < 0,01$.

Achados semelhantes foram obtidos quando a resistência insulínica foi classificada de acordo com o HOMA Calculator. A média (DP) e mediana (p25-p75) do HOMA Calculator nos pacientes com resistência insulínica (n=25) foi de 0,9 (0,3) e 0,9 (0,6-1,1), e nos pacientes sem resistência insulínica e não-diabéticos (n=5) foi de 3,5 (1,1) e 3,0 (2,7-4,3).

Não houve diferença do cortisol sérico e dos hormônios tireoidianos entre os grupos (Tab. 5).

TABELA 5: Avaliação hormonal dos pacientes resistentes e não-resistentes à insulina, classificados pelo HOMA IR.

Parâmetros hormonais média (DP) mediana (p25-p75)	NRI n= 22	RI n= 13
F sérico (µg/dl)	9,1 (3,7) 9,0 (6,3-10,2)	7,4 (1,7) 7,7 (6,6-8,7)
TSH (µU/ml)	3,1 (2,7) 2,3 (1,4-4,0)	2,5 (1,2) 2,4 (1,5-2,6)
T4 T (µg/dl)	8,7 (2,3) 8,7 (6,6-9,7)	8,1 (1,7) 8,0 (7,0-9,2)
T4L (ng/dl)	1,3 (0,2) 1,2 (1,2-1,5)	1,1 (0,2) 1,1 (1,0-1,3)
T3 (ng/dl)	87,5(20,0) 85,5 (75,0-96,0)	90,5 (15,7) 91,0 (84,0-92,0)

F: cortisol; NRI: não-resistente à insulina; RI: resistente à insulina.

5.3- Quantificação do RNA mensageiro (RNAm) de GR α

Observou-se que houve diferença da quantidade de RNAm do GR α entre os tecidos (*Kruskal-Wallis test*; $p < 0,001$; Fig. 8). E, quando os diferentes tecidos foram comparados aos pares (*Student-Newman-Keuls test*; $p < 0,05$) encontrou-se que o músculo apresentou maior quantidade de RNAm do GR α que os linfócitos, o adiposo subcutâneo e o adiposo visceral, e o tecido adiposo visceral mostrou maior quantidade de RNAm do GR α do que os linfócitos e o adiposo subcutâneo.

Médias e medianas da quantidade de RNAm de GR α /BCR nos diferentes tecidos estão expostas na Tab. 6.

TABELA 6: Quantidade de RNAm de GR α /BCR nos linfócitos e tecidos adiposo subcutâneo, músculo, adiposo visceral dos pacientes submetidos à cirurgia cardíaca (n=35).

	Linfócitos	Subcutâneo	Músculo	Visceral
Média (DP)	17,5 (11,2)	29,0 (38,1)	43,6 (38,3)	34,2 (37,8)
Mediana(p25-p75)	14,02(7,6-25,0)	19,0(8,5-27,7)	39,4(17,2-52,9)	27,6(11,8-44,9)

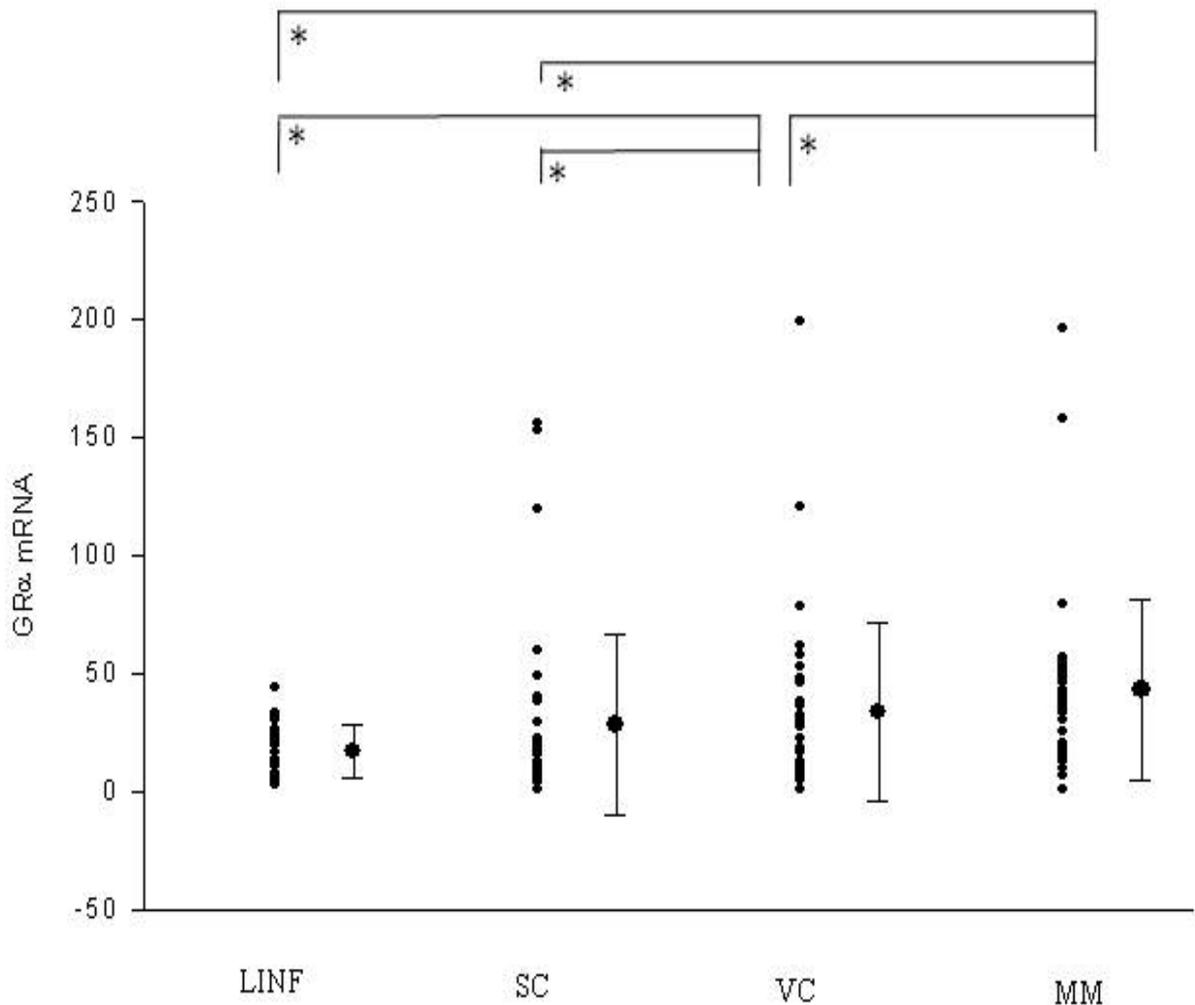


FIGURA 8: Comparação da quantidade de RNAm de GR α entre os diferentes tecidos.

LINF: linfócitos; SC: subcutâneo; VC: visceral; MM: músculo.

*análise de comparação de pares (*Student-Newman-Keuls*); $p < 0,05$. O centro da barra vertical representa a mediana e as extremidades os interquartis.

As médias e medianas da quantificação do RNAm do GR α /BCR observadas em linfócitos e tecidos adiposo subcutâneo, músculo, adiposo visceral nos diferentes grupos estão descritas na Tab. 7.

TABELA 7: Quantificação do RNAm do GR α (GR α /BCR) nos tecidos entre os grupos de resistentes e não-resistentes à insulina, classificados pelo HOMA IR.

Tecidos	NRI n= 22	RI n= 13
Média (DP)		
Mediana (p25-p75)		
LINF	18,5 (12,3) 15,3 (7,6-26,6)	15,7 (9,4) 14,0 (7,2-22,5)
SC	36,8 (46,1) 20,9 (8,4-38,9)	15,8 (9,8) 16,1 (8,5-20,5)
MM	50,1 (45,1) 44,5 (20,7-54,7)	31,1 (17,9) 34,4 (14,8-45,5)
VC	42,8 (44,0) 30,9 (16,6-48,2)	19,7 (17,1) 12,1 (8,3-30,2)*

NRI: não-resistente à insulina; RI: resistente à insulina; RINDM: resistente à insulina não-diabético; DM: diabético; LINF: linfócitos; SC: subcutâneo; MM: músculo; VC: visceral. *Mann-Whitney rank sum test; $p < 0,05$ ao se comparar com NRI.

Notou-se que a única diferença significativa ocorreu no tecido adiposo visceral. A relação GR α /BCR no visceral dos resistentes à insulina (RI) foi menor que a dos não-resistentes (Tab. 7), sendo os diabéticos responsáveis por essa diferença (Fig. 9).

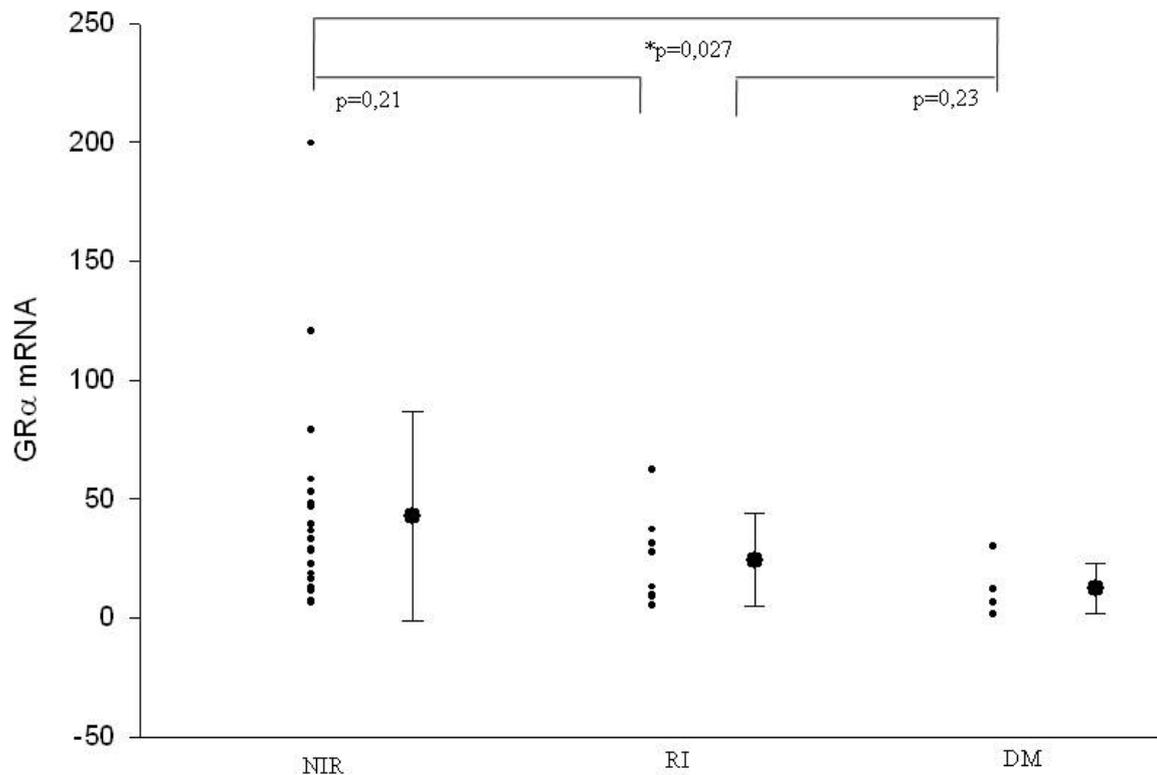


FIGURA 9: Quantificação do RNAm do GR α no tecido adiposo visceral epicárdico (VC) nos pacientes não-resistentes à insulina (NRI; n=22), resistentes à insulina não-diabéticos (RI; n=8) e diabéticos (DM; n=5). *Mann-Whitney test; $p < 0,05$. O centro da barra vertical representa a mediana e as extremidades os interquartis.

Quando se avaliou o grupo como um todo (n=35), houve uma correlação positiva da expressão de GR α dos linfócitos com os outros tecidos, principalmente com tecido adiposo visceral (Tab. 8).

TABELA 8: Coeficientes de correlação de Pearson da quantificação do RNAm do GR α em relação ao RNAm do gene normalizador BCR (GR α /BCR) nos diferentes tecidos dos pacientes submetidos à cirurgia cardíaca (n=35).

	Linfócitos	Subcutâneo	Músculo
Linfócitos	-	-	-
Subcutâneo	0,409*	-	-
Músculo	0,474*	0,498*	-
Visceral	0,602*	0,541*	0,654*

*Análise de regressão linear; $p \leq 0,01$.

Quando divididos em grupos classificados pelo HOMA IR ou HOMA Calculator, manteve-se a mesma correlação no grupo NRI (Tab. 9). Entretanto, nos pacientes com resistência à insulina (RI) esta correlação dos linfócitos com os outros tecidos não ocorreu (Tab. 10).

TABELA 9: Coeficientes de correlação de Pearson da quantificação do RNAm do GR α (GR α /BCR) nos diferentes tecidos dos pacientes não-resistentes à insulina, segundo classificação do HOMA IR (n=22).

	Linfócitos	Subcutâneo	Músculo
Linfócitos	-	-	-
Subcutâneo	0,436*	-	-
Músculo	0,530*	0,463*	-
Visceral	0,716*	0,524*	0,655*

*Análise de regressão linear; $p \leq 0,01$.

TABELA 10: Coeficientes de correlação de Pearson da quantificação do RNAm do GR α (GR α /BCR) nos diferentes tecidos dos pacientes resistentes à insulina, segundo classificação HOMA IR (n=13).

	Linfócitos	Subcutâneo	Músculo
Linfócitos	-	-	-
Subcutâneo	0,265	-	-
Músculo	0,155	0,527	-
Visceral	0,020	0,111	0,300

O paciente que apresentou a maior quantidade de RNAm do GR α em tecido adiposo visceral (paciente 6 - vide Anexo 2) era coronariopata, hipertenso, dislipidêmico, pertencia ao grupo NRI, não tinha síndrome metabólica, mas era o paciente avaliado com maior idade (75 anos). Este paciente também apresentou um elevado valor de RNAm do GR α no tecido muscular e nos linfócitos. A análise estatística permaneceu semelhante quando este paciente foi excluído, ou seja, a expressão do GR α em tecido adiposo visceral continuou sendo menor no grupo de resistentes à insulina (*t-test*; $p=0,047$) e não houve diferença na avaliação do GR α

nos outros tecidos. Não houve correlação da idade com a quantidade de RNAm do GR α nos diferentes tecidos.

O cortisol sérico apresentou correlação positiva significativa com GR α do músculo (Fig. 10). Entretanto, quando se excluiu o paciente 12 que tinha cortisol sérico mais elevado e um alto valor de GR α em músculo esta correlação não se manteve. Este paciente (vide Anexo 2) tinha síndrome metabólica, não era resistente à insulina, foi submetido a cirurgia de dissecação de aorta e evoluiu para óbito no primeiro dia de pós-operatório.

