



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

HILDA MICHELLY PAIVA DOS SANTOS

**EFEITO DA CORTICOTERAPIA E ESTRÓGENO SOBRE TECIDO ÓSSEO,
RENAL E HEPÁTICO EM RATAS ALBINAS**

RECIFE

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

HILDA MICHELLY PAIVA DOS SANTOS

**“EFEITO DA CORTICOTERAPIA E ESTRÓGENO SOBRE TECIDO ÓSSEO,
RENAL E HEPÁTICO EM RATAS ALBINAS”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal. Área de Morfofisiologia.

Orientadora:

Prof^a. Dra. Valéria Wanderley Teixeira

Co-orientador:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

RECIFE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S237e Santos, Hilda Michelly Paiva dos.

Efeito da corticoterapia e estrógeno sobre tecido ósseo, renal e Hepático em ratas albinas / Hilda Michelly Paiva dos Santos. – Recife, 2018.

126 f. : il.

Orientador(a): Valéria Wanderley Teixeira.

Coorientador(a): Álvaro Aguiar Coelho Teixeira.

Tese (Doutorado em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2018.

Referencias.

1. Corticoterapia 2. Estrógeno 3. Fígado 4. Rim 5. Fêmur
6. Bioquímica 7. Imunohistoquímica 8. Morfometria
9. Histopatologia 10. Ratas I. Teixeira, Valéria Wanderley,
Orient. II. Teixeira, Álvaro Aguiar Coelho, coorient. III. Título

CDD 636.089

HILDA MICHELLY PAIVA DOS SANTOS

**“EFEITO DA CORTICOTERAPIA E REPOSIÇÃO DE ESTRÓGENO SOBRE
TECIDO ÓSSEO, RENAL E HEPÁTICO EM RATAS ALBINAS”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal. Área de Morfofisiologia.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira - (Orientadora)

Prof^o. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira - UFRPE

Prof^o. Dr. Anísio Francisco Soares – UFRPE

Prof^a. Dr^a. Ismaela Maria Ferreira de Melo – UNIBRA

Prof^o. Dr. Francisco de Assis Leite Souza - UFRPE

DEDICATÓRIA:

Ao amor incondicional da minha família.

“...em seu coração o homem planeja o seu caminho, mas é o Senhor quem dirige seus passos....”

(Provérbios 13,9)

AGRADECIMENTOS

Uma das partes mais difíceis dessa tese é sem dúvidas os agradecimentos. Como expressar em palavras toda gratidão pelas pessoas que me ajudaram durante esses quatro anos de estudos?

Acredito que a elaboração de uma tese seja um produto coletivo, embora sua redação, responsabilidade e estresse seja predominantemente individual. Gostaria de dedicar algumas palavras àqueles que fizeram parte direta ou indiretamente deste trabalho ou ainda por simplesmente existirem...

Minha eterna gratidão a Deus, por me permitir chegar até aqui, pela sua presença constante em minha vida. Toda honra e glória a ti senhor!

Aos meus queridos orientadores Valéria Wanderley Teixeira e Álvaro Aguiar Coelho Teixeira, minha eterna admiração pela orientação, confiança, disponibilidade, atenção, cuidado e oportunidades de crescimento profissional. Sem dúvida são pessoas maravilhosas que a faculdade me permitiu conhecer, e um estímulo para ver na universidade um caminho para a vida...

Aos meus amados pais, Jorge Inácio e Sandra Maria, por serem meu alicerce, meus exemplos de vida e estímulo constante. Se hoje subo mais um degrau na grande escada que é a vida, só consegui porque sei que tenho vocês para me apoiarem sempre. Obrigada!!!

Ao meu esposo, Antonio Barbalho, por todo companheirismo, paciência, carinho e atenção durante essa tese. Agradeço pelas palavras de incentivo, pelo constante apoio e principalmente pela sua presença em minha vida! Amo-te.

À minha família pela compreensão nos momentos de ausência física, amor e carinho constante. Essa vitória também é de vocês. Em especial ao meu irmão William Inácio. Ao meu segundo pai, Silvio José, que embora não esteja mais entre nós, tenho certeza que está vibrando com mais essa minha conquista. Eternas saudades!!!!

Ao Prof. Francisco de Assis Leite Souza, pela contribuição nessa pesquisa, pelos ensinamentos e demonstração de profissionalismo com a causa científica.

Ao Prof. Frederico Celso, pelo seu apoio e auxílio no amadurecimento dos meus conhecimentos e conceitos que me levaram a execução e conclusão desta tese.

Aos integrantes do Laboratório de Histologia, os quais contribuíram significativamente para esse trabalho, pois, ninguém é tão bom sozinho, quanto em equipe. Agradeço a Clóvis, Marina, Yuri, Rebeca, Érique, Anthony, Ilka, Hilton, Nane, Kamilla, Thiago e Cris. Vocês são show!

Em especial as minhas verdadeiras irmãs: Ismaela Melo, Carolline Guimarães, Cíntia Giselle, Aline Mariano, Welma Emídio, Bárbara Brooklyn e Solange Bezerra, agradeço por tornar a caminhada mais amena e alegre. Vocês me ensinaram o verdadeiro significado da palavra amizade. Estamos juntas para o que der e vier! Amo muito vocês!

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Área de Histologia, por ter cedido às instalações e os animais para elaboração deste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

Aos bioteristas André e Renata pela atenção e cuidado com os animais do experimento.

Às cobaias que cederam involuntariamente suas vidas para que inúmeras outras sejam salvas. A vocês, todo o meu respeito.

Nada na vida conquistamos sozinhos. Sempre precisamos de outras pessoas para alcançar nossos sonhos e objetivos. Muitas vezes, um simples gesto pode mudar nossa vida e contribuir para nosso sucesso.... Muito Obrigada!!!

RESUMO

A corticoterapia vem sendo cada vez mais utilizada como alternativa terapêutica no tratamento de diversas patologias, devido ao potente efeito anti-inflamatório e imunossupressor dos corticoides. No entanto, seu uso vem divergindo opiniões devido aos efeitos colaterais indesejáveis ao tratamento. Assim, este trabalho avaliou os efeitos da administração de estrógeno associado à corticoterapia analisando o tecido hepático, renal e ósseo, a fim de identificar uma estratégia de tratamento com menor efeito colateral. Para isso, foram utilizadas 35 ratas albinas, com 90 dias de idade, divididas nos seguintes grupos: I – ratas que receberam placebo; II - ratas submetidas à corticoterapia por 45 dias; III - ratas submetidas à corticoterapia por 45 dias e tratadas simultaneamente com Alendronato de Sódio 0,2 mg/Kg por via intragástrica; IV - ratas submetidas à corticoterapia por 45 dias e tratadas simultaneamente com estrógeno 50mg/Kg por via subcutânea; V - ratas submetidas à corticoterapia por 45 dias adicionado estrógeno nos últimos 15 dias. A corticoterapia foi induzida por meio de injeções de 2mg/mL de Decadron[®], por via intramuscular. Alterações histopatológicas só foram visualizadas no fígado das ratas submetidas à corticoterapia por 45 dias, caracterizadas pela presença de nódulos multifocais no parênquima hepático, vacuolização celular difusa e congestão de sinusoides. O rim mostrou-se sem alterações histopatológicas, porém apresentou diminuição da área glomerular, área da cápsula de Bowman, volume glomerular e volume da cápsula de Bowman pela análise morfométrica. No fêmur houve perda da microarquitetura óssea, notada pela diminuição da conectividade entre as trabéculas. Na análise histoquímica revelou marcação

cálcio positiva próximos ao disco epifisário em todas as ratas dos grupos experimentais. Ao final do tratamento (45º dia) os parâmetros bioquímicos avaliados permanecem aumentados apenas nas ratas do grupo II com exceção do HDL que permaneceu reduzido durante todo o período experimental. As marcações para IL-6 e TNF- α foram mais intensas nas ratas do grupo II no fígado e rins, não diferindo no fêmur. O índice apoptótico não apresentou diferenças no fígado e fêmur das ratas dos grupos experimentais. No entanto, o rim das ratas do grupo III mostrou maior marcação para o teste de TUNEL. Com isso conclui-se que o estrógeno atua não apenas de forma protetora contra a ação da corticoterapia, mas também revertendo os danos hepáticos, renais e ósseos apresentados pela análise histopatológica, bioquímica e imunohistoquímica.

Palavras-chaves: corticoterapia, estrógeno, fígado, rim, fêmur, bioquímica, imunohistoquímica, morfometria, histopatologia, ratas.

ABSTRACT

Corticosteroids have been increasingly used as a therapeutic alternative without treatment of several pathologies due to the potent anti-inflammatory and immunosuppressive effects of corticosteroids. However, its use has diverged opinions due to undesirable side effects to treatment. Thus, this study evaluated the effects of estrogen administration associated with corticotherapy by analyzing the hepatic, renal and bone tissue, in order to identify a treatment strategy with less side effect. For this, there were 35 albino rats, with 90 days of age, divided into the following groups: I - rats that received placebo; II - rats submitted to corticosteroid therapy for 45 days; III - rats submitted to corticotherapy for 45 days and treated simultaneously with 0.2 mg / kg Sodium Alendronate intragastric; IV - rats submitted to corticotherapy for 45 days and treated simultaneously with estrogen 50mg / kg subcutaneously; V - rats submitted to corticotherapy for 45 days added estrogen in the last 15 days. A corticosteroid to be induced by means of injections of 2mg / mL of Decadron®, intramuscularly. Histopathological changes were only visualized without liver of rats submitted to corticosteroid therapy for 45 days, characterized by the presence of multifocal nodules without hepatic parenchyma, diffuse cellular vacuolization and sinusoid congestion. The kidney was histopathologically undetermined, but showed a decrease in the glomerular area, Bowman's capsule area, glomerular volume, and Bowman's capsule volume by morphometric analysis. In the lost femur of the microarquitectura bone, noticed by the diminution of the connectivity between like trabéculas. In the histochemical analysis revealed positive calcium marking near the epiphyseal

disc in all as rats of the experimental groups. At the end of treatment (45th day) the permanently upgraded biochemical parameters were continuously increased only in the rats of group II with the exception of HDL that remained reduced throughout the experimental period. The marks for IL-6 and TNF- α were more intense in the rats of group II without liver and kidneys, not differing without femur. The apoptotic index did not show the difference in the liver and femur of the rats of the experimental groups. However, the rat kidney of group III showed higher marking for the TUNEL test. With this, it is concluded that estrogen acts not only in a protective way against the action of corticosteroids, but also reverses the hepatic, renal and bone damages transmitted by the histopathological, biochemical and immunohistochemical analysis.

Key words: corticoterapia, estrogen, liver, kidney, femur, biochemistry, imuhistochemistry, morphometry, histopathology, rats

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I Pág.

Figura 1. Representação esquemática da regulação da secreção de cortisol, com as alças de “feed-back” em nível de hipófise e de hipotálamo..... 26

Figura 2. Mecanismo de Ação dos Glicocorticóides..... 31

CAPÍTULO II Pág.

Figura 1: Fígado das ratas dos grupos experimentais. A – Controle; B- induzidos à corticoterapia sem tratamento; C – induzidos à corticoterapia sem tratamento, observar detalhe dos neutrófilos em processo de degeneração com presença de núcleos hipersegmentados. D – induzidos à corticoterapia + alendronato de sódio simultâneo; E – induzidos à corticoterapia + estrógeno simultâneo; F – induzidos à corticoterapia + estrógeno últimos 15 dias. V – veia centro lobular, tc – tecido conjuntivo, Asterístico – neutrófilos em processo degenerativo, n – necrose, Seta longa – congestão de sinusóides. Coloração H.E..... 73

Figura 2: Rim das ratas dos grupos experimentais. A – controle; B – induzidos à corticoterapia sem tratamento; C – induzidos à corticoterapia + alendronato de sódio simultâneo; D - induzidos à corticoterapia + estrógeno simultâneo; E - induzidos à corticoterapia + estrógeno últimos 15 dias. tcd – túbulo contorcido distal; tcp – túbulo contorcido proximal; cr – corpúsculo renal. Coloração H.E 74

Figura 3: Imunohistoquímica e quantificação do IL-6 no fígado. A: GI – controle; B: GII– induzidos à corticoterapia sem tratamento; C: GIII–

induzidos à corticoterapia + alendronato de sódio simultâneo; D: GIV- induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno simultâneo; E: GV - induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno nos últimos 15 dias; F – Quantificação em pixels da expressão do fator IL- 6. Notar aumento significativo dos pixels no grupo GII em relação aos outros. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). 79

Figura 4: Imunohistoquímica e quantificação do IL-6 no rim. A: GI – controle; B: GII– induzidos à corticoterapia sem tratamento; C: GIII– induzidos à corticoterapia + alendronato de sódio simultâneo; D: GIV- induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno simultâneo; E: GV - induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno nos últimos 15 dias; F – Quantificação em pixels da expressão do fator IL- 6. Notar aumento significativo dos pixels no grupo GII em relação aos outros. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). 80

Figura 5: Imunohistoquímica e quantificação do TNF- α no fígado. A: GI – controle; B: GII– induzidos à corticoterapia sem tratamento; C: GIII– induzidos à corticoterapia + alendronato de sódio simultâneo; D: GIV- induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno simultâneo; E: GV - induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno nos últimos 15 dias; F – Quantificação em pixels da expressão do fator TNF α . Notar aumento significativo dos pixels nos grupos GII em relação aos outros. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). 81

Figura 6: Imunohistoquímica e quantificação do TNF- α no rim. A: GI – controle; B: GII– induzidos à corticoterapia sem tratamento; C: GIII– induzidos à corticoterapia + alendronato de sódio simultâneo; D: GIV-

induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno simultâneo; E: GV - induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno nos últimos 15 dias; F – Quantificação em pixels da expressão do fator TNF α . Notar aumento significativo dos pixels nos grupos GII em relação aos outros. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). 82

Figura 7: Índice apoptótico no fígado. A: GI – controle; B: GII– induzidos à corticoterapia sem tratamento; C: GIII– induzidos à corticoterapia + alendronato de sódio simultâneo; D: GIV- induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno simultâneo; E: GV - induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno nos últimos 15 dias; F – Quantificação dos núcleos em apoptose. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$)..... 83

Figura 8: Índice apoptótico no rim. A: GI – controle; B: GII– induzidos à corticoterapia sem tratamento; C: GIII– induzidos à corticoterapia + alendronato de sódio simultâneo; D: GIV- induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno simultâneo; E: GV - induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno nos últimos 15 dias; F – Quantificação dos núcleos em apoptose. Notar aumento significativo dos núcleos em apoptose no grupo GIII em relação aos outros. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$)..... 84

CAPÍTULO III

Pág.

Figura 1: Fêmures dos animais dos grupos I, II e III. A, B – Grupo Controle (I). A – Observar arquitetura óssea preservada. B – Observar presença de

osteoblastos (seta amarela) e osteócitos ativos (círculo). C e D – Grupo induzidos à corticoterapia sem tratamento. C - Observar perda de microarquitetura óssea. D – Notar áreas com matriz alterada, desmostrando o processo de osteólise osteocítica (ma). E e F – induzidos à corticoterapia + Alendronato de Sódio simultâneo (Controle Positivo). E - Observar arquitetura óssea preservada. F – Observar trabécula com presença de osteoblastos (seta amarela), osteócitos ativos (círculo) e matriz alterada (ma). Coloração H.E. Asterístico – Cartilagem articular; Seta curta – Inativação do disco epifisário..... 112

Figura 2: Fêmures dos animais dos grupos IV e V. A e B – induzidos à corticoterapia + estrógeno simultâneo. A - Observar perda da microarquitetura óssea. B – Observar osteoblastos (seta amarela), osteócitos ativos (círculo) e áreas de matriz alterada (ma). Coloração H.E. C e D – induzidos à corticoterapia + estrógeno últimos 15 dias). C - Observar arquitetura óssea preservada. D – Observar osteoblastos (seta amarela), osteócitos (círculo) e áreas de matriz alterada (ma). Coloração H.E. Asterístico – Cartilagem articular; Seta curta – Inativação do disco epifisário..... 113

Figura 3: Detecção de Cálcio nos fêmures dos animais dos grupos experimentais. A – Grupo controle (I). Evidenciar grande depósito de cálcio junto ao centro de ossificação; B – Grupo induzidos à corticoterapia sem tratamento. C – induzidos à corticoterapia + alendronato de sódio simultâneo (Controle Positivo); D – induzidos à corticoterapia + estrógeno simultâneo; F – induzidos à corticoterapia + estrógeno últimos 15 dias, evidenciar grande depósito de cálcio junto ao centro de ossificação. Coloração Von Kossa. Aumentos 107X. Setas – Marcação positiva para cálcio..... 114

Figura 4: Imunohistoquímica e quantificação do IL-6 no fêmur. A: GI – controle; B: GII– induzidos à corticoterapia sem tratamento; C: GIII– induzidos à corticoterapia + alendronato de sódio simultâneo; D: GIV– induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno simultâneo; E: GV -

induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno nos últimos 15 dias;
 F – Quantificação em pixels da expressão do fator IL- 6. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$)..... 115

Figura 5: Imunohistoquímica e quantificação do TNF- α no fêmur. A: GI – controle; B: GII– induzidos à corticoterapia sem tratamento; C: GIII– induzidos à corticoterapia + alendronato de sódio simultâneo; D: GIV- induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno simultâneo; E: GV - induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno nos últimos 15 dias; F – Quantificação em pixels da expressão do fator TNF α . Notar aumento significativo dos pixels nos grupos GII em relação aos outros. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$)..... 116

Figura 6: Índice apoptótico no fêmur. A: GI – controle; B: GII– induzidos à corticoterapia sem tratamento; C: GIII– induzidos à corticoterapia + alendronato de sódio simultâneo; D: GIV- induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno simultâneo; E: GV - induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno nos últimos 15 dias; F – Quantificação dos núcleos em apoptose. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$)..... 117

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Quadro comparativo das várias preparações glicocorticoides, suas meias-vidas biológicas, doses equivalentes em miligramas, levando-se em conta o mecanismo clássico.....	28
---	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Média \pm desvio padrão do número de glomérulos (NG), área glomerular (AG) e da capsula de Bowman (ACB), do volume do glomérulo (VG) e da cápsula de Bowman (VCB) dos rins das ratas dos grupos experimentais.....	75
---	----

Tabela 2. Média das dosagens séricas das enzimas indicadoras da função hepática e renal, colesterol, triglicerídeos e glicose nas ratas dos grupos experimentais, no primeiro dia de tratamento.....	76
---	----

Tabela 3. Média das dosagens séricas das enzimas indicadoras da função hepática e renal, colesterol, triglicerídeos e glicose nas ratas dos grupos experimentais, no décimo quinto dia de tratamento.....	77
--	----

Tabela 4. Média das dosagens séricas das enzimas indicadoras da função hepática e renal, colesterol, triglicerídeos e glicose nas ratas dos grupos experimentais, 45 dias pós-tratamento.....	78
--	----