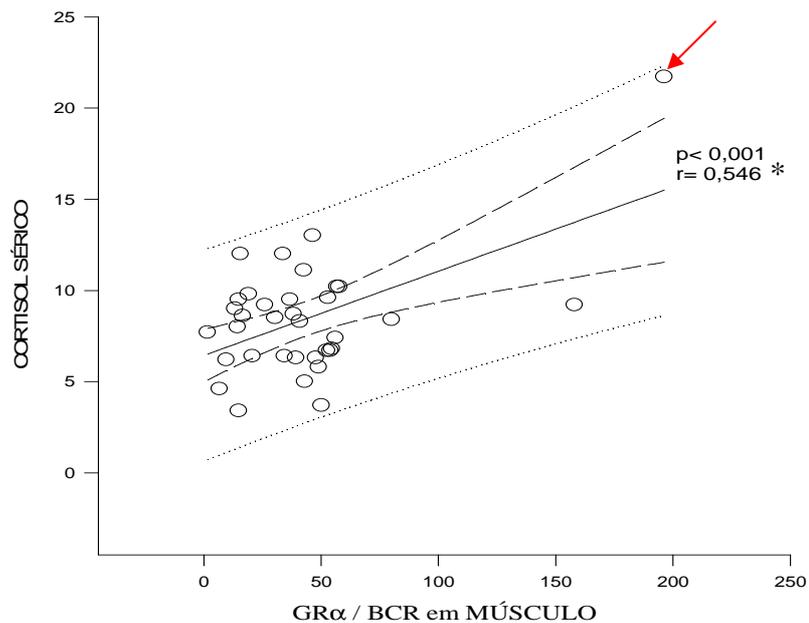


FIGURA 10: Correlação do cortisol sérico com a unidade de expressão de GR α em músculo nos pacientes submetidos à cirurgia cardíaca (n=35). A seta destaca o paciente 12.

*Análise de regressão linear.

Somente nos pacientes sem resistência à insulina observou-se que o HOMA IR apresentou uma correlação negativa com o cortisol sérico e com o GR α em linfócitos e músculo (Tab. 11). Observamos que o mesmo ocorre quando se classifica a resistência insulínica pelo HOMA Calculator.

TABELA 11: Coeficientes de correlação de Pearson da quantificação do RNAm do GR α (GR α /BCR) nos diferentes tecidos com o cortisol sérico e com o HOMA IR dos pacientes não-resistentes à insulina (n=22).

	Linfócitos	Subcutâneo	Músculo	Visceral	Cortisol sérico
Cortisol sérico	0,192	0,174	0,583*	0,116	
HOMA IR	-0,450*	0,005	-0,440*	-0,119	-0,441*

*Análise de regressão linear; $p \leq 0,01$.

5.4- Avaliação da sensibilidade hipotálamo-hipofisária aos glicocorticóides

Dezessete pacientes realizaram o teste de supressão com dexametasona intravenosa. A proporção de homens e mulheres no grupo que realizou o teste foi semelhante ao grupo como todo (*z test*; $p=0,77$), assim como a idade (*t-test*; $p=0,91$) e o IMC (*t-test*; $p=0,79$).

Não houve diferença dos parâmetros antropométricos e laboratoriais avaliados no intraoperatório e 60 dias após a cirurgia (Tab. 12).

TABELA 12: Avaliação laboratorial e antropométrica de dezessete pacientes realizada no momento cirúrgico e 60 dias após a cirurgia.

Parâmetros média (DP) mediana (p25-p75)	Na cirurgia	60 dias de PO
IMC (kg/m^2)	27,1 (3,6) 27,1 (24,6-28,7)	27,8 (4,0) 27,4 (25,1-30,4)
Cintura (cm)	97,7 (10,0) 96,0 (92,7-102,50)	99,1 (13,0) 98,0 (93,3-103,70)
PAS (mmHg)	132,94 (23,4) 130,0 (110,0-152,50)	121,8 (16,7) 120,0 (110,0-130,0) [§]
PAD (mmHg)	82,3 (16,8) 80,0 (70,0-90,0)	77,0 (11,6) 80,0 (70,0-82,5)
GLC (mg/dl) †	93,7 (11,4) 91,0 (87,0-100,0)	96,0 (7,9) 93,0 (91,0-100,0)
INS ($\mu\text{U}/\text{ml}$) †	11,2 (8,2) 10,5 (4,0-15,0)	13,2 (10,8) 9,0 (6,0-17,0)
HOMA IR†	2,6 (1,9) 2,6 (0,9-2,5)	3,2 (2,7) 2,0 (1,4-5,0)
F sérico ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	7,5 (1,9) 7,4 (6,3-9,0)	15,2 (3,5)* 16,9 (12,5-17,7)

F sérico: cortisol sérico; GLC: glicemia; HOMA IR: modelo homeostático de avaliação de resistência à insulina; IMC: índice de massa corporal; INS: insulinemia; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; PO: pós-operatório.

[§] *Wilcoxon signed rank test*; $p<0,05$.

* *Paired t-test*; $p<0,001$.

† Valores de pacientes diabéticos ($n=3$) não estão incluídos. Nestes pacientes a média (DP) e mediana (p25-p75) no dia da cirurgia (pré) e 60 dias após (pós) foram: Glicemia pré = 133,34 (34,0) e 153,00 (108,75-153,00); Glicemia pós = 120,34 (5,0) e 121,0 (116,50-124,0); Insulina pré = 13,7 (7,8) e 16,0 (7,7-19,0); Insulina pós = 14,0 (5,3) e 12,0 (10,5-18,0).

O cortisol basal (F_0 min) verificado no dia do teste de supressão foi maior do que o dosado no momento da cirurgia (Tab. 12, Fig. 10). E a quantificação de RNAm do $GR\alpha$ em linfócitos no pós-operatório [média (DP)= 5,7 (2,4)] foi menor do que a observada no período intraoperatório [média (DP)= 19,8 (13,6)] (*Paired t-test*; $p= 0,003$) (Fig. 11).

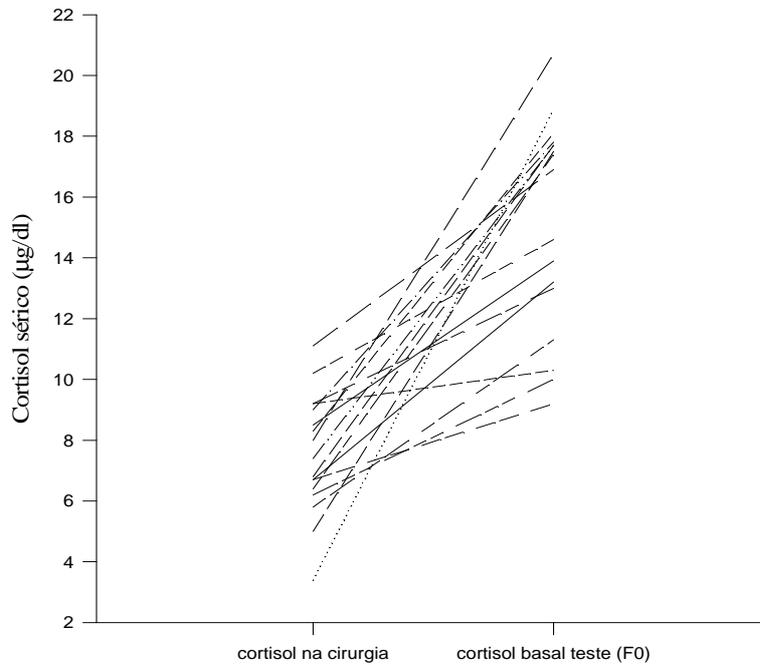


FIGURA 11: Cortisol sérico no momento da cirurgia e cortisol basal sérico (F_0) 60 dias após a cirurgia ($n= 17$). *Paired t-test*; $p<0,001$.

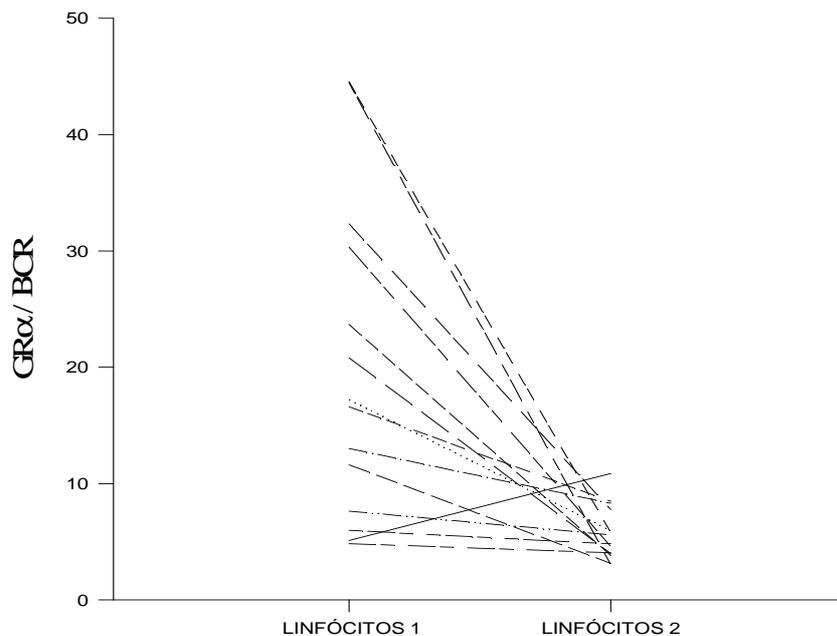


FIGURA 12: Quantificação de RNAm do $GR\alpha$ ($GR\alpha/BCR$) em linfócitos de quatorze pacientes avaliados no momento da cirurgia cardíaca (LINFÓCITOS 1) e 60 dias após a cirurgia (LINFÓCITOS 2). *Paired t-test*; $p<0,01$.

A insulinemia e o HOMA foram inversamente proporcionais ao percentual de supressão do cortisol após dexametasona, ou seja, quanto menor a supressão maior a insulinemia e o HOMA IR (Fig. 12, Fig. 13). A mesma correlação foi encontrada com HOMA Calculator (Correlação de Pearson; $r = -0,575$; $p=0,03$).

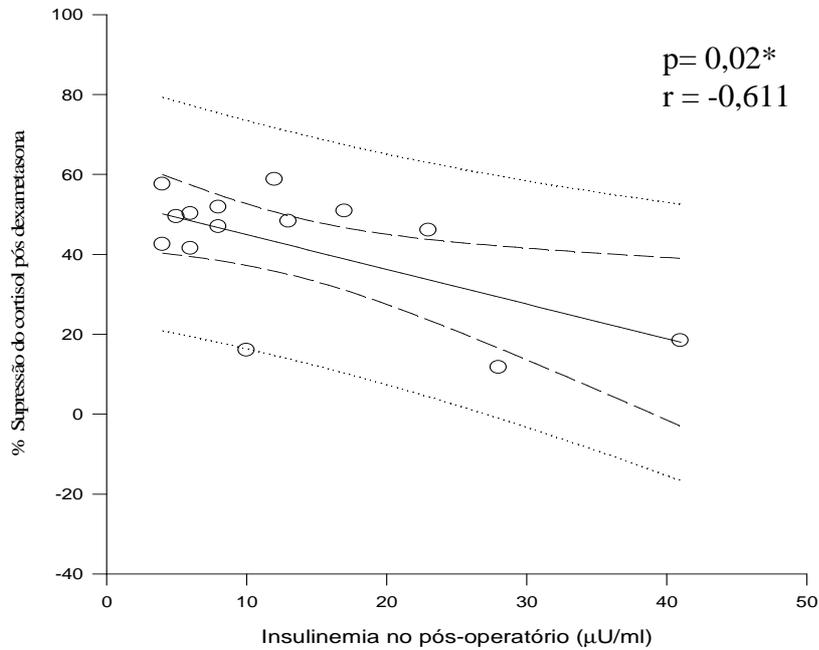


FIGURA 13: Correlação do percentual de supressão do cortisol sérico após dexametasona e a insulinemia.*Análise de regressão linear; $p < 0,05$.

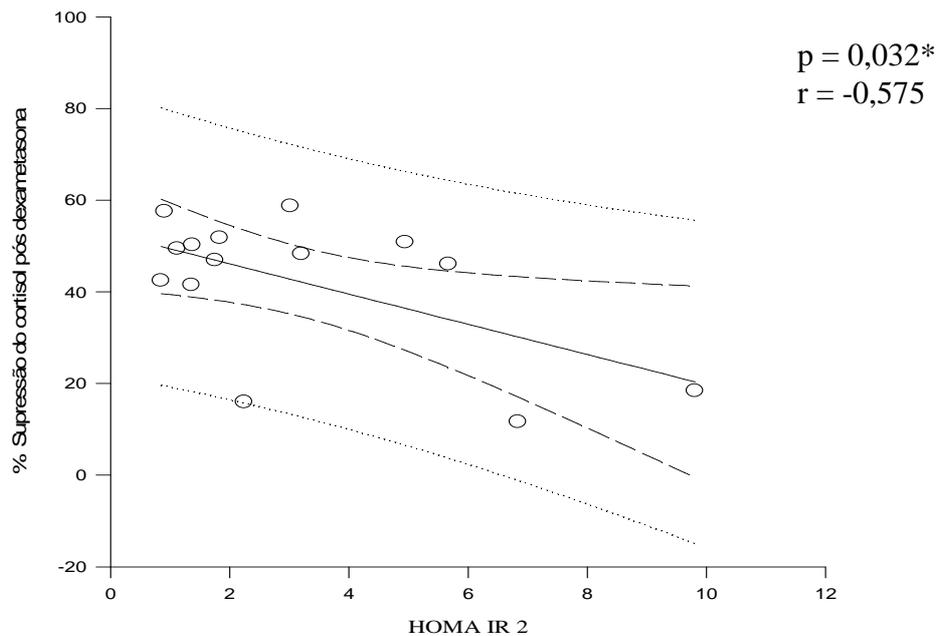


FIGURA 14: Correlação entre o percentual de supressão do cortisol sérico após dexametasona e o HOMA IR avaliado no dia do teste (HOMA IR 2). *Análise de regressão linear; $p < 0,05$.

Dentre os dezessete pacientes que realizaram o teste de supressão, dez tinham resistência insulínica, utilizando-se o HOMA IR. A média (DP) e mediana (p25-p75) do percentual de supressão nos pacientes com resistência insulínica foi de 40,5 (15,0) e 46,9 (34,8-49,4) e naqueles que não apresentavam resistência insulínica foi de 43,8 (13,4) e 46,9 (41,7-51,4) (*t-test*; $p=0,65$). Nos pacientes com resistência insulínica houve correlação do percentual de supressão do cortisol com o IMC, a cintura, a insulinemia e o HOMA IR verificados no dia do teste (Tab. 13), o que não ocorreu nos pacientes sem resistência à insulina.

Quando a resistência insulínica foi classificada pelo HOMA Calculator, dentre os dezessete pacientes que realizaram o teste, sete tinham resistência insulínica. A média (DP) e mediana (p25-p75) do percentual de supressão nos pacientes com resistência insulínica foi de 35,5 (15,1) e 38,8 (22,5-47,4) e naqueles sem resistência foi de 46,2 (12,0) e 48,8 (42,5-51,8) (*t-test*; $p=0,12$). Nenhuma correlação do percentual de supressão do cortisol com parâmetros clínicos e laboratoriais foi observada quando se classificou a resistência insulínica de acordo com HOMA Calculator.