CAPÍTULO III

Tabela 1: Média das dosagens séricas das enzimas indicadoras da função óssea nos animais dos grupos experimentais, no primeiro dia de tratamento.....	109
--	-----

Tabela 2: Média das dosagens séricas das enzimas indicadoras da função óssea nos animais dos grupos experimentais, no décimo quinto dia de tratamento..... 110

Tabela 3: Média das dosagens séricas das enzimas indicadoras da função óssea nos animais dos grupos experimentais, 45 dias pós-tratamento..... 111

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACTH** – Hormônio Adrenocorticotrófico
- ADH** – Hormônio Antidiurético
- ALB** – Albumina
- ALT** – Alanina Aminotransferase
- APA 1** – Fatores de Transcrição
- AST** – Aspartato Aminotransferase
- CEH** – Células Estreladas Hepáticas
-
- COX-2** – Ciclo- Oxigenase 2
- CRH** – Hormônio Liberador de Corticotrofina
- CTX – 1** - C- Telopectídeo
-
- ER- α** – Receptor Estrogênico α
- ER- β** – Receptor Estrogênico β
- FA** – Fosfatase Alcalina
- FAO** – Fosfatase Alcalina Óssea
-
- FF** – Fração de Filtração Renal
- GC** – Glicocorticóides
- GGT** – Gama Glutamil Transferase
- GH** – Hormônio do Crescimento
- GLOB** – Globulinas
- GR** – Receptor de Glicocorticoides
- GRE** – Elemento de Resposta aos Glicocorticoides
- HDL**- Lipoproteína de Baixa Densidade
-
- HHA** – Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
- IGF-1** – Fator Semelhante a Insulina 1
- IL6** – Interleucina 6
- INFg** – Interferon g
- IRS-1** – Receptor de Insulina 1

LDL - Lipoproteína de Alta Densidade

NF-K β – Fator Nuclear Kapa B

PPT – Proteína Plasmática Total

PTH – Hormônio da Paratireoide

RBF – Fluxo Sanguíneo Renal

RVR – Resistência Vascular Renal

SEGRA – Selective Glucocorticoid Receptor Agonist

TFG – Taxa de Filtração Glomerular

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

TRAP – Fosfatase Ácida Tartarato -Resistente

SUMÁRIO

Capítulos	Pág.
I	
1. Introdução	22
2. Revisão de Literatura.....	25
2.1. Glicocorticoides.....	25
2.1.1. Mecanismo de ação dos glicocorticóides.....	28
2.1.2. Ação dos glicocorticoides no metabolismo.....	32
2.1.3. Efeitos colaterais da corticoterapia.....	34
2.2. Efeitos da corticoterapia sobre os rins.....	35
2.3. Efeito da corticoterapia sobre o tecido ósseo.....	38
2.4. Efeito da corticoterapia sobre o fígado.....	40
2.5. Estrógeno.....	42
2.6. Indicadores bioquímicos.....	44
2.7. Resposta inflamatória, imunomodulação e apoptose.....	49
3. Referências.....	52
II	
Ação estrogênica no tecido renal e hepático após corticoterapia prolongada.....	60
1. Resumo.....	61
2. Abstract.....	62
3. Introdução.....	63
4. Material e métodos.....	65
5. Resultados.....	70
6. Discussão.....	85
7. Conclusão.....	90
8. Referências.....	90
III	
Estrógeno protege e repara o tecido ósseo dos danos da corticoterapia por interferir nas citocinas pró-inflamatórias e nos marcadores de reabsorção óssea.....	96
1. Resumo.....	97

2. Abstract.....	98
3. Introdução.....	99
4. Material e Métodos.....	102
5. Resultados.....	106
6. Discussão.....	118
7. Conclusão.....	122
8. Referências.....	122

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A terapia com glicocorticoides (GC), denominada corticoterapia, vem sendo cada vez mais utilizada em diversas especialidades médicas e fins terapêutico devido ao seu potente efeito anti-inflamatório e imunomodulador. O uso clínico desse fármaco é indicado em casos como deficiência da suprarrenal (congenita ou adquirida), doenças reumáticas, renais, alérgicas, infecciosas, oftalmológicas, dermatológicas, gastrointestinais, hepáticas, leucemias e linfomas, edema cerebral e trauma cervical (SEGURO; ROSARIO; SHOENFELD, 2013).

O modo pelo qual o glicocorticoide atinge seu receptor parece ser devido à difusão passiva através da membrana celular, não necessitando de transporte específico. A ligação do GC a seu receptor no citoplasma da célula resulta na ativação do complexo receptor-glicocorticoide mediante processo que envolve a dissociação das proteínas do choque térmico HSP 90 e HSP 70 (CHARMANDARI; KINO; CHROUSOS, 2004; SERRA; ROGANOVICH; RIZZO, 2012).

Apesar do uso bastante difundido no tratamento de várias doenças, é recorrente a manifestação de efeitos colaterais mediante uso prolongado dos corticoides, o que vem alertando sobre os riscos de seu uso indiscriminado. Por possuírem ação sistêmica, os GC apresentam efeitos colaterais em vários órgãos. A literatura demonstra que esses efeitos são bastante frequentes e variam desde sintomas leves e reversíveis com a parada do medicamento, até manifestações irreversíveis e por vezes letais (SOUZA et al., 2010).

Existe uma extensa lista de efeitos indesejáveis durante a corticoterapia, em geral associadas ao tempo de tratamento e uso de glicocorticoides de ação prolongada, incluem: alteração da disposição de gordura, disfunção hipofisária, alteração no eixo endócrino-metabólico, modificação no sistema renal, cardiovascular, hematopoiético e imunológico. Porém o principal efeito colateral decorrente do uso sistêmico de corticoides é sobre o tecido ósseo, podendo ocasionar: osteoporose, fraturas ósseas, fraqueza, miopatia, necrose asséptica

33 de cabeça de fêmur e úmero em ratos (RHODUS et al., 2006; SCHIMMER;
34 PARKER, 2007; LONGUI, 2007; PEREIRA, et al., 2007; VAN RAALTE;
35 DIAMANT, 2014).

36 Devido a estes efeitos colaterais, buscam-se alternativas terapêuticas
37 para minimizar tais danos decorrentes da corticoterapia, como: diminuição do
38 tempo de administração e associação com outras drogas, hormônios ou
39 fitoterápicos. Dentre essas opções, uma estratégia que tem se mostrado
40 eficiente é a reposição hormonal, principalmente pelo estrógeno, que se
41 destaca por atuar na remodelação óssea, contudo por mecanismos ainda não
42 totalmente elucidados. A presença de receptores para estrógeno em células
43 ósseas, hepáticas e renais sugere efeito direto desse hormônio sobre esses
44 órgãos (OH; KIM; CHUNG, 2008; KAMANGA-SOLLO, et al., 2017). Podendo
45 assim ser uma boa alternativa para minimizar os efeitos da terapia com
46 glicocorticoides.

47 Os estrógenos são hormônios que produzem numerosas ações
48 fisiológicas, incluindo efeitos no desenvolvimento, ações neuroendócrinas
49 envolvidas no controle da ovulação, preparo cíclico do aparelho reprodutor para
50 fertilização e implantação do óvulo, além disso, atua no metabolismo de
51 minerais, carboidratos, proteínas e lipídios (COMPSTON, 2001).

52 Em relação às células ósseas, o estrógeno aumenta a diferenciação
53 dessas células e estimula a síntese e a mineralização da matriz óssea,
54 regulando a expressão de genes que codificam o colágeno tipo I e as proteínas
55 não colagênicas como osteopontina, osteocalcina, osteonectina (CHENG;
56 WANG, LING, 2015). Demonstrando assim, ser uma boa alternativa para
57 minimizar os efeitos da corticoterapia sobre o tecido ósseo.

58 Sabe-se que a maioria dos fármacos tem seus efeitos terapêuticos
59 explicados através da ligação a receptores específicos. A administração
60 concomitante de fármacos e medicamentos fitoterápicos pode alterar os níveis
61 de resposta a esses receptores, provocando a ampliação ou redução do efeito
62 farmacológico esperado, devido ao sinergismo ou antagonismo,
63 respectivamente (IZZU; ERNST, 2001). Porém, não há estudos quanto aos
64 efeitos da associação de estrógenos na corticoterapia sobre o tecido ósseo,

65 renal e hepático. Assim, a presente pesquisa visou avaliar os efeitos da
66 administração de estrógeno associado à corticoterapia sobre fígado, rins e
67 tecido ósseo em ratas, a fim de identificar uma estratégia de tratamento com
68 menor efeito colateral.

69

70 2. REVISÃO DE LITERATURA

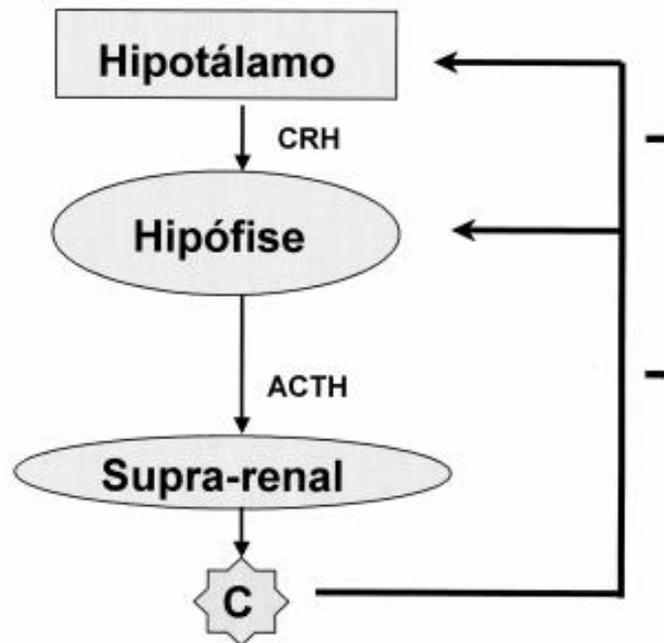
71

72 2.1 Glicocorticóides

73

74 Os glicocorticoides (GC) pertencem à classe dos hormônios esteroides,
75 com um núcleo básico derivado do colesterol-ciclopentano perhidrofenantreno.
76 O representante natural é o cortisol ou hidrocortisona, um composto com 21
77 átomos de carbono. É produzido pelo córtex da adrenal e é um marcador de
78 atividade secretora do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (Figura 1). A
79 produção de cortisol é controlada pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH)
80 que é sintetizado na Adeno- Hipófise (LONGUI, 2007). O ACTH estimula a
81 síntese e secreção de hormônios pelo córtex da adrenal. A liberação do ACTH
82 é majoritariamente estimulada pelo hormônio liberador de corticotrofina (CRH)
83 e a liberação do CRH segue um ritmo circadiano. O pico de secreção do
84 cortisol ocorre mais ou menos por volta do amanhecer, sendo mais baixo no
85 início da noite. A regulação desse ritmo depende de estímulos internos (por ex.
86 dos núcleos supraquiasmáticos) e também por estímulos ambientais como a
87 luz (SARAIVA; SOARES; GAVINA, 2005).

88 Em 1946, o cortisol foi sintetizado e, em 1948, utilizado pela primeira vez
89 por Hench em pacientes com artrite reumatoide. Logo a seguir, os efeitos
90 colaterais adversos foram reconhecidos, os quais adicionaram limites ao uso
91 terapêutico dos GC. Na década de 1950, as modificações na estrutura do
92 cortisol resultaram em novos fármacos, como a prednisona e a presnisolona.
93 Assim, as subseqüentes modificações estruturais dos esteroides sintéticos
94 ampliaram a duração e a potência do efeito glicocorticoide, bem como
95 proporcionaram afinidades e tempo de ligação diferente aos receptores
96 (SANTIAGO; SILVA, 2015).



97 Figura 1. Representação esquemática da regulação da secreção de cortisol,
 98 com as alças de “feed-back” em nível de hipófise e de hipotálamo (DAMIANI, et
 99 al., 2001).

100

101 Os GCs são indicados para diversas especialidades médicas, incluindo a
 102 dermatologia, a endocrinologia, a oncologia e a oftalmologia (MOSCA, et al.,
 103 2011). Atualmente são administrados no tratamento de diversas patologias e
 104 para fins terapêuticos, podendo ser administrado com três durações de
 105 tratamento: curto (< 10 dias), intermediário (10-30 dias) e prolongado (> 30
 106 dias). Sua absorção ocorre na parte proximal do jejuno, alcançando o pico
 107 plasmático 30 a 90 minutos após a ingestão (PEREIRA, et al., 2007; LONGUI,
 108 2007). Sua metabolização é essencialmente hepática, a enzima 11-beta
 109 hidroxidehidrogenase, que hidroxila o carbono 11 da molécula de cortisona e
 110 prednisona, transformando-as na sua forma inativa para a forma ativa. A
 111 cortisona 11-hidroxilada passa a ser hidrocortisona ou cortisol, e a 11-
 112 hidroxilação da prednisona resulta em prednisolone (PEREIRA, et al., 2007).

113 Existem vários GC vendidos no mercado para uso clínico. Cada um
 114 apresenta as relações de potência antiinflamatória, bem como a meia vida
 115 biológica desses vários preparados. De acordo com a tabela 1, verifica-se que
 116 os compostos betametasona e dexametasona apresentam maiores períodos de

117 meia vida, enquanto os compostos naturais cortisone e hidrocortisona
118 apresentam os menores períodos.

119 Desde a sua introdução na prática clínica, nos princípios de 1950, os GC
120 têm representado importante e, muitas vezes, decisivo instrumento terapêutico
121 no manejo de várias patologias (CALDAS; SCHRANK, 2001). Eles são os mais
122 potentes agentes anti-inflamatórios conhecidos e cada um de nós tem na
123 memória casos em que os efeitos verdadeiramente “milagrosos” dos
124 corticoides foram observados (DAMIANI et al., 2007).

125 Os GC tornaram-se agentes importantes no tratamento de numerosos
126 distúrbios inflamatórios, alérgicos, hematológicos e entre outros (KATZUNG,
127 2003; SHANTHINI KASTURI; SAMMARITANO, 2016). O emprego principal é
128 no alívio da dor e no combate às inflamações na artrite reumatóide
129 (SANTIAGO; SILVA, 2015). Essa aplicação terapêutica estimulou o
130 desenvolvimento de muitos esteroides sintéticos com atividade anti-inflamatória
131 e imunossupressora (KATZUNG, 2003).

132 Atualmente esses fármacos têm sido amplamente prescritos no
133 tratamento de doenças de origem inflamatória, são indicados ainda para artrite
134 reumatóide, asma, lupus e polimialgia reumática (THIELE et al., 2005; VAN
135 DER GOES; JACOBS; BIJLSMA, 2014; SANTIAGO; SILVA, 2015; BAZSÓ, et
136 al., 2015). Usados ainda no tratamento de doenças alérgicas e
137 imunomediadas, choque séptico e cardiogênico, traumatismos do sistema
138 nervoso central e da coluna vertebral (MOSCA et al., 2011).

139 A corticoterapia, ou seja, a administração prolongada de GC é o
140 tratamento cada vez mais indicado devido ao seu poder anti-inflamatório e
141 imunomodulador. Estudos revelam que os GC reduzem a exposição antigênica
142 ao sistema imune, diminuem a liberação de citocinas pró-inflamatórias e a
143 eficiência da eliminação do agente agressor e células infectadas. Eles inibem a
144 transcrição de várias citocinas, que são relevantes nas respostas
145 inflamatórias, e a indução do gene codificador do COX-2 (Ciclo-Oxigenase 2)
146 em monócitos, além de bloquearem a transcrição de uma forma de fosfolipase
147 A2 induzida por citocinas, reduzem a ativação, a proliferação e a
148 sobrevivência de eosinófilos e linfócitos T e bloqueiam a liberação de várias

149 citoquinas. Esse processo leva à morte celular ou apoptose (DAMIANI et al.,
150 2001; LONGUI, 2007; PEREIRA 2007).

151

152 **Equivalências antiinflamatórias (mecanismo clássico, genômico)**

Corticosteróide	Meia vida biológica (h)	Potência equivalente (mg)
Ação Curta		
Cortisona	8-12	25
Hidrocortisona	8-12	20
Ação intermediária		
Prednisona	18-36	5
Prednisolona	18-36	5
Metilprednisolona	18-36	4
Triancinolona	18-36	4
Ação Longa		
Dexametasona	36-54	0,75
Betametasona	36-75	0,6

159

160 Tabela 1. Quadro comparativo das várias preparações glicocorticoides, suas
161 meias-vidas biológicas, doses equivalentes em miligramas, levando-se em
162 conta o mecanismo clássico (DAMIANI, et al., 2001).

163

164 O efeito imunossupressor é uma característica dos GC e é a razão do seu
165 uso em certas condições em que se deseja tal efeito. Os linfócitos T são mais
166 suscetíveis aos GC do que os linfócitos B. Diminuem o aporte de leucócitos aos
167 sítios inflamados, inibem a resposta proliferativa de monócitos e sua
168 diferenciação a macrófagos, inibem a produção de interleucinas inflamatórias,
169 quimoquinas, moléculas de adesão e estimulam as interleucinas
170 antiinflamatórias, como a IL-10 (SERRA; ROGANOVICH; RIZZO, 2012; SINHA
171 et al., 2015). Isto confere a este grupo de compostos sua propriedade
172 antiinflamatória tão potente.

173

174 **2.1.1 Mecanismo de ação do fármaco glicocorticoide**

175 Os fármacos esteroides são habitualmente sintetizados a partir de
176 substâncias encontradas em plantas da família *Liliaceae* e *Dioscoreaceae*
177 (KATZUNG et al., 2003) e imitam as ações do cortisol endógeno (FUCHS,
178 WANNMACHER, 1998). As modificações adicionais desses esteroides levaram
179 à comercialização de um grande número de esteroides sintéticos com
180 diferentes potências, alguns atributos especiais e amplo uso terapêutico
181 (KATZUNG, 2003).

182 Os adrenocorticoides se ligam a receptores intracelulares citoplasmáticos
183 específicos nos tecidos-alvo. O complexo hormônio-receptor transloca-se para
184 o núcleo, onde age como fator de transcrição ativando ou desativando genes,
185 dependendo do tecido considerado. Esse mecanismo requer certo tempo para
186 produzir o efeito. Há outros efeitos dos GC, tais como seu requisito para ações
187 mediadas por catecolaminas como lipólise ou dilatação da musculatura
188 brônquica e vascular, que são imediatos. A base dessas ações é desconhecida
189 (HARVEY; CHAMPE, 1998).

190 O modo pelo qual o glicocorticoide atinge seu receptor parece ser devido
191 à difusão passiva através da membrana celular lipídica, não necessitando de
192 transporte específico. A ligação do glicocorticoide a seu receptor no citoplasma
193 da célula resulta na ativação do complexo receptor-glicocorticoide mediante
194 processo que envolve a dissociação das proteínas do choque térmico HSP 90
195 e HSP 70. Após a translocação para o núcleo, o complexo receptor-
196 glicocorticoide atua na regulação de genes relacionados às citocinas e à
197 apoptose celular por dois mecanismos: 1) ligação a locais específicos no DNA
198 do núcleo, chamados elementos reguladores dos glicocorticoides; e 2)
199 interação com outros fatores de transcrição, como o fator kB, um importante
200 regulador dos genes das citocinas. Isso resulta na expressão alterada de genes
201 específicos e na transcrição de mRNA específicos. As proteínas resultantes
202 induzem a resposta aos glicocorticoides, que pode ser inibidora ou
203 estimuladora, dependendo do gene específico e do tecido afetado
204 (CHARMANDARI; KINO; CHROUSOS, 2004; SERRA; ROGANOVICH; RIZZO,
205 2012).