TABELA 13: Coeficientes de correlação de Pearson entre o percentual de supressão do cortisol pós-dexametasona e as variáveis antropométricas e laboratoriais de pacientes com resistência insulínica (n=10).

	IMC	Cintura	Insulinemia	HOMA IR
%supressão F	- 0,645*	- 0,753*	- 0,695*	-0,665*

*Análise de regressão linear; $p \leq 0,05$.

Treze pacientes que tinham síndrome metabólica realizaram o teste, e a supressão do cortisol após dexametasona nestes [média (DP) e mediana (p25-p75) de 42,6 (13,6) e 47,8 (37,8-50,3)] não foi diferente dos pacientes sem síndrome metabólica [média (DP) e mediana (p25-p75) de 39,3 (17,2) e 42,0 (28,7-50,0)] (*Mann-Whitney rank sum test*; $p=0,61$). Assim como ocorreu quando os pacientes que fizeram o teste foram classificados como resistentes à insulina pelo HOMA IR, nos pacientes com síndrome metabólica houve uma correlação inversa do percentual de supressão do cortisol com o IMC, a cintura, a insulinemia e o HOMA IR (Tab. 14).

TABELA 14: Coeficientes de correlação de Pearson entre o percentual de supressão do cortisol pós-dexametasona e as variáveis antropométricas e laboratoriais de pacientes com síndrome metabólica (n=13).

	IMC	Cintura	Insulinemia	HOMA IR
%supressão F	- 0,688*	- 0,714*	- 0,721*	-0,690*

*Análise de regressão linear; $p \leq 0,05$.

Não houve correlação do percentual de supressão do cortisol após dexametasona com a avaliação molecular de GR α em linfócitos (Análise de regressão linear; $r = 0,347$; $p = 0,22$).

5.5- Resultados apresentados em relação à presença ou ausência de síndrome metabólica

Dentre os 35 pacientes, 25 tinham síndrome metabólica, e destes 52% (13/25) tinham resistência insulínica, segundo HOMA IR e HOMA Calculator. No entanto, 54,5% (12/22) dos pertencentes ao grupo NRI e 100% (13/13) do grupo RI preenchiam os critérios para síndrome metabólica.

Quando se analisou separando os pacientes em grupos de indivíduos com síndrome metabólica versus sem síndrome metabólica não se observou diferença na avaliação do GR α nos tecidos (Tab. 15). As diferenças nestes grupos foram àquelas relacionadas aos critérios utilizados na definição de síndrome metabólica (Tab. 16, Tab. 17).

TABELA 15: Avaliação molecular do GR α (GR α /BCR) em diferentes tecidos de pacientes com ou sem síndrome metabólica.

TECIDOS média (DP) mediana (p25-p75)	SM+ (n= 25)	SM - (n= 10)
LINFÓCITOS	16,0 (9,1) 14,0 (7,6-22,8)	20,7 (14,9) 16,7 (7,7-32,2)
SUBCUTÂNEO	27,9 (35,2) 19,7 (9,5-26,0)	31,4 (45,5) 9,8 (7,3-42,8)
MÚSCULO	44,7 (37,1) 41,8 (22,6-53,5)	41,3 (42,5) 34,4 (15,1-48,7)
VISCERAL	28,6 (20,3) 28,2 (12,1-38,0)	46,6 (60,6) 18,6 (9,7-47,1)

SM+: síndrome metabólica presente; SM-: síndrome metabólica ausente.

TABELA 16: Achados clínicos dos pacientes de acordo com a presença ou ausência de síndrome metabólica.

Parâmetros média (DP) mediana (p25-p75)	SM+ (n= 25)	SM- (n= 10)
SEXO M : F	17 : 8	9 : 1
IDADE (anos)	55,5 (9,8) 55,0 (49,0-63,5)	51,9 (13,7) 49,0 (38,5-64,5)
IMC (kg/m ²)	29,1 (3,6) 29,2 (26,9-32,1)	23,9 (3,6)* 22,8 (21,3-26,7)
CINTURA (cm)	100,67 (8,3) 100,50 (95,0-106,50)	86,4 (7,0)* 86,0 (80,2-91,0)
PAS (mmHg)	137,50 (24,7) 140,0 (115,0-160,0)	135,40 (35,6) 130,00 (105,0-160,0)
PAD (mmHg)	83,3 (14,3) 90,0 (70,0-90,0)	84,5 (20,2) 80,0 (65,0-97,5)

F: feminino; IMC: índice de massa corporal; M: masculino; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; SM+: síndrome metabólica presente; SM-: síndrome metabólica ausente. **t-test*; p<0,05.

TABELA 17: Resultados laboratoriais dos pacientes de acordo com a presença ou ausência de síndrome metabólica.

Parâmetros média (DP) mediana (p25-p75)	SM+ n= 25	SM- n= 10
CT (mg/dl)	197,83 (57,3) 184,50 (155,50-230,50)	149,36 (26,9)* 137,0 (126,70-167,20)
HDL (mg/dl)	38,0 (5,2) 37,5 (35,0-41,5)	45,6 (10,1) 48,0 (35,2-52,7)
TG (mg/dl)	218,0 (136,67) 174,0 (143,0-242,0)	108,18 (24,6) 101,0 (93,7-123,50) §
LDL (mg/dl)	124,08 (40,7) 121,0 (92,5-142,0)	90,7 (21,6)* 88,0 (73,5-104,70)
GLC (mg/dl)	107,20 (34,3) 96,0 (88,5-110,0)	91,2 (10,1) 91,0 (85,5-99,5)
INS (µU/ml)	9,8 (7,2) 8,0 (5,5-12,5)	5,9 (2,7) 5,0 (4,0-8,0)
HOMA IR	3,4 (2,5) 2,4 (1,6-4,9)	1,6 (0,8)* 1,3 (1,1-2,2)
F sérico (µg/dl)	8,8 (3,5) 8,5 (7,1-9,7)	7,5 (2,3) 6,4 (6,2-9,4)

CT: colesterol total; F: cortisol; GLC: glicemia; HDL: HDL colesterol; HOMA IR: modelo homeostático de avaliação da resistência à insulina; INS: insulinemia; LDL: LDL colesterol; SM+: síndrome metabólica presente; SM-: síndrome metabólica ausente, TG: triglicerídeos.

**t-test*; p<0,05.

§ *Mann-Whitney rank sum test*; p<0,05.

O uso de estatinas e inibidores de ECA não interferiu na avaliação do GR α , assim como o tabagismo e a presença ou não de óbito.

Na avaliação com relação à presença de insuficiência coronariana, a única diferença encontrada foi no HDL-colesterol, em que a média (DP) do HDL-colesterol nos pacientes com insuficiência coronariana foi de 37,9 (5,5) e naqueles sem insuficiência coronariana foi de 48,9 (8,0) (*t-test*; $p < 0,001$).

6- DISCUSSÃO

O crescente aumento do número e gravidade dos casos de obesidade associados ao proporcional aumento da morbidade por doenças cardiovasculares (DCV), representadas principalmente pelas doenças arteriais coronarianas (DAC), incentivaram uma série de estudos com o objetivo de elucidar o papel dos fatores de risco cardiovascular. Os estudos atuais buscam esclarecer as bases moleculares das doenças e o seu papel no desenvolvimento das complicações cardiovasculares.

Em nosso estudo, a maioria (74,3%) dos pacientes submetidos à cirurgia cardíaca era do sexo masculino, o que está de acordo com outros relatos (Gorter et al 2004; Maganti et al, 2009; Prasad et al, 2009). Apesar da idade média dos pacientes avaliados ser maior que 50 anos, a presença de 12/35 casos (34,4%) com idade menor que 50 anos sugere a preocupante tendência de maior frequência de complicações cardíacas em indivíduos jovens. Em pesquisa realizada em indivíduos japoneses com diagnóstico de DAC, 14,2% tinham menos de 55 anos (Furukawa et al, 2009).

É relevante citar que mais de 50% dos nossos pacientes eram tabagistas. Em estudo realizado na região metropolitana de São Paulo, Avezum et al (2005) demonstraram que o tabagismo foi o fator de risco independente mais importante para o infarto agudo do miocárdio, com prevalência quase seis vezes maior nos casos que nos controles.

O IMC foi maior no sexo feminino, o que não pode ser justificado pela resistência insulínica, visto que a proporção de mulheres no grupo de indivíduos resistentes à insulina não foi diferente do grupo não-resistente. De acordo com o esperado, quanto maior a resistência insulínica maior foi o percentual de obesos, sendo a medida da cintura abdominal sensível no diagnóstico de resistência insulínica, uma vez que todos os pacientes resistentes à insulina tinham aumento de circunferência abdominal.

Está bem estabelecido que a síndrome metabólica e o diabetes mellitus tipo 2 são alterações associadas às DCV, porém a relação entre resistência insulínica e DCV ainda é obscura (Steinberger et al, 2009). Em nosso estudo, 37% dos pacientes submetidos à cirurgia cardíaca tinham resistência insulínica e 71,4% apresentavam síndrome metabólica, ou seja, 48% dos pacientes com síndrome metabólica não tinham resistência insulínica, enquanto todos os pacientes com resistência insulínica apresentavam síndrome metabólica. Neste contexto, apesar da maioria dos indivíduos com resistência insulínica ter síndrome metabólica, nem todos os pacientes com síndrome metabólica têm resistência insulínica, o que pode significar que para a expressão da síndrome metabólica outros fatores estejam

envolvidos, como fatores inflamatórios, estresse oxidativo, adipocitocinas, dentre outros (Steinberger et al, 2009).

A diferente sensibilidade à insulina em vários tecidos pode estar relacionada a esta variabilidade de expressão da síndrome metabólica. A hiperinsulinemia, um marcador de resistência insulínica, está associada com aterosclerose e morbidade cardiovascular (Steinberger et al, 2009).

Acredita-se que um aumento da ação glicocorticóide, por maior concentração local de cortisol ou por maior sensibilidade tecido-específica a este hormônio, seja um dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no binômio síndrome metabólica-resistência insulínica.

No presente trabalho, estudou-se a expressão da isoforma α do receptor glicocorticóide nos tecidos: adiposo visceral epicárdico, adiposo subcutâneo superficial, muscular e nas células mononucleares de sangue periférico, de pacientes submetidos à cirurgia cardíaca. Como relatado em estudos anteriores (Rebuffé-Scrive et al, 1990; Goedecke, 2006; Anagnostis et al, 2009; Gross et al, 2009), os tecidos apresentaram diferentes quantidades de RNAm do GR α . Houve uma maior quantidade do GR α no tecido muscular, seguido, em ordem decrescente, pelo visceral, subcutâneo e linfócitos; com correlações positivas, embora fracas, da densidade de GR entre os diferentes tecidos de um mesmo indivíduo. É interessante mencionar que músculo e tecido adiposo visceral são tecidos envolvidos na patofisiologia da resistência insulínica. A influência dos glicocorticóides na diminuição da sensibilidade insulínica muscular associada à alta expressão do GR α neste tecido, sugere um possível mecanismo associado ao quadro de síndrome metabólica (Whorwood et al, 2002).

Rebuffé-Scrive et al (1990) observaram que a quantidade de RNAm do GR α foi maior em omento que em subcutâneo nas mulheres em pré-menopausa. Em nosso estudo, a densidade do GR no tecido adiposo visceral epicárdico foi maior que em linfócitos e adiposo subcutâneo superficial. Não concordante com nossos achados, Goedecke et al (2006) não identificaram quantidades diferentes de RNAm do GR α entre os compartimentos de tecido adiposo (visceral, subcutâneo profundo e subcutâneo superficial) em mulheres, mas detectaram correlação negativa entre o GR α do tecido adiposo subcutâneo e a insulinemia, e positiva correlação com a glicemia.

Em experimento realizado em homens por Whorwood et al (2001), constata-se que em mioblastos de músculo esquelético há alta expressão de GR α , o que indica que o músculo esquelético não é somente fundamental para captação de glicose mediada pela insulina, mas é também um importante tecido-alvo dos glicocorticóides. Estes autores sustentam a hipótese

de que a manutenção de elevada expressão de GR α em células musculares *in vivo* pode constituir um importante mecanismo fisiopatológico da síndrome metabólica e que pequenos aumentos da expressão de GR α no músculo resultam em aumento desproporcional da ação glicocorticóide e promoção de resistência insulínica (Whorwood et al, 2001). Em trabalho publicado em 2002 (Whorwood et al, 2002), os autores descrevem uma correlação positiva do GR α em mioblastos humanos com o IMC, o percentual de gordura corporal e a pressão arterial sistólica e uma correlação negativa entre a expressão de GR α e a captação de glicose no *clamping* euglicêmico-hiperinsulinêmico, ou seja, quanto maior a expressão de GR α em mioblastos maior a resistência insulínica.

Whorwood et al (2001) descrevem também que em meio de cultura livre de glicocorticóide há expressão somente de GR α e não de GR β , e ao se adicionar concentrações crescentes de cortisol no meio de cultura ocorre uma *down-regulation* do GR α acompanhada por uma *up-regulation* do GR β nos mioblastos, com conseqüente declínio da função do GR. Este efeito é compensado pelo aumento da atividade óxidoreductase da 11 β -HSD, mantendo maiores concentrações intracelulares de glicocorticóide ativo, evitando o declínio de função do GR (Whorwood et al, 2002).

Em nosso estudo, com variações fisiológicas do cortisol, observou-se que *in vivo* o cortisol sérico apresentou correlação positiva com GR α em músculo. Este aumento da concentração de cortisol acompanhado pelo aumento da densidade de GR α nas células musculares poderia ser justificado como mecanismo de proteção contra citocinas inflamatórias presentes nestes pacientes submetidos à cirurgia cardíaca. Confirmando tal fato, em estudo prévio * (Donovan, Whorwood, 1999) constata-se um aumento da expressão de GR α em células musculares esqueléticas pelas citocinas inflamatórias (interleucina 1 β e fator de necrose tumoral α) (citado por Whorwood et al, 2002). Além disso, demonstrou-se previamente que a interleucina 1 β e o fator de necrose tumoral α (TNF α) aumentam a concentração de 11 β -HSD1 nas células glomerulares de roedores, com conseqüente aumento da disponibilidade de cortisol livre intracelular e limitação dos efeitos inflamatórios causados por estas citocinas (Escher et al, 1997).

Os indivíduos da nossa pesquisa, além de sofrerem lesão tecidual causada pelo processo isquêmico da doença cardiovascular, foram submetidos a procedimento cirúrgico, que após liberação de citocinas pode ter determinado um aumento de GR α nas células

* Donovan SJ, Whorwood CB. (1999) apud Whorwood CB, Donovan SJ, Flanagan D, Phillips DI, Byrne CD. Increased glucocorticoid receptor expression in human skeletal muscle cells may contribute to the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2002 Apr;51(4):1066-75.

musculares esqueléticas, com conseqüente aumento da sensibilidade glicocorticóide neste tecido, funcionando como mecanismo adaptativo de proteção contra injúria tecidual. O aumento do GR α no momento do trauma tecidual foi confirmado em linfócitos, visto que a densidade de GR α em linfócitos, avaliada no dia da cirurgia, foi maior do que a analisada sessenta dias após o procedimento cirúrgico.