206 Os efeitos negativos na expressão genética contribuem para os efeitos
207 anti-inflamatórios e imunossupressores dos glicocorticóides. Os receptores de
208 glicocorticoides são semelhantes em muitos tecidos, porém as proteínas
209 sintetizadas em resposta aos glicocorticoides variam amplamente e resultam
210 da expressão de genes específicos em diferentes tipos celulares. Os
211 mecanismos subjacentes a essa regulação específica permanecem
212 desconhecidos (LARCEN et al., 2003).

213 Embora os complexos glicocorticoides-receptores e sua regulação
214 subsequente da expressão gênica sejam responsáveis pela maioria dos efeitos
215 dos glicocorticoides, parece existir também um mecanismo não genômico
216 envolvendo respostas hormonais. Vários efeitos foram relatados quase
217 imediatamente após exposição ao corticosteroide, mediados, acredita-se, por
218 receptores ainda não identificados, acoplados às membranas plasmáticas
219 (SERRA; ROGANOVICH; RIZZO, 2012).

220 A partir do momento que os glicocorticóides cruzam a membrana
221 citoplasmática da célula-alvo, este se une ao GR e forma o complexo
222 hormônio-receptor, modulando a transcrição dos genes alvo dos
223 glicocorticóides de maneira positiva (transativação) ou negativa
224 (transrepressão), na dependência do contexto do promotor e da participação de
225 proteínas coativadoras ou co-repressoras. A ativação da transcrição gênica é
226 regulada por um complexo de fatores reguladores da atividade da RNA
227 polimerase II e co-fatores protéicos (fatores de transcrição basal) e outros
228 fatores associados (fatores gerais de transcrição) (DEJEAN; RICHARD, 2013).

229 A ação dos fatores de transcrição pode ser modulada independentemente
230 de ligação direta ao DNA, através de interação proteína-proteína com outros
231 fatores de transcrição como a proteína de ativação do complexo dos fatores de
232 transcrição (APA-1) e o fator nuclear kapa B (NF-kB) nas regiões regulatórias
233 de diferentes genes. A ligação de monômeros ou dímeros de GR com AP-1 e
234 NF-kB inibem a ativação transcricional dos genes regulados por estes fatores
235 (Figura 2) (BARNES, 2010). Ao penetrarem na célula alvo, os glicocorticóides
236 se ligam a receptores de glicocorticóides (GR) no citoplasma e são

237 translocados até o núcleo, dando início ao processo de transcrição dos genes
238 associados aos elementos de resposta ao glicocorticóides.

239 A ligação à região promotora dos genes sensíveis aos glicocorticóides
240 leva ao mecanismo de transativação, com transcrição de genes que codificam
241 mediadores anti-inflamatórios. No mecanismo de transrepressão, o complexo
242 glicocorticóide-receptor se liga a moléculas coativadoras com atividade de
243 histona acetiltransferase (HAT) levando à ativação de fatores de transcrição
244 nuclear pró-inflamatórios como NF- κ B.

245

246

247

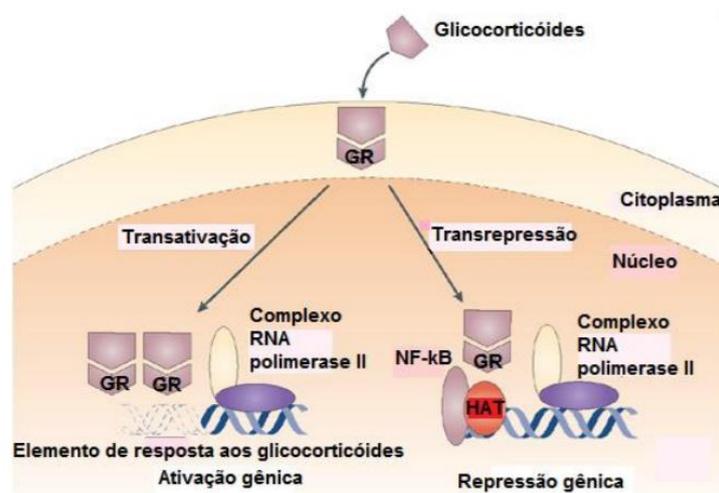
248

249

250

251

252



253 Figura 2: Mecanismo de ação dos glicocorticóides. (ERRANTE et al.,
254 2014)

255

256 Os mecanismos de transativação ativados pelos GR e mediados por
257 fatores de transcrição são responsáveis pelos efeitos terapêuticos dos
258 glicocorticóides no controle da resposta imune e inflamatória (DEJEAN;
259 RICHARD, 2013). A maior parte dos efeitos metabólicos dos glicocorticóides é
260 baseada neste modelo de ação, levando a indução da síntese de lipocortina e
261 p11/calpactina, que inibem a enzima fosfolipase A2 do metabolismo do ácido
262 araquidônico pelas vias da cicloxigenase e lipoxigenase; ativação de inibidores
263 de proteases de leucócitos e antagonistas do receptor de IL-1 (WEBSTER et
264 al., 2001). Genes responsáveis pelos efeitos inibitórios dos glicocorticóides são
265 encontrados na região 5' do DNA, próximo a região promotora de alguns genes
266 sensíveis a inibição pelos glicocorticóides, com o gene para IL-6 e queratina

267 (BARNES, 2010). Outra forma de inibição efetuada pelos glicocorticóides
268 consiste na união de monômeros de GR com o hormônio em regiões
269 promotoras no DNA (YANG; RAY, 2012). A inibição da atividade transcricional
270 do GR (transrepressão) é regulada por coativadores e co-repressores que
271 interagem com GR. Os coativadores mais conhecidos são Brahma-related gen
272 1 (BRG-1), p-300-CBP associated factor (P/CAF), CBP/p300, P160 e vitamin D3
273 receptor-interacting protein (DRIP) (RAMAMOORTHY; CIDLOWSKI, 2013).

274 Diversos estudos têm demonstrado que a maior parte dos efeitos clínicos
275 observados ao se administrar um GC, ou seja, o efeito antiinflamatório e o
276 efeito imunossupressor são desencadeados por mecanismos de
277 transrepressão, enquanto que grande parte dos efeitos adversos é relacionada
278 aos mecanismos de transativação (SONG et al., 2005).

279 O atual conhecimento de que os efeitos adversos da corticoterapia são
280 relacionados a mecanismos de transativação, enquanto os desejados efeitos
281 antiinflamatórios e imunomoduladores são relacionados aos mecanismos de
282 transrepressão, faz com que novas pesquisas sejam continuamente realizadas
283 a fim de que sejam desenvolvidos GC que atuem na transrepressão e
284 apresentem baixa atividade na transativação. Esses seriam os chamados
285 glicocorticóides dissociados ou agonistas seletivos do receptor de
286 glicocorticóides (selective glucocorticoid receptor agonist – SEGRA).
287 (ERRANTE et al., 2014).

288

289 **2.1.2 Ação dos glicocorticóides no metabolismo renal, hepático e** 290 **ósseo.**

291

292 A razão pela qual os GC produzem tantos e tão variados efeitos decorre
293 das numerosas ações metabólicas que esse grupo de drogas produz. No
294 metabolismo de hidratos de carbono, os GC antagonizam várias ações
295 periféricas da insulina, tendo potencial diabetogênico: aumentam a resistência
296 à insulina diminuindo a utilização periférica de glicose e promove a
297 neoglicogênese (produção de glicose a partir de substratos como aminoácidos,

298 o que implica um importante efeito catabólico) (SEGURO; ROSARIO;
299 SHOENFELD, 2013).

300 Já no nível hepático, o GC promove a deposição de glicogênio, efeito
301 semelhante à insulina. Com relação ao metabolismo lipídico, seu efeito agudo é
302 de ativar a lipólise, mas, em longo prazo, promove uma redistribuição
303 característica do tecido adiposo que confere ao paciente o clássico aspecto de
304 obesidade centrípeta (fácio-escápulo-truncal), com ganho de peso (LONGUI,
305 2007; PEREIRA et al., 2007).

306 No metabolismo protéico, os GC apresentam uma dualidade de ações,
307 dependendo da dose administrada ou do nível sérico atingido: em doses
308 fisiológicas os GC atuam como agentes anabolizantes, incorporando proteína,
309 mas em doses farmacológicas são francamente catabólicos, promovendo
310 intenso desgaste protéico que, clinicamente, traduz-se por uma pele frágil,
311 friável, fraqueza muscular intensa com redução de massa muscular e desgaste
312 da matriz óssea implicando em mau desempenho estatural em crianças em
313 fase de crescimento (DAMIANI et al., 2001).

314 No sistema músculo-esquelético, os GC reduzem a atividade dos
315 osteoblastos e aumentam a atividade osteoclástica, com perda de massa
316 óssea. Reduzem a absorção intestinal de cálcio, antagonizando os efeitos da
317 vitamina D, promovem calciúria e levam a um hiperparatireoidismo secundário,
318 com aumento do paratormônio. O efeito final desta série de eventos é uma
319 pronunciada osteopenia e osteoporose, tanto mais intensa quanto acelerada for
320 o período de crescimento: adolescentes em fase de crescimento são mais
321 prejudicados por tais efeitos e meninas são mais afetadas que meninos
322 (BOLANOWSKI; HALUPCZOKJ; JAWIARCZYK-PRZBYLOWSKA, 2015).