No entanto, observamos que as concentrações séricas de cortisol foram menores no momento cirúrgico do que aquelas medidas no pós-operatório, o que pode justificar as variações encontradas na densidade de GR α em linfócitos no dia da cirurgia e sessenta dias após, uma vez que o aumento das concentrações basais de cortisol sérico no pós-operatório pode ocasionar o fenômeno de *down-regulation* do GR. É relevante destacar que o método de quantificação do cortisol sérico foi o mesmo utilizado nos dois tempos e o período entre os ensaios foi curto (60 dias), e que os pacientes no momento da internação não usavam glicocorticóide exógeno. Entretanto, o fato de ter sido administrado benzodiazepínico para maioria dos pacientes na noite anterior da cirurgia e o uso de opióides (sufentanil) durante a indução anestésica foi um viés encontrado no estudo, já que no momento cirúrgico a coleta de sangue foi feita após a indução anestésica. E, como é descrito que os benzodiazepínicos e os opióides são capazes de inibir o eixo HHA (Lacoumenta et al, 1987; Roth-Isigkeit et al, 2000), justifica-se as baixas concentrações de cortisol no momento cirúrgico encontradas em alguns pacientes. Belli (2000) descreve em crianças submetidas à cirurgia cardíaca, redução nas taxas de cortisol sérico e ACTH ao se iniciar a abertura do tórax, com queda mais acentuada destes hormônios após a circulação extracorpórea e elevação gradativa dos mesmos durante a fase de reperfusão e saída da circulação extracorpórea.

Em estudo realizado em animais submetidos a trauma cirúrgico e hemorragia, Li et al (2009) observaram um aumento do glicocorticóide já no momento da indução anestésica quando comparados com controles, com significativa elevação da corticosterona aos trinta minutos após o trauma. Em humanos submetidos à cirurgia cardíaca, o estudo encontrado que avaliou as alterações hormonais no pós-operatório por maior tempo foi realizado até o sétimo dia após a cirurgia (Song et al, 2008). Neste relata-se que o cortisol aumenta no pós-operatório, atingindo um pico 24 horas após a cirurgia, com queda gradual nos dias subseqüentes, porém permanecendo no sétimo dia de pós-operatório acima das concentrações observadas no período anterior ao procedimento cirúrgico. Em nosso trabalho, a presença de concentrações basais de cortisol sérico elevadas, observada no período de sessenta dias após a cirurgia, pode ser um mecanismo fisiológico protetor contra o processo inflamatório do pós-operatório.

No grupo de pacientes sem resistência insulínica, identificamos correlação negativa entre o HOMA IR e o GR α tanto em músculo quanto em linfócitos, sugerindo que nestes pacientes a redução da expressão do gene GR α no músculo poderia ser um mecanismo adaptativo por reduzir a ação glicocorticóide e permitir que a sensibilidade insulínica seja parcialmente preservada. Corroborando com nossos achados, Whorwood et al (2001) descreveram que o aumento progressivo das concentrações de insulina em meio de cultura livre de soro induz o aumento da expressão e atividade da 11 β -HSD1 nos mioblastos *in vitro*, o que disponibiliza maior quantidade de glicocorticóide ativo intracelular, que por sua vez gera um fenômeno de *down-regulation* do GR α (Reynolds et al, 2002).

Nos pacientes com resistência insulínica esta correlação do HOMA IR com a expressão de GR α não foi identificada. Talvez por esta não ser uma correlação linear, já que neste estudo avaliamos a correlação por análise de regressão linear, ou porque nestes pacientes outros fatores sejam interferentes, uma vez que, como já citado anteriormente, citocinas inflamatórias podem regular a expressão de GR, assim como mecanismos pós-traducionais do GR e a enzima 11 β -HSD1.

Em tecido adiposo visceral epicárdico, nossos achados revelaram uma menor expressão do receptor glicocorticóide nos pacientes resistentes à insulina quando comparados com aqueles sem resistência insulínica. O ponto crítico de nosso estudo foi que com o aumento da resistência insulínica, como ocorre nos pacientes diabéticos, houve uma diminuição da expressão do receptor glicocorticóide no tecido adiposo visceral epicárdico, sugerindo que o aumento da resistência insulínica muscular esteja associado com a diminuição do GR α e dos excessivos efeitos glicocorticóides no tecido adiposo visceral. Isto poderia representar um mecanismo de proteção ativado pela progressão da resistência insulínica.

A diminuição do GR α em tecido adiposo visceral epicárdico observada nos pacientes diabéticos de nosso estudo não sofreu interferência do cortisol sérico, visto que este foi semelhante entre os indivíduos com resistência insulínica e os não-resistentes. Assim, um aumento da atividade ou expressão da enzima 11 β -HSD1 no tecido adiposo visceral e/ou a diminuição da proteína CBG, justificaria o aumento da biodisponibilidade intracelular do cortisol e o conseqüente mecanismo de *down-regulation* do GR α .

É amplamente aceito que os glicocorticóides induzem a resistência insulínica em todos os tecidos (Gathercole et al, 2007). A ação dos glicocorticóides em adipócitos diferenciados (células 3T3-L1) e células T CD4⁺ provoca diminuição da expressão da proteína IRS-1, o que parece ser uma importante via de ação não-genômica causadora de resistência insulínica

(Löwenberg et al, 2006). Em experimento realizado por Lundgren et al (2004), demonstra-se que os glicocorticóides diminuem a expressão de IRS-1 e diminuem a captação de glicose estimulada pela insulina em adipócitos de omento.

Sabemos que parte da ação glicocorticóide é regulada ao nível pré-receptor pela enzima 11 β -HSD1, que está colocalizada com o GR em várias células, incluindo o tecido adiposo e fígado. Em roedores, a hiperexpressão da 11 β -HSD1 no tecido adiposo causa obesidade central, dislipidemia e resistência insulínica (Masuzaki et al, 2001). Já o aumento da expressão da 11 β -HSD1 no fígado dos animais geneticamente modificados causa resistência insulínica sem obesidade (Paterson et al, 2004). Sabe-se que o aumento da expressão do receptor glicocorticóide e da enzima 11 β -HSD1 nos hepatócitos de ratos contribui para o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (Liu et al, 2005).

A atividade e expressão da enzima 11 β -HSD1 em tecido adiposo subcutâneo de humanos está aumentada em obesos e correlaciona-se com a resistência insulínica (Wake et al, 2003; Rask et al, 2002). O trabalho realizado por Mericq et al (2009) avaliando a expressão e atividade da enzima 11 β -HSD1 nos tecidos adiposo subcutâneo e visceral de crianças pré-púberes com IMC normal e peso de nascimento adequados para idade gestacional, não mostra diferença da expressão de RNAm desta enzima entre estes tecidos, mas há uma maior atividade enzimática no tecido adiposo visceral. Esta linha de pesquisa oferece um novo conceito aplicado no tratamento da síndrome metabólica, através da utilização de fármacos que inibem a enzima 11 β -HSD1. A inibição da 11 β -HSD1 pela carbenoxolona melhora a sensibilidade insulínica em adultos saudáveis (Walker et al, 1995) e em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (Andrews et al, 2003), entretanto a carbenoxolona não é um fármaco seletivo. O uso de inibidor seletivo da 11 β -HSD1, o BVT.2733, para tecido adiposo de ratos diabéticos aumenta a ação da insulina no fígado e diminui a glicemia (Alberts et al, 2003; Cooper, Stewart, 2009).

A insulina parece aumentar a atividade e a quantidade de RNAm da 11 β -HSD1 (Balachandran et al, 2008). Considerando o músculo como tecido com alta resistência insulínica, nossa hipótese é que neste tecido a 11 β -HSD1 não deva apresentar um aumento significativo de sua atividade e expressão, assim não há o aumento substancial esperado do cortisol ao nível muscular, não ocorrendo o mecanismo adaptativo de *down-regulation* do GR neste tecido. No entanto, em tecidos como o adiposo visceral, em que a resistência insulínica não é tão severa quanto no músculo, ocorre uma melhor ação da insulina o que acarreta um aumento da atividade da 11 β -HSD1, com conseqüente aumento do cortisol e *down-regulation*

do GR α . Tal situação justifica a maior concentração de RNAm do GR α no músculo em relação ao observado no tecido adiposo visceral epicárdico.

De acordo com os nossos achados e os dados da literatura, sugerimos a seguinte relação entre a ação glicocorticóide e a sensibilidade insulínica: os pacientes com resistência insulínica usualmente apresentam diferenças na sensibilidade insulínica nos diferentes tecidos. Nesta condição, a resistência insulínica é mais severa no músculo que no tecido adiposo visceral. Os glicocorticóides podem agravar a resistência insulínica com conseqüente hiperinsulinemia e, somando-se a isto, um aumento na biodisponibilidade intracelular de cortisol associado a maior atividade da 11 β -HSD1 amplificaria esta resistência insulínica (Cooper, Stewart, 2009). Maior quantidade de RNAm do GR α no músculo, aumenta a córtico-sensibilidade e piora a resistência insulínica neste tecido. No tecido visceral, um efeito protetor contra glicocorticóides é determinado pela *down-regulation* do GR α e uma resistência insulínica menos severa é observada, permitindo uma maior ação insulínica que acarreta progressiva adipogênese (Fig. 14).

Outros fatores podem influenciar a atividade transcricional do GR, como a interação do GR com outras macromoléculas (correguladores) e as modificações pós-traducionais do próprio GR, como a fosforilação, SUMOilação e ubiquitinação. A interação com cofatores que ativem a sinalização glicocorticóide e a maquinaria transcricional, pode aumentar a sensibilidade celular ao esteróide (Duma et al, 2006), aumentando seus efeitos sobre os genes-alvo. Desta forma, o aumento de moléculas coativadoras amplificaria a ação glicocorticóide nos adipócitos do tecido epicárdico visceral, o que explicaria uma maior sensibilidade deste tecido aos glicocorticóides, com conseqüente aumento da resistência insulínica. Esta hipersensibilidade aos glicocorticóides poderia promover um efeito de *down-regulation*, determinando a redução do GR.

A fosforilação do receptor glicocorticóide aumenta a capacidade de translocação do receptor para o núcleo e a habilidade do complexo GR-glicocorticóide em modular a transcrição de genes-alvo (Duma et al, 2006). Wang et al (2002) demonstrou correlação positiva entre o grau de fosforilação do resíduo de serina 211 e a atividade transcricional do GR, sugerindo que esta fosforilação seja um biomarcador da atividade do GR. Mutações dos sítios de fosforilação do GR (Webster et al, 1997) e dos substratos de ubiquitinação (Wallace, Cidlowski, 2001) que diminuem a meia-vida do receptor, provocam diminuição da densidade celular do GR.



IGURA 15: Mecanismo adaptativo dos níveis de RNAm do GR α e sensibilidade glicocorticóide durante a resistência insulínica. Em pacientes com resistência insulínica é observada uma sensibilidade tecido-específica à insulina. A falência da ação insulínica é predominante em músculo comparado ao tecido adiposo visceral. Identificamos uma maior intensidade de *down-regulation* do GR α no tecido visceral, o que representaria um efeito protetor por diminuir a sensibilidade glicocorticóide neste tecido. A diminuição da ação glicocorticóide protege contra a piora da resistência insulínica; com a melhor ação insulínica no tecido há manutenção da lipogênese visceral. Indivíduos com variantes polimórficas do GR que conferem maior sensibilidade glicocorticóide (C3, BclI, N363S) podem apresentar progressão mais severa da síndrome metabólica. No músculo, a *down-regulation* do GR α é menos intensa, o que permite uma maior ação glicocorticóide com piora da resistência insulínica. Ademais, a insulina sendo capaz de aumentar a fosforilação do GR e a atividade da 11 β -HSD1, elevando a concentração intracelular de glicocorticóide, provocaria *down-regulation* do GR α no tecido adiposo visceral com conseqüente redução da sensibilidade glicocorticóide.

É possível que em estágios avançados de resistência insulínica, a hiperinsulinemia, *per si*, seja capaz de modular a ação glicocorticóide. Georgakopoulos et al (1996) demonstraram que na presença de insulina ocorre uma hiperfosforilação do GR o que aumenta a atividade deste receptor, gerando por sua vez a ativação do processo de down-regulation. Assim, na presença de intensa resistência insulínica, como observado no tecido muscular, a menor ação insulínica acarretaria menor grau de fosforilação do GR α e menor ativação do GR neste tecido, com conseqüente redução do mecanismo de down-regulation e manutenção de concentração elevada de RNAm do GR α no músculo.

Outro mecanismo similar ao da ubiquitinação, porém responsável não somente pela degradação protéica, mas também por regular a estabilidade do receptor e sua atividade transcricional é chamado de SUMOilação. Este é um processo dinâmico, capaz de adicionar um polipeptídeo denominado SUMO (*small ubiquitin-related modifier-1*) aos substratos específicos do GR, por meio de reações catalisadas pela enzima Ubc9. Das quatro isoformas de SUMO identificadas, é reconhecido que três ligam-se ao receptor glicocorticóide (K277, K293 e K703) e tem impacto na função do GR, sendo relatado que a maior expressão de algumas isoformas de SUMO pode aumentar a transcrição induzida pelo GR por reduzir sua degradação (Duma et al, 2006). Mais trabalhos são necessários para esclarecer a regulação do GR por mecanismos pós-traducionais em pacientes com resistência insulínica ou síndrome metabólica, bem como a influência exercida por moléculas correguladoras na sensibilidade tecidual ao glicocorticóide.

A diminuição da proteína CBG também é um mecanismo capaz de aumentar a biodisponibilidade do cortisol, com conseqüente diminuição do GR. Lapidus et al (1986) descrevem que a concentração plasmática de CBG é inversamente proporcional ao IMC. Tal achado é confirmado por Fernandez-Real et al (2002) que encontraram associação negativa entre CBG e o IMC, cintura abdominal, HOMA, insulinemia e fatores inflamatórios, como a interleucina 6, propondo que uma menor concentração plasmática de CBG plasmática pode ser um preditor de diabetes mellitus tipo 2 e de doenças cardiovasculares. A presença de CBG em tecido adiposo de animais foi detectada por meio da medida da atividade da CBG através de sua ligação com a corticosterona (Grasa et al, 1998; Grasa et al, 2001). Entretanto, não se observou RNAm deste gene no tecido adiposo, o que sugere um seqüestro da CBG plasmática nos adipócitos, provavelmente através da expressão de receptor de CBG nestas células. Joyner et al (2007) também não evidenciaram a presença de RNAm do gene da CBG em pré-adipócitos de humanos, no entanto, notaram que a deficiência genética de CBG está associada ao aumento da proliferação e diferenciação de pré-adipócitos.