323 Quanto ao equilíbrio hidro-eletrolítico, algumas preparações GC são
324 poderosas retentoras de sódio e perdedoras de potássio, graças a um efeito
325 mineralocorticóide. Os compostos naturais, como o cortisol, tendem a
326 apresentar tal efeito de maneira mais intensa do que os compostos sintéticos
327 como a dexametasona e a betametasona, que praticamente carecem de ação
328 mineralocorticóide. Tais aspectos devem ser lembrados quando diante de
329 pacientes que têm dificuldades de lidar com volume, como é o caso de

330 cardiopatas ou nefropatas. Pela espoliação de volume que provocam, ocorre
331 ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SANTIAGO; SILVA,
332 2015).

333 Com relação aos componentes do sistema hematopoiético, os corticóides
334 tendem a aumentar os níveis de hemoglobina e o número de hemácias
335 circulantes. Na série branca, observa-se uma leucocitose, linfocitopenia,
336 eosinofilia e monocitopenia (DIMIANI et al., 2001).

337 Apesar do seu uso difundido no tratamento de várias doenças, é
338 recorrente a manifestação de efeitos colaterais decorrente do uso prolongado
339 dos corticoides, o que vem alertando sobre os riscos de seu uso
340 indiscriminado.

341

342 **2.1.3 Efeitos colaterais da corticoterapia**

343

344 Ao lado de esperados benefícios, há risco de potenciais efeitos adversos,
345 nas quais o mesmo mecanismo de ação dos GC é responsável pela cura e
346 também pelos efeitos colaterais que surgem no decorrer da corticoterapia
347 (FÉLIX, 2006). Existe uma imensa lista de efeitos indesejáveis decorrentes da
348 corticoterapia, em geral relacionados ao tempo de tratamento e uso de GC de
349 ação prolongada. Esses efeitos são bastante frequentes e variam desde
350 sintomas leves e reversíveis com a parada do medicamento até manifestações
351 irreversíveis e por vezes letais (SOUZA et al., 2010).

352 Apesar de alguns sintomas como irritabilidade e insônia poderem ocorrer
353 com administrações curtas, em geral, os efeitos adversos são diretamente
354 proporcionais à duração do tratamento e frequência de administração
355 (SCHIMMER; PARKER, 2007).

356 A literatura relata efeitos adversos que atingem vários órgãos e sistemas:

- 357 • *Complicações músculo-esquelético*: osteoporose, fraturas ósseas,
358 fraqueza, miopatia, atrofia muscular proximal, necrose asséptica de
359 cabeça de fêmur e úmero (VON MÜHLEN, 2006; CHENG; WANG;
360 LING, 2015; BOZZINI et al., 2015).

- 361 • *Complicações Renais*: nefrocalcinose, nefrolitíase e uricosuria (LONGUI,
362 2007; DICKINSON et al., 2007).
- 363 • *Disfunção Gonadal*: alterações menstruais, diminuição da libido,
364 impotência, hipotireoidismo, interrupção do crescimento e baixa estatura
365 em crianças (SERRA; ROGANOVICH; RIZZO, 2012).
- 366 • *Complicações hematológicas*: leucocitose (com neutrofilia);
367 linfocitopenia; eosinopenia; monocitopenia (SERRA; ROGANOVICH;
368 RIZZO, 2012).
- 369 • *Complicações cardiovasculares*: hipertensão, infarto do miocárdio,
370 acidente vascular cerebral (SERRA; ROGANOVICH; RIZZO, 2012).
- 371 • *Manifestações Dermatológicas*: estrias púrpuras, plethora,
372 hiperpigmentação, acne e equimoses (FÉLIX, 2006, FREITAS; SOUZA,
373 2007).
- 374 • *Complicações Gastrointestinais*: irritação gástrica, úlcera péptica,
375 pancreatite aguda (rara), infiltração gordurosa no fígado, hepatomegalia
376 (rara) (FREITAS; SOUZA, 2007).
- 377 • *Sistema metabólicos*: retenção de sódio e edema, alcalose
378 hipocalêmica, hipocalcemia, resistência à insulina e hiperlipidemia
379 (RANG et al., 2003; VAN RAALTE; DIAMANT, 2014).
- 380 • *Complicações oftálmológicas*: aumento da pressão intraocular,
381 glaucoma, infecções bacterianas e fúngicas (FINAMOR; FINAMOR JR;
382 MUCCIOLI, 2002).

383 Diante disto, fica evidente a importância de trabalhos que busquem
384 alternativas terapêuticas para minimizar esses efeitos indesejados, como:
385 diminuição do tempo de administração e associação com outras drogas ou
386 fitoterápicos.

387

388 **2.2 Efeito da corticoterapia sobre os rins**

389

390 Os rins são órgãos excretores, com morfologia classicamente definida em
391 forma de grão de feijão (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Estão localizados no
392 espaço retroperitoneal da parede abdominal posterior, cada um do lado da

393 coluna vertebral, na altura da 12^a vértebra torácica à terceira vértebra lombar,
394 sendo o rim direito ligeiramente mais inferior, devido à posição do fígado
395 (GENESER, 2003; GARTNER; HIATT, 2007; ROSS; PAWLINA, 2012).
396 Possuem uma cápsula de tecido conjuntivo denso, com muitos miofibroblastos
397 na porção interna. Exibem uma borda lateral convexa e uma borda medial
398 côncava, na qual se situa o hilo. Neste entram e saem os vasos sanguíneos e
399 linfáticos e os nervos e emerge a pelve renal, a parte superior e expandida do
400 ureter (OVALLE.; NAHIRNEY, 2008). Histologicamente, são revestidos por uma
401 cápsula de tecido conjutivo denso e o parênquima apresnta duas regiões
402 distintas, a zona cortical e a zona medular (ROSS; PAWLINA, 2008). A zona
403 cortical possui estruturas vasculares, os corpúsculos renais (ou de Malpighi),
404 onde o sangue é filtrado. A zona medular possui seis a 18 pirâmides
405 medulares, sendo, portanto, multilobar. As bases das pirâmides situam-se no
406 limite corticomedular e o ápice é voltado para o hilo (GENESER, 2003;
407 GARTNER; HIATT, 2007; ROSS; PAWLINA, 2012).

408 Ainda segundo esses autores, uma pirâmide medular e o tecido cortical
409 adjacente constituem um lobo renal e os ductos coletores abrem-se na
410 extremidade da papila, formando a área crivosa ou cribiforme. A unidade
411 funcional do rim, o néfron, consiste em uma porção dilatada, o corpúsculo renal
412 e um sistema de túbulos (ROSS; PAWLINA, 2008), que incluem o túbulo
413 contorcido proximal, partes delgadas e espessas da alça de Henle e o túbulo
414 contorcido distal. O túbulo coletor conecta o túbulo contorcido distal aos
415 fragmentos corticais ou medulares dos ductos coletores (JUNQUEIRA;
416 CARNEIRO, 2013). O corpúsculo renal consiste no glomérulo, um
417 enovelamento de capilares (arteríolas aferentes e eferentes), e na cápsula de
418 Bowman, que possui dois folhetos: um externo, o folheto parietal, de epitélio
419 simples pavimentoso, e outro interno, acolado aos capilares, o folheto visceral,
420 formado por células epiteliais modificadas, os podócitos. O espaço entre a
421 camada visceral e a camada parietal é chamado de espaço subcapsular, que
422 recebe o líquido filtrado através das paredes dos capilares e do folheto visceral
423 da cápsula (BERNE et. al., 2004; ROSS; PAWLINA, 2008; JUNQUEIRA;
424 CARNEIRO, 2013). Além das células endoteliais e dos podócitos, os capilares
425 glomerulares contém, ainda, um grupo de células denominadas células

426 mesangiais. Estas células não estão inteiramente confinadas ao corpúsculo
427 renal, estando algumas, fora do corpúsculo ao longo do pólo vascular, onde
428 também são chamadas de células reticuladas, e fazem parte do que é
429 denominado aparelho justaglomerular (ROSS; PAWLINA, 2008), o qual regula
430 o fluxo sanguíneo renal e a taxa de filtração glomerular (BERNE et al., 2004).
431 Os vários segmentos do sistema de túbulos dos néfrons determina a
432 quantidade de substâncias contidas na urina (BERNE et al., 2004), sendo,
433 portanto, responsáveis pela manutenção e regulação da composição do líquido
434 extracelular e para a manutenção do equilíbrio ácido-base. Além disso,
435 funcionam como um órgão endócrino, pois sintetizam e secretam eritropoietina
436 (que regula a formação das hemácias em resposta à diminuição da
437 concentração de oxigênio no sangue) e renina (enzima envolvida no controle
438 da pressão arterial e do volume sanguíneo) (AIRES, 2008; ROSS; PAWLINA,
439 2008). O volume de filtrado formado por unidade de tempo é conhecido com a
440 taxa de filtração glomerular (TFG).

441 A capacidade de filtrar um enorme volume de plasma permite aos rins
442 excretar grandes quantidades de produtos residuais e regular os constituintes
443 do meio interno com muita precisão (EATON; POOLER, 2016). A TFG é a
444 soma das intensidades de filtração de todos os néfrons em funcionamento.
445 Assim, a TFG é o índice da função dos rins. O conhecimento da TFG é
446 essencial na avaliação da gravidade e do desenvolvimento da doença renal.
447 Quando ocorre queda na TFG, geralmente, significa que a doença está
448 progredindo, enquanto o aumento na TFG geralmente sugere o
449 restabelecimento da função renal (BERNE; LEVY, 2000).