Variantes polimórficas ativadoras do gene GR α também podem estar implicadas na sensibilidade glicocorticóide tecido-específica de pacientes com resistência insulínica. Sítios alternativos de iniciação da tradução do GR α no domínio amino-terminal dão origem a diferentes isoformas de GR α , conhecidas como GR α -A (que é o GR α classicamente descrito), GR α -B, GR α -C1, GR α -C2, GR α -C3, GR α -D1, GR α -D2, GR α -D3. Estas isoformas são coexpressas nas células em diferentes quantidades (Gross et al, 2009). O GR α -C3 é descrito como a variante mais ativa e com atividade transcricional hormônio-dependente maior que do GR α -A (Lu, Cidlowski, 2005). Assim, uma maior proporção da isoforma GR α -C3 nos adipócitos do tecido visceral epicárdico dos pacientes com resistência insulínica, poderia aumentar a sensibilidade tecidual ao glicocorticóide, mesmo na presença de menor quantidade de receptor.

Sabe-se que a variante GR-P, uma proteína truncada do GR descrita em pacientes com mieloma múltiplo refratário, forma heterodímeros com a proteína GR α , provocando uma alteração conformacional do receptor que favorece a ligação hormônio-receptor. O complexo GR α - GR-P- glicocorticóide transloca para o núcleo e promove a transcrição de genes-alvo, em certos tipos celulares, de maneira mais eficiente do que quando esta transcrição é estimulada por homodímeros de GR α , agindo de forma tecido-específica no aumento da responsividade ao esteróide (de Lange et al, 2001). Desta maneira, o aumento da isoforma GR-P no tecido visceral epicárdico acompanhando o aumento da resistência insulínica, justificaria uma maior atividade transcricional induzida pelo glicocorticóide neste tecido, o que aumentaria a sensibilidade tecidual e conseqüentemente diminuiria a expressão do GR α . Logo, os achados de nosso estudo, como a diminuição da densidade do GR α no tecido adiposo epicárdico simultâneo ao aumento da resistência insulínica, pode estar relacionada com as situações acima citadas.

Outra hipótese compatível com maior atividade do gene GR α , apesar de menor quantidade de RNAm do GR no tecido adiposo visceral epicárdico dos pacientes com resistência insulínica, seria a presença de polimorfismos do gene GR causadores de maior sensibilidade glicocorticóide. O polimorfismo gênico é observado em mais de 1% da população e está associado com variações de função do GR (Gross et al, 2009). O polimorfismo do gene GR ER22/23EK está associado à diminuição da atividade transcricional do gene GR, menor incidência de diabetes mellitus tipo 2 e menor risco para doenças cardiovasculares (van Rossum, Lamberts, 2004). Já os polimorfismos do gene GR, Bcl I e N363S, associam-se com aumento da sensibilidade glicocorticóide e anormalidades

metabólicas (di Blasio et al, 2003) . Entretanto, em estudo realizado no Brasil (Cercato et al, 2009) a frequência do polimorfismo N365S foi de apenas 3,4%, menor que a observada em países como Austrália, onde atinge 19,8% da população.

Acrescentando dados à nossa avaliação molecular, observamos através do teste de supressão com dexametasona, uma correlação inversa entre a resistência insulínica e o percentual de supressão do cortisol, ou seja, quanto maior a resistência insulínica, menor a supressão do cortisol pós-dexametasona, sugerindo maior resistência hipotálamo-hipofisária ao glicocorticóide. Somando-se a este achado, nos grupos de pacientes com resistência insulínica e naqueles com síndrome metabólica houve associação negativa da supressão do cortisol com os parâmetros de avaliação de obesidade e resistência insulínica (IMC, cintura, insulinemia e HOMA IR). Apesar destas correlações terem se mostrado fracas ou intermediárias, sendo necessário um maior número de indivíduos para que conclusões definitivas possam ser estabelecidas, outros trabalhos também corroboram para os resultados do presente estudo. Longui et al (2003) sugeriram uma parcial resistência glicocorticóide em pacientes obesos, visto que nestes indivíduos foi necessário o dobro da dose de dexametasona oral ($150 \mu\text{g}/\text{m}^2$) para promover a mesma supressão do cortisol observada nos controles (que receberam dose de $75 \mu\text{g}/\text{m}^2$). Em trabalho realizado por Faria (2009) também foi descrito uma correlação negativa do percentual de supressão do cortisol com a cintura abdominal e insulinemia. Assim, parece haver nos pacientes obesos e com resistência insulínica uma resistência hipofisária ao glicocorticóide. Para confirmar o exposto, faz-se necessária a realização de estudos de avaliação molecular do GR comparando o tecido hipotálamo-hipofisário com os tecidos musculares e adiposos.

7- CONCLUSÕES

- A quantidade de RNAm do GR α varia nos diferentes tecidos de um mesmo indivíduo, sendo: músculo > adiposo visceral epicárdico > adiposo subcutâneo > linfócitos;
- No tecido adiposo visceral epicárdico, houve correlação entre a diminuição da quantidade de RNAm do GR α e o aumento da resistência insulínica;
- O aumento da resistência insulínica está correlacionado à menor sensibilidade hipotálamo-hipofisária à dexametasona;
- Não há relação entre a sensibilidade hipotálamo-hipofisária à dexametasona e o GR α de nenhum dos tecidos avaliados.

8- ANEXOS

ANEXO 1: Definições de síndrome metabólica.

Parâmetros	OMS 1998	NCEP-ATP III 2001	NCEP-ATP III – Revisado 2003	IDF 2004
Triglicérides elevado (mg/dl)	≥ 150	≥ 150	≥ 150 ou em tratamento para hipertrigliceridemia	≥150 ou em tratamento para hipertrigliceridemia
HDL colesterol baixo (mg/dl)	<39 (mulher) < 35(homem)	< 50 (mulher) < 40 (homem)	< 50 (mulher) < 40 (homem) ou em tratamento para HDL colesterol baixo	< 50 (mulher) < 40 (homem) Ou em tratamento para HDL colesterol baixo
Pressão arterial elevada (mm Hg)	≥ 140/90	≥ 130/85	≥ 130/85 ou em tratamento para hipertensão	≥ 130/85 ou em tratamento para hipertensão
Glicemia de jejum alterada (mg/dl)	-	≥ 110	≥ 100 ou com diagnóstico de diabetes mellitus	≥ 100 ou com diagnóstico de diabetes mellitus
Circunferência de cintura (cm)	-	> 88 (mulher) >102 (homem)	> 88 (mulher) >102 (homem)	≥ 80 (mulher) ≥ 94 (homem)
Relação cintura/quadril	>0,85(mulher) >0,90(homem)	-	-	-
Índice massa corporal (IMC)	>30 kg/m ²	-	-	-
Microalbuminúria	≥20 µg/min ou relação albumina/creatinin a ≥ 30 mg/g	-	-	-
Definição	Presença de resistência insulínica identificada por hiperinsulinemia, intolerância a glicose ou diabetes mellitus, associada com dois ou mais dos parâmetros acima	Três ou mais dos parâmetros acima	Três ou mais dos parâmetros acima	Obesidade central mais dois ou mais dos parâmetros acima

ATP III: *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*; IDF: *International Diabetes Federation*; OMS: Organização Mundial de Saúde; ≥ : maior ou igual; > : maior; < : menor .

ANEXO 2: Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes sem resistência insulínica, classificados pelo HOMA IR (n= 22).

Paciente	Sexo	Idade	Raça	IMC kg/m ²	CA cm	PAS mmHg	PAD mmHg	HAS ou em tratamento	CT mg/dl	HDL mg/dl	TG mg/dl	LDL mg/dl	Dislipidemia ou em tratamento
1	F	68	Branca	23,3	84,0	100,00	80,0	SIM	263,00	36,0	189,00	142,00	SIM
2	F	68	Branca	30,6	102,00	160,00	90,0	SIM	199,00	42,0	189,00	143,00	SIM
3	F	59	Parda	32,6	95,0	150,00	100,00	SIM	302,00	36,0	277,00	211,00	SIM
4	F	56	Parda	27,3	93,0	150,00	90,00	SIM	179,00	43,0	141,00	108,00	SIM
5	F	37	Parda	28,5	86,0	90,0	60,0	NÃO	125,00	52,0	110,00	62,0	NÃO
6	M	75	Branca	26,3	84,0	120,00	80,0	SIM	125,00	36,0	96,0	70,0	SIM
7	M	71	Branca	27,5	107,00	140,00	70,0	SIM	190,00	40,0	106,00	129,00	SIM
8	M	67	Branca	22,2	78,0	200,00	100,00	SIM	121,00	34,0	101,00	67,0	SIM
9	M	65	Branca	24,9	93,0	170,00	110,00	SIM	136,00	32,0	67,0	91,0	SIM
10	M	63	Parda	21,0	91,0	130,00	90,0	SIM	150,00	35,0	116,00	92,0	SIM
11	M	61	Branca	26,7	96,0	120,00	80,0	SIM	156,00	35,0	163,00	88,0	SIM
12	M	59	Branca	31,3	106,00	160,00	90,0	SIM	182,00	32,0	199,00	133,00	SIM
13	M	55	Branca	34,4	102,00	180,00	100,00	SIM	251,00	37,0	359,00	142,00	SIM
14	M	54	Branca	18,5	76,0	90,0	60,0	NÃO	137,00	48,0	155,00	109,00	NÃO
15	M	52	Branca	27,7	94,0	110,00	60,0	SIM	278,00	33,0	234,00	167,00	SIM
16	M	49	Branca	22,4	79,0	150,00	90,0	SIM	165,00	52,0	138,00	88,0	NÃO
17	M	48	Branca	23,8	95,0	160,00	90,0	SIM	115,00	35,0	250,00	69,0	SIM
18	M	45	Negra	22,8	86,0	120,00	80,0	NÃO	168,00	62,0	93,0	87,0	NÃO
19	M	44	Branca	25,2	96,0	140,00	80,0	SIM	187,00	38,0	174,00	122,00	SIM
20	M	43	Branca	27,3	91,0	160,00	80,0	SIM	132,00	55,0	99,0	84,0	NÃO
21	M	42	Branca	28,0	101,00	100,00	60,0	SIM	148,00	37,0	89,0	107,00	NÃO
22	M	37	Branca	20,7	88,0	100,00	60,0	SIM	178,00	43,0	126,00	113,00	SIM

CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; HAS: hipertensão arterial sistêmica; HDL- colesterol; IMC: Índice de massa corporal; LDL- colesterol; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; TG: triglicérides

Continuação do ANEXO 2: Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes sem resistência insulínica, classificados pelo HOMA IR (n= 22).

Paciente	Glicemia mg/dl	Insulinemia μU/ml	HOMA IR	Cortisol μg/dl	TSH μU/ml	T4 Total μg/dl	T4 Livre ng/dl	T3 ng/dl	GRα/BCR Linfócitos	GRα/BCR Adiposo Subcutâneo	GRα/BCR Músculo	GRα/BCR Adiposo Visceral
1	97,0	5,0	1,20	8,7	4,10	8,1	1,4	105,00	27,2	38,9	38,3	52,9
2	76,0	9,0	1,69	3,7	2,53	5,8	1,4	75,0	3,7	6,6	50,2	16,6
3	84,0	7,0	1,45	13,0	4,72	7,7	1,2	81,0	7,5	20,9	46,5	28,8
4	102,00	8,0	2,01	12,0	0,88	8,4	1,1	130,00	16,8	10,8	33,8	12,6
5	98,0	8,0	1,93	6,4	3,10	6,4	1,2	85,0	6,3	1,1	20,7	6,5
6	87,0	3,0	0,64	9,2	4,20	9,7	1,6	62,0	44,5	60,2	158,12	199,67
7	88,0	9,0	1,95	6,8	13,3	8,7	1,2	74,0	11,6	153,7	54,7	39,1
8	91,0	10,0	2,24	4,6	1,4	10,0	1,2	88,0	8,0	8,2	6,8	16,6
9	92,0	6,0	1,36	10,2	2,4	6,3	1,2	92,0	16,6	22,0	57,7	28,1
10	100,00	4,0	0,99	6,3	6,7	8,0	1,3	83,0	22,1	9,8	47,8	47,3
11	122,00	3,0	0,90	8,5	1,0	8,7	8,3	74,0	5,1	8,4	30,4	48,2
12	85,0	2,0	0,42	21,7	1,25	6,6	1,5	41,0	32,7	119,80	196,34	79,1
13	112,00	6,22	1,66	9,8	3,17	8,7	1,2	94,0	7,6	21,3	19,2	22,7
14	88,0	5,0	1,09	12,0	1,03	12,6	1,5	93,0	12,7	5,0	15,7	18,6
15	98,0	2,0	0,48	11,1	2,11	8,9	1,1	99,0	20,8	29,5	42,6	36,5
16	79,0	4,0	0,78	5,8	1,64	10,2	1,1	132,00	44,5	49,7	49,0	46,8
17	95,0	7,0	1,64	9,6	1,75	6,4	1,3	86,0	25,5	13,0	53,0	58,4
18	74,0	2,0	0,37	9,5	0,99	6,0	1,5	74,0	26,6	7,1	14,9	11,7
19	90,0	2,0	0,44	8,4	2,25	10,0	1,0	75,0	14,0	29,4	80,1	32,9
20	109,00	8,0	2,15	6,3	1,93	8,7	1,5	96,0	34,0	156,10	39,4	120,6
21	102,00	8,0	2,01	10,2	2,43	9,3	1,6	103,00	11,3	20,9	56,8	11,5
22	100,00	10,0	2,47	6,2	4,6	15,8	1,7	84,0	7,6	16,8	9,7	7,3

Continuação do ANEXO 2: Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes sem resistência insulínica, classificados pelo HOMA IR (n= 22).

Paciente	Síndrome metabólica - IDF	Tabagismo	IAM	Óbito	CIRURGIA
1	SIM	SIM	SIM	SIM	Revascularização
2	SIM	NÃO	SIM	SIM	Revascularização
3	SIM	SIM	NÃO	SIM	Revascularização
4	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	Valvoplastia
5	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Correção de cardiopatia congênita - CIA
6	NÃO	SIM	SIM	NÃO	Revascularização
7	SIM	NÃO	SIM	NÃO	Revascularização
8	NÃO	SIM	SIM	SIM	Revascularização
9	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	Revascularização
10	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Revascularização
11	SIM	SIM	SIM	NÃO	Revascularização
12	SIM	NÃO	NÃO	SIM	Cirurgia de dissecação de aorta
13	SIM	NÃO	SIM	NÃO	Revascularização
14	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Valvoplastia
15	SIM	NÃO	SIM	NÃO	Revascularização
16	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	Cirurgia de dissecação de aorta
17	SIM	SIM	NÃO	NÃO	Revascularização
18	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Correção de cardiopatia congênita - CIA
19	SIM	NÃO	SIM	SIM	Revascularização
20	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Valvoplastia
21	SIM	SIM	SIM	NÃO	Aneurismectomia de ventrículo esquerdo
22	NÃO	SIM	SIM	NÃO	Revascularização

CIA: Comunicação interatrial; IAM: Infarto agudo do miocárdio.

ANEXO 3: Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com resistência insulínica, classificados pelo HOMA IR (n= 13).

Paciente	Sexo	Idade	Raça	IMC kg/m ²	CA cm	PAS mmHg	PAD mmHg	HAS ou em tratamento	CT mg/dl	HDL mg/dl	TG mg/dl	LDL mg/dl	Dislipidemia ou em tratamento
23	F	55	Branca	32,8	98,0	130,00	70,0	SIM	332,00	39,0	223,00	168,00	SIM
24	F	50	Negra	31,6	101,00	140,00	90,0	SIM	210,00	45,0	168,00	120,00	SIM
25	F	39	Parda	27,3	92,0	100,00	60,0	NÃO	160,00	41,0	174,00	84,0	SIM
26	F	73	Branca	31,3	109,00	140,00	90,0	SIM	135,00	41,0	120,00	69,0	SIM
27	M	66	Branca	23,9	94,0	160,00	90,0	SIM	203,00	48,0	263,00	102,00	SIM
28	M	53	Branca	35,2	121,00	130,00	80,0	SIM	278,00	35,0	162,00	213,00	SIM
29	M	46	Branca	28,1	108,00	130,00	90,0	SIM	155,00	38,0	163,00	128,00	SIM
30	M	39	Negra	27,1	100,00	170,00	90,0	SIM	152,00	47,0	123,00	110,00	NÃO
31	M	36	Negra	30,4	99,0	160,00	120,00	SIM	206,00	53,0	89,0	135,00	SIM
32	M	67	Branca	30,3	111,00	180,00	120,00	SIM	201,00	28,0	694,00	172,00	SIM
33	M	55	Branca	32,6	115,00	130,00	90,0	SIM	167,00	43,0	145,00	97,00	SIM
34	M	54	Branca	23,3	95,0	110,00	70,0	SIM	142,00	34,0	111,00	86,0	SIM
35	M	52	Branca	26,5	101,00	110,00	70,0	SIM	163,00	29,0	515,00	69,0	SIM

CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; HAS: hipertensão arterial sistêmica; HDL- colesterol; IMC: Índice de massa corporal; LDL -colesterol; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; TG: triglicerídeos

Continuação do ANEXO 3: Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com resistência insulínica, classificados pelo HOMA IR (n= 13).

Paciente	Glicemia mg/dl	Insulinemia μU/ml	HOMA IR	Cortisol μg/dl	TSH μU/ml	T4 Total μg/dl	T4 Livre ng/dl	T3 ng/dl	GRα/BCR Linfócitos	GRα/BCR Adiposo Subcutâneo	GRα/BCR Músculo	GRα/BCR Adiposo Visceral
23	89,0	19,0	4,17	8,6	1,47	5,3	1,2	92,0	19,8	4,0	16,6	9,4
24	108,00	21,0	5,59	8,3	2,52	6,6	1,0	80,0	32,3	21,4	40,9	31,2
25	82,0	15,0	3,03	6,7	2,17	7,8	1,0	93,0	7,6	22,6	54,0	37,2
26	153,00	16,0	-	5,0	1,38	10,6	1,5	84,0	5,6	16,2	43,1	6,3
27	90,0	13,0	2,89	9,0	4,24	8,0	1,1	91,0	17,2	19,2	13,35	5,03
28	92,0	32,0	7,26	9,2	2,5	10,8	1,1	92,0	23,7	5,7	26,1	12,9
29	88,0	15,0	3,26	3,4	1,3	8,8	1,3	88,0	8,0	10,4	14,9	62,3
30	102,00	11,0	2,77	7,4	2,47	7,1	1,1	88,0	13,0	20,2	56,1	27,6
31	85,0	13,0	2,72	6,4	2,90	5,9	1,0	98,0	4,8	9,7	34,4	9,0
32	134,00	12,0	-	7,7	5,6	7,1	0,8	61,0	14,0	8,1	1,67	1,65
33	237,00	6,0	-	9,5	2,1	8,0	1,6	84,0	22,0	40,6	36,8	11,9
34	153,00	20,0	-	8,0	1,57	10,1	1,3	92,0	6,0	8,7	14,5	12,0
35	238,00	5,0	-	6,7	2,39	8,9	1,0	130,00	30,3	19,1	52,5	29,9

Continuação do ANEXO 3 : Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com resistência insulínica (n= 13).

Paciente	Síndrome metabólica - IDF	Diabetes mellitus	Tabagismo	IAM	Óbito	CIRURGIA
23	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Revascularização
24	SIM	NÃO	SIM	SIM	NÃO	Revascularização
25	SIM	NÃO	SIM	SIM	NÃO	Revascularização
26	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	Revascularização
27	SIM	NÃO	SIM	SIM	NÃO	Revascularização
28	SIM	NÃO	SIM	SIM	NÃO	Revascularização
29	SIM	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	Revascularização
30	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Valvoplastia
31	SIM	NÃO	SIM	SIM	NÃO	Aneurismectomia de ventrículo esquerdo
32	SIM	SIM	SIM	SIM	NÃO	Revascularização
33	SIM	SIM	SIM	SIM	NÃO	Revascularização
34	SIM	SIM	SIM	SIM	NÃO	Revascularização
35	SIM	SIM	SIM	SIM	NÃO	Revascularização

CIA: Comunicação interatrial; IAM: Infarto agudo do miocárdio.

ANEXO 4: Concentração de cortisol basal e após 120 minutos da dexametasona intravenosa, percentual de supressão do cortisol, concentração de glicemia, insulinemia, HOMA IR e quantidade de RNAm GR α /BCR em linfócitos obtidos sessenta dias após a cirurgia (n= 17).

Paciente	Cortisol basal $\mu\text{g/dl}$	Cortisol após dexametasona $\mu\text{g/dl}$	% supressão do cortisol após dexametasona	Glicemia mg/dl	Insulinemia $\mu\text{U/ml}$	HOMA IR	GR α /BCR Linfócitos
6	13,0	7,6	41,5	92,0	6,0	1,36	3,0
7	17,7	9,4	46,9	89,0	8,0	1,76	3,1
9	14,6	8,4	42,5	86,0	4,0	0,85	8,5
11	13,9	6,7	51,8	93,0	8,0	1,84	10,8
15	16,9	8,4	50,2	93,0	6,0	1,38	4,0
16	11,3	4,8	57,5	92,0	4,0	0,91	5,8
22	10,0	8,4	16,0	91,0	10,0	2,24	-
24	18,1	8,9	50,8	118,00	17,0	4,95	7,8
25	9,2	7,5	18,4	97,0	41,0	9,81	5,6
26	17,5	10,7	38,8	115,00	10,0	-	-
27	17,8	9,0	49,4	91,0	5,0	1,12	5,9
28	10,3	9,1	11,6	99,0	28,0	6,84	3,8
29	18,9	10,2	46,0	100,00	23,0	5,67	-
30	17,7	7,3	58,7	102,00	12,0	3,02	8,3
31	17,4	9,0	48,2	100,00	13,0	3,21	4,0
34	20,7	10,8	47,8	121,00	20,0	-	4,8
35	13,2	8,6	34,8	125,00	12,0	-	4,6

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anagnostis P, Athyros VG, Tziomalos K, Karagiannis A, Mikhailidis DP. Clinical review: The pathogenetic role of cortisol in the metabolic syndrome: a hypothesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Aug; 94:2692-2701.
- Alberts P, Nilsson C, Selen G, Engblom LO, Edling NH, Norling S, et al. Selective inhibition of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 improves hepatic insulin sensitivity in hyperglycemic mice strains. *Endocrinology.* 2003 Nov;144(11):4755-62.
- Andrews RC, Rooyackers O, Walker BR. Effects of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone on insulin sensitivity in men with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Jan;88(1):285-91.
- Ashraf J, Thompson EB. Identification of the activation-labile gene: a single point mutation in the human glucocorticoid receptor presents as two distinct receptor phenotypes. *Mol Endocrinol.* 1993 May;7(5):631-42.
- Avezum A, Piegas LS, Pereira JC. Risk factors associated with acute myocardial infarction in the São Paulo metropolitan region: a developed region in a developing country. *Arq Bras Cardiol.* 2005 Mar;84(3):206-13.
- Balachandran A, Guan H, Sellan M, van Uum S, Yang K. Insulin and dexamethasone dynamically regulate adipocyte 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Endocrinology.* 2008 Aug; 149:4069-4079.
- Bamberger CM, Bamberger AM, de Castro M, Chrousos GP. Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *J Clin Invest.* 1995 Jun;95(6):2435-41.
- Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev.* 1996 Jun;17(3):245-61.
- Bansilal S, Farkouh ME, Fuster V. Role of insulin resistance and hyperglycemia in the development of atherosclerosis. *Am J Cardiol.* 2007 Feb;99(4A):6B-14B.
- Barnes PJ. Anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids. *Biochem Soc Trans.* 1995 Nov;23(4):940-5.
- Baker AR, Silva NF, Quinn DW, Harte AL, Pagano D, Bonser RS, et al. Human epicardial adipose tissue expresses a pathogenic profile of adipocytokines in patients with cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol.* 2006 Jan;5:1.
- Belli LA. Alterações hormonais em crianças submetidas à correção cirúrgica de cardiopatia congênita: influência da circulação extracorpórea e da hipotermia. Tese (Mestrado). São Paulo: Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina; 2000.
- Benetos A, Thomas F, Pannier B, Bean K, Jégo B, Guize L. All-cause and cardiovascular mortality using the different definitions of metabolic syndrome. *Am J Cardiol.* 2008 Jul;102(2):188-91.

Bodine PV, Litwack G. Purification and structural analysis of the modulator of the glucocorticoid-receptor complex. Evidence that modulator is a novel phosphoglyceride. *J Biol Chem.* 1988 Mar;263(7):3501-12.

Breslin MB, Geng CD, Vedeckis WV. Multiple promoters exist in the human GR gene, one of which is activated by glucocorticoids. *Mol Endocrinol.* 2001 Aug;15(8):1381-95.

Briaud I, Dickson LM, Linghor MK, McCuaig JF, Lawrence JC, Rhodes CJ. Insulin receptor substrate-2 proteasomal degradation mediated by a mammalian target of rapamycin (mTOR)-induced negative feedback down-regulates protein kinase B-mediated signaling pathway in beta-cells. *J Biol Chem.* 2005;280:2282-2293.

Buckingham JC. Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *Br J Pharmacol.* 2006 Jan;147 (Suppl 1): S258-68.

Burnstein KL, Cidlowski JA. The down side of glucocorticoid receptor regulation. *Mol Cell Endocrinol.* 1992 Jan;83(1):C1-8.

Buttgereit F, Wehling M, Burmester GR. A new hypothesis of modular glucocorticoid actions: steroid treatment of rheumatic diseases revisited. *Arthritis Rheum.* 1998 May;41(5):761-7.

Cercato C, Halpern A, Frazzatto ES, Guazzelli IC, Villares SM. The N363S polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: effects on visceral fat assessed by abdominal computed tomography. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009 Mar;53(2):288-92.

Cidlowski JA, Cidlowski NB. Regulation of glucocorticoid receptors by glucocorticoids in cultured Hela S3 cells. *Endocrinology.* 1981 Dec;109(6):1975-82.

Cidlowski JA, Michaels GA. Alteration in glucocorticoid binding site number during the cell cycle in HeLa cells. *Nature.* 1977 Apr;266(5603):643-5.

Chang WC, Roth GS. Changes in the mechanisms of steroid action during aging. *J Steroid Biochem.* 1979 Jul;11(1C):889-92.

Chung EH, Curran PJ, Sivasankaran S, Chauhan MS, Gossman DE, Pyne CT, et al. Prevalence of metabolic syndrome in patients < or =45 years of age with acute myocardial infarction having percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol.* 2007 Oct;100(7):1052-5.

Collins S, Coleman H, Groudine M. Expression of bcr and bcr-abl fusion transcripts in normal and leukemic cells. *Mol Cell Biol.* 1987 Aug;7(8):2870-6.

Cooper MS, Stewart PM. 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 and its role in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis, metabolic syndrome, and inflammation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Dec; 94:4645-4654.

Cornier MA, Dabelea D, Hernandez TL, Linstrom RC, Steig AJ, Stob NR, et al. The metabolic syndrome. *Endocr Rev.* 2008 Dec;29(7):777-822.

Cosío BG, Torrego A, Adcock IM. Molecular mechanisms of glucocorticoids. Arch Bronconeumol. 2005 Jan;41(1):34-41.

de Lange P, Segeren CM, Koper JW, Wiemer E, Sonneveld P, Brinkmann AO, et al. Expression in hematological malignancies of a glucocorticoid receptor splice variant that augments glucocorticoid receptor-mediated effects in transfected cells. Cancer Res. 2001 May;61(10):3937-41.

de Sousa Peixoto RA, Turban S, Battle JH, Chapman KE, Seckl JR, Morton NM. Preadipocyte 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is a keto-reductase and contributes to diet-induced visceral obesity in vivo. Endocrinology. 2008 Apr;149(4):1861-8.

Deveci E, Yesil M, Akinci B, Yesil S, Postaci N, Arikan E, et al. Evaluation of insulin resistance in normoglycemic patients with coronary artery disease. Clin Cardiol. 2009 Jan;32(1):32-6.

di Blasio AM, van Rossum EF, Maestrini S, Berselli ME, Tagliaferri M, Podestà F, et al. The relation between two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and body mass index, blood pressure and cholesterol in obese patients. Clin Endocrinol (Oxf). 2003 Jul;59(1):68-74.

Diamant S, Shafrir E. Modulation of the activity of insulin-dependent enzymes of lipogenesis by glucocorticoids. Eur J Biochem. 1975 May;53(2):541-6.

Dong Y, Poellinger L, Gustafsson JA, Okret S. Regulation of glucocorticoid receptor expression: evidence for transcriptional and posttranslational mechanisms. Mol Endocrinol. 1988 Dec;2(12):1256-64.

Duma D, Jewell CM, Cidlowski JA. Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. J Steroid Biochem Mol Biol. 2006 Dec;102(1-5):11-21.

Escher G, Galli I, Vishwanath BS, Frey BM, Frey FJ. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta enhance the cortisone/cortisol shuttle. J Exp Med. 1997 Jul;186(2):189-98.

Eyzaguirre F, Mericq V. Insulin resistance markers in children. Horm Res. 2009 Jan;71:65-74.

Faria DC. Avaliação *in vivo* da sensibilidade ao glicocorticóide: descrição do teste de supressão intravenoso com dose muito baixa de dexametasona e sua correlação com a expressão do GR α em crianças e adolescentes obesos submetidos a um programa de atividade física. Tese (Doutorado). São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2009.

Faria DC, Cobra JF, Sousa E Silva T, Melo MR, Rocha MN, Hayashi LS, et al. A very low dose intravenous dexamethasone suppression test as na index of glucocorticoid sensitivity. Horm Res. 2008; 69(6):357-62.

Faria CD, Longui CA. Molecular aspects of glucocorticoid sensitivity. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2006 Dec;50(6):983-95.