450 Vários estudos vêm demonstrando efeitos dos GC sobre o tecido renal. No
451 rim fetal, GC estimulam angiotensina II, vasopressina, ACTH e receptor de
452 leptina, bem como enzimas metabólicas, canais de Na⁺ epiteliais, Na⁺/K⁺
453 ATPase e transportadores de íons Na⁺/H⁺ e aquaporinas (CONSTANCIA et al.,
454 2005, FUGLSANG; OVESEN, 2006). Estudos demonstraram que o principal
455 efeito dos GC pré-natais foi à redução do número de néfrons, que era
456 comumente associado ao desenvolvimento da hipertensão na vida adulta
457 (ZIMANYI et al., 2002, WINTOUR et al., 2003, DICKINSON et al., 2007).

458 A corticoterapia promove aumento da reabsorção de Na⁺ e excreção de
459 K⁺ pelo rim. Altas doses administradas por períodos prolongados como nos
460 casos de lúpus, pode produzir alcalose metabólica hipocalêmica (SHANTHINI
461 KASTURI; SAMMARITANO, 2016).

462 Estudos revelam que os GC possuem efeitos diretos no túbulo renal e
463 conseqüentemente aumenta à taxa de filtração glomerular, podendo inibir a
464 secreção do hormônio antidiurético (ADH), mas não se sabe se diretamente ou
465 por algum mecanismo indireto (WYRWOLL et al., 2007).

466 Em ratos adultos submetidos à dexametasona pré-natal, o número de
467 néfrons foi reduzido em 13% apenas nos machos e a pressão arterial,
468 resistência vascular renal (RVR), fluxo sanguíneo renal (RBF), filtração fração
469 (FF) e a taxa de filtração glomerular (TFG) não mostraram quaisquer alterações
470 em relação aos controles (MARTINS et al., 2003). No entanto, machos e
471 fêmeas ovinos adultos expostos a betametasona mostraram uma redução de
472 26% no número de néfrons, um aumento da pressão arterial e uma diminuição
473 da TFG (ZHANG et al., 2010). Além disso, os GC demonstraram efeitos
474 estimulantes Na⁺/K⁺ -ATPase-a-1 e o sistema renina-angiotensina em ratos e
475 ovinos aumentando os níveis de expressão dos receptores de angiotensina e
476 regulação positiva do gene de angiotensinogênio (MORITZ et al., 2002;
477 WYRWOLL et al., 2007).

478 Estudos relatam que 59-86% dos pacientes induzidos a corticoterapia
479 apresentam hipertensão sistêmica (GOY-THOLLOT et al., 2002; NOVELLAS et
480 al., 2008). Os GC têm uma infinidade de ações em múltiplos sistemas
481 orgânicos. Portanto, o mecanismo hipertensão induzida por GC é complexa e
482 não tem sido totalmente elucidado.

483

484 **2.3 Efeitos da corticoterapia sobre o tecido ósseo**

485

486 Entre todos os efeitos colaterais decorrente do uso prolongado dos GC, o
487 maior efeito é sobre o tecido ósseo. Metade dos doentes que realizam
488 corticoterapia, por mais de seis meses, têm osteoporose e cerca de 1/3

489 desenvolvem fraturas, caso o tratamento se prolongue por um ano (GUTIÉRREZ
490 - POLO, 2003). As fraturas osteoporóticas vertebrais e dos ossos longos são
491 causa de mobilidade e associam-se a diminuição da esperança média de vida
492 em idades avançadas.

493 Os efeitos adversos dos GC sobre o tecido ósseo foram descritos há mais
494 de meio século atrás por Harvey Cushing. Atualmente, o problema atinge uma
495 dimensão maior pelo diagnóstico de osteoporose ser mais frequente e pelo
496 amplo uso, muitas vezes indiscriminado, dos análogos dos GC para o controle
497 de diversas doenças. Isto levou ao aparecimento marcante das fraturas,
498 principalmente no esqueleto axial (BARACHO et al., 2011). O grau de perda
499 óssea é mais acentuado em áreas com predominância de osso trabecular, tais
500 como a coluna vertebral e costelas (CUSHING, 1932; BOZZING et al., 2015).

501 Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a ocorrência de
502 osteoporose nessa condição, como a ação direta dos glicocorticoides nas
503 paratireoides e nas células ósseas, alterações na produção de prostaglandinas,
504 citocinas, interleucinas, alterações na secreção do hormônio do crescimento
505 (GH), do fator semelhante a insulina - I (IGF-I) e esteroides gonadais
506 (ZANETTE et al., 2003; SOUZA et al., 2010).

507 A partir dessas vias, os GC desempenham sua ação podendo ser tanto
508 antiinflamatória quanto imunossupressora, promovendo apoptose das células
509 linfoides; inibindo a síntese de determinadas citocinas; modulando direta e
510 indiretamente a função das células β ; inibindo a proliferação e diferenciação de
511 monócitos e atividade de macrófagos; inibindo o movimento de células e fluidos
512 a partir do compartimento intravascular; inibindo a ação da histamina, a síntese
513 das prostaglandinas e a ação dos ativadores do plasminogênio. Os GC
514 interferem na circulação de células imunes, diminuindo o número de linfócitos
515 periféricos, principalmente linfócitos T, e inibem o acúmulo de neutrófilos no
516 local da inflamação (VON MÜHLEN, 2006; CHENG; WANG; LING, 2015).

517 Ainda não está completamente esclarecido se existe uma dose mínima
518 de glicocorticoide que seja simultaneamente eficaz e segura para o tecido
519 ósseo (GUTIÉRREZ- POLO, 2003). Alguns autores determinaram uma dose de
520 5 mg de prednisolona por dia (ou equivalente) como limite inferior de dose

521 deletéria para a homeostasia metabólica normal da remodelação óssea
522 (GUTIÉRREZ- POLO, 2003). No entanto, num estudo retrospectivo, Van Staa
523 et al. (2002) documentaram um aumento do risco relativo de fratura vertebral
524 para doses inferiores a 2,5 mg por dia de prednisona (VAN STAA et al., 2000) e
525 do risco relativo de fratura do colo do fêmur para doses superiores a 2,5 mg por
526 dia.

527 **2.4 Efeitos da corticoterapia sobre o fígado**

528

529 O fígado é um dos maiores órgãos do corpo humano, desempenhando
530 uma grande variedade de funções, vitais ao funcionamento saudável do
531 organismo (SCHINONI, 2006). Nos seres humanos, ele está normalmente
532 localizado no quadrante abdominal superior direito, estendendo-se para o
533 quadrante abdominal superior esquerdo, abaixo do diafragma (SHERLOK;
534 DOOLEY, 2004; MATTOS; DANTAS-CORRÊA, 2010). Anatomicamente está
535 dividido em duas unidades morfológicas: o lobo direito e o lobo esquerdo
536 (MATTOS; DANTAS-CORRÊA, 2010), os quais são separados por uma prega
537 peritoneal chamada de ligamento falciforme (SHERLOK; DOOLEY, 2004),
538 diferentemente do que ocorre em ratos, sendo o parênquima hepático
539 separado em quatro lobos: mediano, lateral esquerdo, lateral direito e caudado
540 (ALLER et al., 2008).

541 Histologicamente, ele é revestido por uma capsula delgada de tecido
542 conjuntivo (cápsula de Glisson) que se torna mais espessa no hilo, por onde a
543 veia porta e a artéria hepática penetram no órgão e por onde saem os ductos
544 hepáticos e linfáticos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). A cápsula de Glisson
545 ramifica-se enviando uma rede de septos para o parênquima hepático,
546 dividindo em suas unidades básicas, os lóbulos hepáticos (SEELEY;
547 STEPHENS; TATE, 2003). Em alguns animais, como o porco, os lóbulos são
548 separados entre si por uma nítida faixa de tecido conjuntivo, o que não
549 acontece em humanos nem em ratos, nos quais vários lóbulos se encostam
550 uns nos outros em quase toda sua extensão. No entanto, em algumas regiões
551 periféricas de tais lóbulos existe tecido conjuntivo contendo ductos biliares,
552 vasos linfáticos, vasos sanguíneos e nervos, sendo essas regiões chamadas

553 de espaço porta (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Os lóbulos são estruturas
554 prismáticas e poligonais de tecido hepático, formado por placas de hepatócitos
555 (células epiteliais que compreende 60% do tecido hepático), interdigitados
556 entre os capilares sinusóides. Cada placa tem geralmente duas células
557 (hepatócitos) de espessura e se irradiam a partir das veias centrais
558 (STEPHENS; TATE, 2003; GARTNER; HIAT, 2007). Os sinusóides são vasos
559 sanguíneos de diâmetro reduzido que formam uma rede altamente
560 anastomosada que separa uma placa hepática da outra e é pela qual o sangue
561 dos vasos interlobulares é transportado (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2003. Eles
562 são revestidos por células endoteliais sinusoidiais e por macrófagos chamados
563 de células de Kupffer. Entre os hepatócitos e os sinusóides, encontram-se um
564 espaço estreito, denominado espaço de Disse, onde se localizam as células
565 estreladas hepáticas (FRIEDMAN, 2008). Entre os cordões de hepatócitos
566 encontram-se, ainda, pequenos canais designados canalículos biliares, que
567 transportam a bile até ao sistema porta, para que ocorra a sua excreção
568 através dos canais hepáticos aí localizados (SEELEY; STEPHENS; TATE,
569 2003). As células de Kupffer são macrófagos que apresentam intensa atividade
570 fagocitária com capacidade para metabolizar eritrócitos velhos, digerir
571 hemoglobina, secretar proteínas relacionadas com o processo imunitário,
572 destruir bactérias e outros patógenos que penetrem no sangue portal e
573 produção de bilirrubina (SHERLOK; DOOLEY, 2004). As Células Estreladas
574 Hepáticas (CEH) ou Células de Ito correspondem a 15% do total de células do
575 fígado e 30% das células não parenquimatosas (BITENCOURT et al, 2012). No
576 fígado normal, as CEHs encontram-se em sua forma quiescente, não-
577 proliferativa, armazenadora de vitamina (ENG; FRIEDMAN, 2000; GEERTS,
578 2001). Durante a lesão hepática, as CEHs perdem seu conteúdo lipídico e
579 transdiferenciam-se em células com características de miofibroblastos e
580 adquirem propriedades fibrogênicas (LEE et al, 2003; KONG et al, 2012),
581 depositando uma matriz fibrilar no espaço subendotelial (FRIEDMAN;
582 ARTHUR, 2002).