- Fernandez-Real JM, Pugeat M, Grasa M, Broch M, Vendrell J, Brun J, et al. Serum corticosteroid-binding globulin concentration and insulin resistance syndrome: a population study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Oct;87(10):4686-90.
- Fernandez-Rodriguez E, Stewart PM, Cooper MS. The pituitary-adrenal axis and body composition. *Pituitary.* 2009;12(2):105-15.
- Fessler MB, Rudel LL, Brown JM. Toll-like receptor signaling links dietary fatty acids to the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol.* 2009 Oct;20(5):379-85.
- Fraenkel M, Ketzinel-Gilad M, Ariav Y, Pappo O, Karaca M, Castel J, et al. mTOR inhibition by rapamycin prevents beta-cell adaptation to hyperglycemia and exacerbates the metabolic state in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2008 Apr;57(4):945-57.
- Francke U, Foellmer BE. The glucocorticoid receptor gene is in 5q31-q32 [corrected]. *Genomics.* 1989 May;4(4):610-2.
- Frayn KN. Visceral fat and insulin resistance – causative or correlative? *Br J Nutr.* 2000 Mar;83 (Suppl.1):S71-7.
- Furukawa Y, Ehara N, Taniguchi R, Haruna Y, Ozasa N, Saito N, et al. Coronary risk factor profile and prognostic factors for young japanese patients undergoing coronary revascularization. *Cir J.* 2009 Jun.
- Gathercole LL, Bujalska IJ, Stewart PM, Tomlinson JW. Glucocorticoid modulation of insulin signaling in human subcutaneous adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Nov;92(11):4332-9.
- Geloneze B, Repetto EM, Geloneze SR, Tambascia MA, Ermetice MN. The threshold value for insulin resistance (HOMA-IR) in a admixed population IR in the Brazilian Metabolic Syndrome Study. *Diabetes Res Clin Pract.* 2006 May;72(2):219-20.
- Geloneze B, Tambascia MA. Laboratorial evaluation and diagnosis of insulin resistance. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006 Apr;50(2):208-15.
- Geloneze B, Vasques AC, Stabe CF, Pareja JC, Rosado LE, Queiroz EC, Tambascia MA; BRAMS Investigators. HOMA1-IR and HOMA2-IR indexes in identifying insulin resistance and metabolic syndrome: Brazilian Metabolic Syndrome Study (BRAMS). *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009 Mar;53(2):281-7.
- Georgakopoulos A, Tsawdaroglou N. Insulin potentiates the transactivation potency of the glucocorticoid receptor. *FEBS Lett.* 1996 Mar; 381:177-182.
- Gesina E, Blondeau B, Milet A, Le Nin I, Duchene B, Czernichow P, et al. Glucocorticoid signaling affects pancreatic development through both direct and indirect effects. *Diabetologia.* 2006 Dec;49(12):2939-47.

- Goedecke JH, Wake DJ, Levitt NS, Lambert EV, Collins MR, Morton NM, et al. Glucocorticoid metabolism within superficial subcutaneous rather than visceral adipose tissue is associated with features of the metabolic syndrome in South African women. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006 Jul;64(1):81-7.
- Gorter PM, Olijhoek JK, van der Graaf Y, Algra A, Rabelink TJ, Visseren FL; SMART Study Group. Prevalence of the metabolic syndrome in patients with coronary heart disease, cerebrovascular disease, peripheral arterial disease or abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis*. 2004 Apr;173(2):363-9.
- Grasa MM, Cabot C, Balada F, Virgili J, Sanchis D, Monserrat C, et al. Corticosterone binding to tissues of adrenalectomized lean and obese Zucker rats. *Horm Metab Res*. 1998 Dec;30(12):699-704.
- Grasa MM, Cabot C, Fernández-López JÁ, Remesar X, Alemany M. Modulation of corticosterone availability to white adipose tissue of lean and obese Zucker rats by corticosteroid-binding globulin. *Horm Metab Res*. 2001 Jul;33(7):407-11.
- Gross KL, Lu NZ, Cidlowski JA. Molecular mechanisms regulating glucocorticoid sensitivity and resistance. *Mol Cell Endocrinol*. 2009 Mar;300(1-2):7-16.
- Gu H, Tang C, Peng K, Sun H, Yang Y. Effects of chronic mild stress on the development of atherosclerosis and expression of toll-like receptor 4 signaling pathway in adolescent apolipoprotein E knockout mice. *J Biomed Biotechnol*. 2009;61:3879.
- Hall MN. mTOR-what does it do? *Transplant Proc*. 2008 Dec;40(10 Suppl):S5-8.
- Hauner H, Schmid P, Pfeiffer EF. Glucocorticoids and insulin promote the differentiation of human adipocyte precursor cells into fat cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987 Apr;64(4):832-5.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, William PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996 Oct;6(10):986-94.
- Henry RR, Phillips SA, Mudaliar SR, Ciaraldi TP. The adipocyte and adipose tissue as endocrine organs: Impact on the insulin resistance phenotype. In: *New Transcription Factors and their Role in Diabetes and its Therapy*. Advances in molecular and cellular endocrinology. 2006;5:115-41.
- Hernsdorff HH, Monteiro JB. Visceral, subcutaneous or intramuscular fat: where is the problem? *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2004 Dec;48(6):803-11.
- Hindmarsh PC, Brook CG. Single dose dexamethasone suppression in test in children: dose relationship to body size. *Clin Endocrinol*. 1985 Jul;23(1):67-70.
- Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 2002 Nov 21;420(6913):333-6.
- Homo-Delarche F. Glucocorticoid receptors and steroid sensitivity in normal and neoplastic human lymphoid tissues: a review. *Cancer Res*. 1984 Feb;44(2):431-7.

Hurley DM, Accili D, Stratakis CA, Karl M, Vamvakopoulos N, Rorer E, et al. Point mutation causing a single amino acid substitution in the hormone binding domain of the glucocorticoid receptor in familial glucocorticoid resistance. *J Clin Invest.* 1991 Feb;87(2):680-6.

Iacobellis G, Corradi D, Sharma AM. Epicardial adipose tissue: anatomic, biomolecular and clinical relationships with the heart. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2005 Oct;2(10):536-43.

Iacobellis G, Ribaldo MC, Assael F, Vecci E, Tiberti C, Zappaterreno A, et al. Echocardiographic epicardial adipose tissue is related to anthropometric and clinical parameters of metabolic syndrome: a new indicator of cardiovascular risk. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Nov;88(11):5163-8.

Iglesias MJ, Eiras S, Piñeiro R, López-Otero D, Gallego R, Fernández AL, et al. Gender differences in adiponectin and leptin expression in epicardial and subcutaneous adipose tissue. Findings in patients undergoing cardiac surgery. *Rev Esp Cardiol.* 2006 Dec;59(12):1252-60.

Jessop DS, Dallman MF, Fleming D, Lightman SL. Resistance to glucocorticoid feedback in obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Sep;86(9):4109-14.

Joyner JM, Hutley LJ, Bachmann AW, Torpy DJ, Prins JB. Greater replication and differentiation of preadipocytes in inherited corticosteroid-binding globulin deficiency. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003 May;284(5):E1049-54.

Kershaw EE, Flier JS. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jun;89(6):2548-56.

Kershaw EE, Morton NM, Dhillon H, Ramage L, Seckl JR, Flier JS. Adipocyte-specific glucocorticoid inactivation protects against diet-induced obesity. *Diabetes.* 2005 Apr;54(4):1023-31.

Korbonits M, Trainer PJ, Little JA, Edwards R, Kopelman PG, Besser GM, et al. Leptin levels do not change acutely with food administration in normal or obese subjects, but are negatively correlated with pituitary-adrenal activity. *Clin Endocrinol.* 1997 Jun;46(6):751-7.

Krett NL, Pillay S, Moalli PA, Greipp PR, Rosen ST. A variant glucocorticoid receptor messenger RNA is expressed in multiple myeloma patients. *Cancer Res.* 1995 Jul;55(13):2727-9.

Lacoumenta S, Yeo TH, Paterson JL, Burrin JM, Hall GM. Hormonal and metabolic responses to cardiac surgery with sufentanil-oxygen anaesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1987 Apr;31(3):258-63.

Lapidus L, Lindstedt G, Lundberg PA, Bengtsson C, Gredmark T. Concentrations of sex-hormone binding globulin and corticosteroid binding globulin in serum in relation to cardiovascular risk factors and to 12-year incidence of cardiovascular disease and overall mortality in postmenopausal women. *Clin Chem.* 1986 Jan;32(1 Pt 1):146-52.

Lee LG, Connell CR, Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 1993 Aug; 21(16):3761-6.

Leibowitz G, Cerasi E, Ketzinel-Gilad M. The role of mTOR in the adaptation and failure of β -cells in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2008 Nov;10 (Suppl 4):157-69.

Levy JC, Matthews DR, Hermans MP. Correct homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program. *Diabetes Care.* 1998 Dec;21(12):2191-2.

Li L, Thompson LH, Zhao L, Messina JL. Tissue-specific difference in the molecular mechanisms for the development of acute insulin resistance after injury. *Endocrinology.* 2009 Jan;150(1):24-32.

Lingohr MK, Dickson LM, Wrede CE, McCuaig JF, Myers MGJ, Rhodes CJ. IRS-3 inhibits IRS-2 mediated signaling in pancreatic beta-cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2003;30:85-99.

Liu Y, Nakagawa Y, Wang Y, Sakurai R, Tripathi PV, Lutfy K, et al. Increased glucocorticoid receptor and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in hepatocytes may contribute to the phenotype of type 2 diabetes in db/db mice. *Diabetes.* 2005 Jan;54(1):32040.

Longui CA, Giusti MM, Calliari LE, Katiki T, Kochi C, Monte O. Partial glucocorticoid resistance in obese children detected by very low dose dexamethasone suppression test. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2003 Dec;16(9):1277-82.

Longui CA, Santos MC, Formiga CB, Oliveira DV, Rocha MN, Faria CD, et al. Antiproliferative and apoptotic potencies of glucocorticoids: nonconcordance with their antiinflammatory and immunosuppressive properties. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2005 Jun;49(3):378-83.

Longui CA, Vottero A, Adamson PC, Cole DE, Kino T, Monte O, et al. Low glucocorticoid receptor alpha/beta ratio in T-cell lymphoblastic leukemia. *Horm Metab Res.* 2000 Oct;32(10):401-6.

Löwenberg M, Tuynman J, Scheffer M, Verhaar A, Vermeulen L, van Deventer S, et al. Kinome analysis reveals nongenomic glucocorticoid receptor-dependent inhibition of insulin signaling. *Endocrinology.* 2006 Jul;147(7):3555-62.

Lu NZ, Cidlowski JA. Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Mol Cell.* 2005 Apr;18(3):331-42.

Lundgren M, Burén J, Ruge T, Myrnäs T, Eriksson JW. Glucocorticoids down-regulate glucose uptake capacity and insulin-signaling proteins in omental but not subcutaneous human adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jun;89(6):2989-97.

MacLaren R, Cui W, Simard S, Cianflone K. Influence of obesity and insulin sensitivity on insulin signaling genes in human omental and subcutaneous adipose tissue. *J Lipid Res.* 2008 Feb;49(2):308-23.

- Maganti M, Rao V, Cusimano RJ. Sex differences in resource use after on-pump coronary artery bypass surgery: a propensity score-matched cohort. *Can J Cardiol*. 2009 May;25(5):e151-6.
- Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR, et al. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science*. 2001 Dec;294(5549): 2166-70.
- Mazurek T, Zhang L, Zalewski A, Mannion JD, Diehl JT, Arafat H, et al. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation*. 2003 Nov;108(20):2460-6.
- Meikle AW. Dexamethasone suppression tests: usefulness of simultaneous measurement of plasma cortisol and desamethasone. *Clin Endocrinol*. 1982 Apr;16(4):401-8.
- Melo MR. Avaliação quantitativa da expressão da isoforma alfa do receptor de glicocorticóides por PCR em tempo real. Tese (Doutorado). São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2004.
- Melo MR, Faria CD, Melo KC, Rebouças NA, Longui CA. Real-time PCR quantitation of glucocorticoid receptor alpha isoform. *BMC Mol Biol*. 2004 Oct;5(1):19.
- Mendel DB, Ortí E. Isoform composition and stoichiometry of the approximately 90-kDa heat shock protein associated with glucocorticoid receptors. *J Biol Chem*. 1988 May;263(14):6695-702.
- Mericq V, Medina P, Bouwman C, Johnson MC, Godoy J, López T, et al. Expression and activity of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 enzyme in subcutaneous and visceral adipose tissue of prepubertal children. *Horm Res*. 2009;71(2):89-93.
- Miller AH, Spencer RL, Stein M, McEwen BS. Adrenal steroid receptor binding in spleen and thymus after stress or dexamethasone. *Am J Physiol*. 1990 Sep;259(3):E405-12.
- Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. DATASUS [on line]. Sistema de informação sobre mortalidade; 2005. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>.
- Monzon JR, Basile R, Heneghan S, Udipi V, Green A. Lipolysis in adipocytes isolated from deep and superficial subcutaneous adipose tissue. *Obes Res*. 2002 Apr;10(4):266-9.
- Morton NM, Seckl JR. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and obesity. *Front Horm Res*. 2008;36:146-64.
- Oakley RH, Cidlowski JA. Homologous down regulation of the glucocorticoid receptor: the molecular machinery. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 1993;3(2):63-88.
- Okret S, Poellinger L, Dong Y, Gustafsson JA. Down-regulation of glucocorticoid receptor mRNA by glucocorticoid hormones and recognition by the receptor of a specific binding sequence within a receptor cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986 Aug;83(16):5899-903.

- Paterson JM, Morton NM, Fievet C, Kenyon CJ, Holmes MC, Staels B, et al. Metabolic syndrome without obesity: Hepatic overexpression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 May;101(18):7088-93.
- Phillips LK, Prins JB. The link between abdominal obesity and the metabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep*. 2008 Apr;10(2):156-64.
- Picard D, Yamamoto KR. Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J*. 1987 Nov;6(11):3333-40.
- Prasad SB, Fahrtash F, Malaiapan Y, Meredith IT, Cameron J. Obesity and the metabolic syndrome in patients with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2009 Apr.
- Rask E, Walker BR, Söderberg S, Livingstone DE, Eliasson M, Johnson O, et al. Tissue-specific changes in peripheral cortisol metabolism in obese women: increased adipose 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jul;87(7):3330-6.
- Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988 Dec;37(12):1595-607.
- Reaven GM. Insulin resistance: the link between obesity and cardiovascular disease. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008 Sep;37(3):581-601.
- Rebuffé-Scrive M, Brönnegård M, Nilsson A, Eldh J, Gustafsson JA, Björntorp P. Steroid hormone receptors in human adipose tissues. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990 Nov;71(5):1215-9.
- Reynolds RM, Chapman KE, Seckl JR, Walker BR, McKeique PM, Lithell HO 2002 Skeletal muscle glucocorticoid receptor density and insulin resistance. *JAMA* 287:2505-2506.
- Ribeiro Filho FF, Mariosa LS, Ferreira SRG, Zanella MT. Gordura visceral e síndrome metabólica: mais que uma simples associação. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006 Abr;50(2):230-8.
- Rosenbaum P, Ferreira SRG. Uma atualização em risco cardiovascular da síndrome metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2003 Jun;47(3):220-227.
- Rosito GA, Massaro JM, Hoffmann U, Rubert FL, Mahabadi AA, Vasan RS, et al. Pericardial fat, visceral abdominal fat, cardiovascular disease risk factors, and vascular calcification in a community-based sample: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2008 Feb;117(5):605-13.
- Rosmond R, Radulovic V, Holm G. A brief update of glucocorticoid receptor variants and obesity risk. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Nov;1083:153-64.
- Sacks HS, Fain JN. Human epicardial adipose tissue: a review. *Am Heart J*. 2007 Jun;153(6):907-17.

Roth-Isigkeit A, Dibbelt L, Schmucker P, Seyfarth M. The immune-endocrine interaction varies with the duration of the inflammatory process in cardiac surgery patients. *J Neuroendocrinol.* 2000 Jun;12(6):546-52.

Schimmer BP, Parker KL. Hormônios adrenocorticotróficos; esteroides adrenocorticais e seus análogos sintéticos; inibidores da síntese das ações dos hormônios adrenocorticais. In: Goodman LS, Gilman A. *As bases farmacológicas da terapêutica.* Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1996.p.1082-102.

Shahidi H, Vottero A, Stratakis CA, Taymans SE, Karl M, Longui CA, et al. Imbalanced expression of the glucocorticoid receptor isoforms in cultured lymphocytes from a patient with systemic glucocorticoid resistance and chronic lymphocytic leukemia. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Jan;254(3):559-65.

Song SW, Yi G, Lee S, Youn YN, Sul SY, Yoo KJ. Perioperative indicators of stress response and postoperative inflammatory complications in patients undergoing off-pump coronary artery bypass surgery: a prospective observational study. *Circ J.* 2008 Dec;72(12):1966-74.

Steinberger J, Daniels SR, Eckel RH, Hayman L, Lustig RH, McCrindle B, et al. Progress and challenges in metabolic syndrome in children and adolescents: a scientific statement from the American Heart Association Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation.* 2009 Feb;119(4):628-47.

Stewart PM. Tissue-specific Cushing's syndrome uncovers a new target in treating the metabolic syndrome – 11 beta-hydroxysteroid dhydrogenase type 1. *Clin Med.* 2005 Mar-Apr;5(2):142-6.

Svec F, Rudis M. Glucocorticoids regulate the glucocorticoid receptor in the AtT-20 cell. *J Biol Chem.* 1981 Jun;256(12):5984-7.

The Oxford Centre for Diabetes. Endocrinology & Metabolism. Diabetes Trial Unit. HOMA Calculator. Available from: <http://www.dtu.ox.ac.uk/>.

Tsai SY, Carlstedt-Duke J, Weigel NL, Dahlman K, Gustafsson JA, Tsai MJ, et al. Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation. *Cell.* 1988 Oct;55(2):361-9.

van den Hooven C, Ploemacher J, Godwin M. Metabolic syndrome in a family practice population: prevalence and clinical characteristics. *Can Fam Physician.* 2006 Aug;52:982-3.

van Rossum EF, Lamberts SW. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. *Recent Prog Horm Res.* 2004;59:333-57.

Vegiopoulos A, Herzig S. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Mol Cell Endocrinol.* 2007 Sep;275(1-2):43-61.

Vogeser M, Groetzner J, Küpper C, Briegel J. The serum cortisol:cortisone ratio in the postoperative acute-phase response. *Horm Res.* 2003;59(6):293-6.

Wajchenberg BL, Nery M, Cunha MR, Silva ME. Adipose tissue at the crossroads in the development of the metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009 Mar;53(2):145-50.

Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev.* 2000 Dec;21(6):697-738.

Wake DJ, Rask E, Livingstone DE, Söderberg S, Olsson T, Walker BR. Local and systemic impact of transcriptional up-regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Aug;88(8):3983-8.

Walker BR, Connacher AA, Lindsay RM, Webb DJ, Edwards CR. Carbenoxolone increases hepatic insulin sensitivity in man: a novel role for 11-oxosteroid reductase in enhancing glucocorticoid receptor activation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995 Nov;80(11):3155-9.

Wallace AD, Cidlowski JA. Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J Biol Chem.* 2001 Nov;276(46):42714-21.

Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care.* 2004 Jun;27(6):1487-95.

Wang CN, McLeod RS, Yao Z, Brindley DN. Effects of dexamethasone on the synthesis, degradation, and secretion of apolipoprotein B in cultured rat hepatocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995 Sep;15(9):1481-91.

Wang M. The role of glucocorticoid action in the pathophysiology of the Metabolic Syndrome. *Nutr Metab (Lond).* 2005 Feb;2(1):3.

Wang Z, Frederick J, Grabedian MF. Deciphering the phosphorylation "code" of the glucocorticoid receptor in vivo. *J Biol Chem.* 2002 Jul;277(29): 26573-80.

Wassink AM, van der Graaf Y, Olijhoek JK, Visseren FL; SMART Study Group. Metabolic syndrome and the risk of new vascular events and all-cause mortality in patients with coronary artery disease, cerebrovascular disease, peripheral arterial disease or abdominal aortic aneurysm. *Eur Heart J.* 2008 Jan;29(2):213-23.

Webster JC, Jewell CM, Bodwell JE, Munck A, Sar M, Cidlowski JA. Mouse glucocorticoid receptor phosphorylation status influences multiple functions of the receptor protein. *J Biol Chem.* 1997 Apr;272(14):9287-93.

Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress and diabetes. *J Clin Invest.* 2005;115:1111-9.

Whorwood CB, Donovan SJ, Flanagan D, Phillips DI, Byrne CD. Increased glucocorticoid receptor expression in human skeletal muscle cells may contribute to the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Diabetes.* 2002 Apr;51(4):1066-75.

Whorwood CB, Donovan SJ, Wood PJ, Phillips DI. Regulation of glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms and type I 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in human skeletal muscle cells: a key role in the pathogenesis of insulin resistance? *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 May;86(5):2296-308.

Wilcox G. Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev.* 2005 May;26(2):19-39.

Yudt MR, Cidlowski JA. Molecular identification and characterization of a and b forms of the glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol.* 2001 Jul;15(7):1093-103.

Yudt MR, Cidlowski JA. The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene. *Mol Endocrinol.* 2002 Aug;16(8):1719-26.

RESUMO: Influência da resistência insulínica na quantidade de RNA mensageiro do receptor glicocorticóide (GR α) em tecido adiposo, músculo e linfócitos./ Roberta Borges de Castro. São Paulo, 2010. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.

INTRODUÇÃO: A resistência insulínica está implicada na origem das alterações metabólicas responsáveis por um grupo de doenças cardiovasculares. Como um dos fatores determinantes de resistência insulínica destacam-se os glicocorticóides. **OBJETIVO:** Quantificar o RNA mensageiro (RNAm) do GR α nos diferentes tecidos de indivíduos com doença cardiovascular já estabelecida e correlacionar a quantidade de RNAm do GR α à sensibilidade hipotálamo-hipofisária ao glicocorticóide. **CASUÍSTICA E MÉTODOS:** Avaliou-se 26 homens e 9 mulheres (n=35) submetidos à cirurgia cardíaca. Amostras de tecidos adiposo subcutâneo e adiposo visceral epicárdico, músculo e células mononucleares de sangue periférico foram obtidas para quantificação de RNAm do GR α por PCR em tempo real. Sessenta dias após a cirurgia, dezessete pacientes foram submetidos ao teste de supressão com dexametasona intravenosa (20 $\mu\text{g}/\text{m}^2$) e coleta de sangue periférico para avaliação molecular. A resistência insulínica foi definida em pacientes que apresentavam HOMA IR maior que 2,71. **RESULTADOS:** A idade variou entre 36 e 75 anos [média (DP) = 54,4 (11,1)]. O diagnóstico de resistência insulínica foi estabelecido em 13/35 dos pacientes. O músculo apresentou maior quantidade de RNAm GR α [média (DP)= 43,6 (38,3), mediana (p25-p75)= 39,4 (17,2-52,9)] do que o tecido adiposo visceral epicárdico [média (DP)= 34,2 (37,8), mediana (p25-p75)= 27,6 (11,8-44,9); p= 0,04], que o adiposo subcutâneo [média (DP)= 29,0 (38,1), mediana (p25-p75)= 19,0 (8,5-27,7); p< 0,001] e que os linfócitos [média (DP)= 17,5 (11,2), mediana (p25-p75)= 14,02 (7,6-25,0); p< 0,001]. Quando comparados aos pacientes sem resistência insulínica, os pacientes diabéticos apresentaram menor quantidade de RNAm do GR α em tecido adiposo visceral epicárdico, [média (DP)= 12,4 (10,7) , mediana (p25-p75)= 12,0 (5,1-16,5)] *versus* [média (DP)= 42,8 (44,0), mediana (p25-p75)= 30,9 (16,6-48,2)]. O HOMA IR foi inversamente proporcional ao percentual de supressão do cortisol após dexametasona (r = -0,575; p= 0,03). Não houve correlação do percentual de supressão do cortisol após dexametasona com o RNAm do GR α em linfócitos (r = 0,347; p= 0,22). **CONCLUSÃO:** A quantidade de RNAm do GR α foi diferente entre os diversos tecidos. No tecido adiposo visceral epicárdico houve uma diminuição da quantidade de RNAm do GR α inversamente relacionada ao aumento da resistência insulínica. Observou-se ainda que, quanto maior a resistência insulínica menor a supressão do cortisol pós-dexametasona, sugerindo que a resistência insulínica esteja relacionada à resistência hipofisária ao glicocorticóide.

ABSTRACT

CONTEXT: Insulin resistance is an underlying cause of metabolic changes present in a group of cardiovascular diseases. Glucocorticoid is a known determinant factor of insulin resistance.

AIM: To quantify glucocorticoid receptor alpha (GR α) mRNA in different tissues of subjects with previously established cardiovascular disease, and to correlate the amount of peripheral tissue GR α mRNA with the hypothalamic-pituitary sensitivity to dexamethasone.

METHODS: Thirty five patients (26 men and 9 women) underwent cardiac surgery. Samples from subcutaneous adipose tissue, epicardial adipose tissue (visceral tissue), muscle and peripheral blood mononuclear cells were obtained for quantitation of GR α mRNA by real time PCR. After 60 days of surgery, seventeen patients underwent the suppression test with intravenous dexamethasone (20 $\mu\text{g}/\text{m}^2$) during which peripheral blood sample for molecular analysis of lymphocytes was collected. It was established that patients with HOMA IR index greater than 2.71 were insulin resistant.

RESULTS: age ranged from 36 to 75 years, mean (SD) = 54.4 (11.1) years. A higher level of GR α mRNA was observed in muscle with mean(SD)= 43.6 (38.3), median (p25-p75)= 39.4 (17.2-52.9), compared to epicardial adipose tissue with mean (SD)= 34.2 (37.8), median (p25-p75)= 27.6 (11.8-44.9), (p= 0.04), subcutaneous adipose tissue with mean (SD)= 29.0 (38.1), median (p25-p75)= 19.0 (8.5-27.7), (p< 0.001) and lymphocytes with mean (SD)= 17.5 (11.2), median (p25-p75)= 14.02 (7.6-25.0), (p< 0.001). Compared to patients without insulin resistance, patients with diabetes mellitus showed significantly lower GR α mRNA in epicardial adipose tissue, [mean (SD)= 12.4 (10.7) , median (p25-p75)= 12.0 (5.1-16.5)] versus [mean (SD)= 42.8 (44.0), median (p25-p75)= 30.9 (16.6-48.2)]. There was no correlation between the percentage of cortisol reduction after dexamethasone and the GR α mRNA from lymphocytes (r= 0.347; p= 0.22).

CONCLUSION: GR α mRNA levels differed among tissues involved in the pathophysiology of metabolic syndrome. Epicardial adipose tissue showed lower GR α mRNA levels in insulin resistant patients, which seems to represent an adaptive and protective mechanism. It was also observed inverse correlation between insulin resistance and cortisol reduction after dexamethasone, suggesting that insulin resistance is directly related to the glucocorticoid resistance at the hypothalamic-pituitary level.

APÊNDICE 1: Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.



IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE S PAULO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS
 Rua Santa Isabel, 305 4º Santa Cecília CEP 01221-010 São Paulo –SP
 PABX: 21767000 Ramal: 8061-Telefax-33370188 E-mail: eticamed@santacasasp.org.br

São Paulo, 22 de fevereiro de 2008.

Projeto nº180/04
 Informe este número para
 identificar seu projeto no CEP

Ilmo.(a).Sr.(a).

Dr.(a). Roberta Borges de Castro

Departamento de Pediatria

O Comitê de Ética e Pesquisa da ISCMSP, em reunião ordinária, dia **14/07/2004** e no cumprimento de suas atribuições, após revisão do seu projeto de pesquisa: **"Avaliação tecido específica da expressão das isoformas alfa e beta do receptor glicocorticóide e de sua correlação com a sensibilidade aos glicocorticóides em pacientes com síndrome metabólica "**, emitiu parecer enquadrando-o na seguinte categoria:

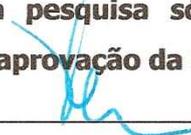
Aprovado (inclusive TCLE) ;

Com pendências há modificações ou informações relevantes a serem atendida em 60 dias, (enviar as alterações em duas cópias);

Retirado, (por não ser reapresentado no prazo determinado);

Não aprovado: e

Aprovado (inclusive os TCLE- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido), e encaminhado para apreciação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – MS -CONEP, a qual deverá emitir parecer no prazo de 60 dias. **Informamos, outrossim, que, segundo os termos da Resolução 196/96 do Ministério da Saúde a pesquisa só poderá ser iniciada após o recebimento do parecer de aprovação da CONEP.**



Prof. Dr. Nelson Keiske Ono

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

ISCMSP

APÊNDICE 2: Comprovação de submissão do artigo.

Dear Dr. CASTRO,

You have successfully submitted your manuscript via the Rapid Review system. Your Manuscript Number is: 09-2780 Version 1.

Take note of this number for future reference. You can log on to the Rapid Review system at any time to see the current status of your manuscript(s). The web address is <http://www.rapidreview.com/tes/CALogon.jsp> and your username is robertabc. If you wish to contact the journal office, here's how:

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism
JCEM Editorial Office
Paul W. Ladenson, MD
Editor-in-Chief
8401 Connecticut Avenue, Suite 900
Chevy Chase, MD 20815 USA
Phone: 301-951-2615
Fax: 301-951-2617

Thank you for your submission.
Managing Editor
The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism

My Manuscripts

[Instructions for Submitting](#)
[More About File Formats](#)
[More About MS Status](#)
[Copyright Form](#)

Sort by MS Number
Sorted by **MS Number**

[Tissue Specific Adaptive Levels of Glucocorticoid Receptor Alpha mRNA and its Relationship with Insulin Resistance.](#) 

MS # 09-2780 -Version 1

MS Type: Original Studies

Section:

Journal Name: The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism

MS Submitted Date: 12/24/2009

Companion MS Number:

MS Status: MS in Review

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)