583 O principal efeito da terapia com corticoides é a esteatose hepática
584 (lipidose) e hepatomegalia, porém isso geralmente não é clinicamente
585 aparente, sendo rapidamente reversível com a descontinuação da terapia.

586 Altas doses e uso prolongado de corticoides têm sido associados ao
587 desenvolvimento ou exacerbação de esteato-hepatite não alcoólica (uma
588 condição que, mesmo se for causada pelos corticoides, pode demorar a ser
589 curada) com elevação nos níveis de aminotransferase sérica e histologia
590 hepática semelhante à hepatite alcoólica com esteatose, inflamação crônica,
591 degeneração em balão centrolobular e Corpúsculos de Mallory (FREITAS;
592 SOUZA, 2007; WOODS et al., 2015).

593 Efeitos diretos dos GC na resistência à insulina ou no metabolismo de
594 ácidos graxos ou pode ser o resultado de ganho de peso, que é comum em
595 terapias de corticoides de longo tempo. É interessante destacar que um estudo
596 publicou que a interrupção do funcionamento de receptores hepáticos de GC
597 aumenta a expressão do gene HES1 em ratos e provoca uma melhora da
598 esteatose nesses animais. Por outro lado, quando houve o tratamento de ratos
599 normais por cortisol, o nível de HES1 hepático diminuiu e o nível de
600 triglicerídeos aumentou, sugerindo que a indução de esteatose hepática em
601 humanos por corticoides poderia acontecer por conta destes fatores (LEMKE,
602 et al., 2008; WOODS et al., 2015).

603

604 **2.5 Estrógeno**

605

606 Dentre as alternativas para minimizar os efeitos colaterais dos GC temos
607 o estrógeno, sabe-se que ele atua na remodelação óssea, porém por
608 mecanismos ainda não totalmente elucidados. A presença de receptores para
609 estrógeno em células ósseas, hepáticas e renais sugere efeito direto desse
610 hormônio sobre esses órgãos (OH; KIM; CHUNG, 2008; KAMANGA-SOLLO et
611 al., 2017). Podendo ser uma boa alternativa para minimizar os efeitos da
612 corticoterapia.

613 Os estrógenos são hormônios que produzem numerosas ações
614 fisiológicas, incluindo efeitos no desenvolvimento, ações neuroendócrinas
615 envolvidas no controle da ovulação, preparo cíclico do trato reprodutor para
616 fertilização e implantação da célula ovo e ações no metabolismo de minerais,
617 carboidratos, proteínas e lípidios (COMPSTON, 2001).

618 O uso terapêutico dos estrógenos é disseminado, sendo comumente
619 utilizados na reposição hormonal após a menopausa e na anticoncepção
620 (KAMANGA-SOLLO et al., 2017). O estrógeno mais potente de ocorrência
621 natural nos seres humanos é o 17- β -estradiol, seguido pela estrona e estriol
622 (principal forma de excreção do hormônio).

623 Os ovários são a principal fonte de estrógeno circulante. O principal
624 produto secretório é o estradiol, sintetizado pelas células granulosas a partir de
625 precursores androgênicos (androstenediona ou testosterona), proporcionados
626 pelas células da teca interna (KAMANGA-SOLLO et al., 2017). Os hormônios
627 sexuais têm importante papel no crescimento ósseo e na manutenção do pico
628 de massa óssea (ALEXANDER; IRVING; HARVEY, 2017). Existem claras
629 evidências de que a diminuição ou ausência de estrógenos leva a progressiva
630 redução da massa óssea. Assim, na ooforectomia em jovens, ou na
631 menopausa precoce, pode-se observar acelerada perda óssea com instalação
632 mais rápida da osteoporose (COMPSTON, 2001). Os estrógenos possuem
633 variadas atuações, entre elas o crescimento, a diferenciação e a função de
634 muitos tecidos. Os mecanismos pelos quais esse hormônio age não estão
635 completamente claros, mas sabe-se que seu mecanismo de ação envolve
636 interação entre uma molécula ligante e um receptor (ALEXANDER; IRVING;
637 HARVEY, 2017).

638 A presença de receptores estrogênicos em osteoblastos ou em células de
639 linhagem osteoblástica foi descrita por Eriksen et al. (1988), que detectaram
640 receptores funcionais de estrógeno em células ósseas humanas, e por Komm
641 et al. (1988), que encontraram diversos locais de ligação do estrógeno em
642 núcleos de células de ratas. Ambos os trabalhos relataram a presença de RNA
643 mensageiro (RNAm) estrogênico em cada população de células óssea
644 estudadas.

645 Em mulheres na pré-menopausa e não grávidas, os estrógenos são
646 primariamente sintetizados nos ovários, utilizando o colesterol como precursor
647 (ÖSTERLUND et al., 2001). Mas sua síntese, tanto em mulheres como em
648 homens, ocorre também localmente em tecidos não-endócrinos, tais como
649 fígado, tecido adiposo e cérebro, através da conversão do hormônio masculino

650 testosterona em estradiol sob ação da enzima conversora aromatase (BEHL,
651 2003).

652 A maior parte dos hormônios são peptídeos que, devido à sua estrutura,
653 não podem atravessar a membrana celular, como por exemplo, a insulina.
654 Seus receptores estão localizados na superfície externa das células. Os
655 hormônios esteróides, como o estradiol, possuem características lipofílicas,
656 sendo, portanto, capazes de atravessar facilmente as membranas celulares.
657 Seus receptores são encontrados intracelularmente, tendo sido descritos dois
658 tipos de receptores estrogênicos, receptores α e β (ER- α e ER- β)
659 (ÖSTERLUND et al., 2001). Estes receptores específicos encontram-se no
660 citoplasma e no núcleo da célula, funcionando como fatores de transcrição
661 ligante-ativados, possuindo acesso direto ao DNA celular, inclusive nos
662 neurônios (WISE, 2002).

663

664 **2.6 Indicadores bioquímicos**

665

666 • **Fígado**

667

668 Um conjunto de testes e medidas bioquímicas são rotineiramente
669 realizado em laboratórios clínicos em amostras de plasma ou soro. Este grupo
670 de testes comumente incluem as medidas de: transaminases, aspartato
671 aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT); fosfatase alcalina
672 (FA), gama glutamil transferase (GGT), albumina (ALB) e bilirrubina (BAYNES,
673 DOMINICZAK, 2007).

674 Esses testes bioquímicos fornecem informações sobre o estado do fígado
675 do paciente, sendo um método muito útil para o reconhecimento das doenças
676 que afetam a funcionalidade hepática (GOMES et al., 2008) uma vez que, a
677 maioria das proteínas plasmáticas são sintetizadas no fígado e as doenças
678 hepatocelulares podem alterar a síntese proteica, tanto quantitativamente
679 quanto qualitativamente (BAYNES, DOMINICZAK, 2007). Entretanto, algumas
680 enzimas não são órgão-específicas, ou seja, estão presentes em vários
681 tecidos do organismo, elevam-se mais frequentemente em pacientes com

682 doença hepática, podendo refletir dano ao fígado (PRATT; KAPLAN, 1999),
683 razão pela qual, vários autores as denominam enzimas hepáticas.

684 As AST e a ALT não são específicas do fígado. A AST pode ser
685 encontrada no músculo cardíaco, rins, cérebro e hemácias (GIANNI; TESTA;
686 SAVARINO, 2005). Já a ALT, pode ser encontrada em outros locais como
687 músculo, coração, rins, cérebro e tecido adiposo, porém, com fração muito
688 maior no fígado (SCHINDHELM et al., 2006). No entanto, elas estão
689 relacionadas com a integridade dos hepatócitos e quando ocorrem lesões ou
690 destruição das células hepáticas, há liberação destas enzimas para a
691 circulação sanguínea, sendo que a sua localização auxilia o diagnóstico e
692 prognóstico de patologias hepáticas (MOTTA, 2000).

693 No fígado a AST encontra-se presente, em torno de 80%, na mitocôndria
694 e ALT no citoplasma (MOTTA, 2009). Assim, em dano hepatocelular leve a
695 forma predominante no soro é a citoplasmática, enquanto em lesões graves há
696 liberação da enzima mitocondrial, elevando a relação AST/ALT (MOTTA,
697 2000). Além disso, ambas estão envolvidas na interconversão de amino e
698 cetoácido, sendo necessárias para o metabolismo hepático do nitrogênio e
699 carboidratos (BAYNES, DOMINICZAK, 2007). Assim, tanto o aumento de AST
700 quanto de ALT confirma a origem hepática da lesão (MINUK, 1998; BAYNES,
701 DOMINICZAK, 2007).

702 A FA é uma enzima responsável pelo transporte de metabólitos através
703 das membranas celulares. Ela não é específica do fígado (BAYNES,
704 DOMINICZAK, 2007), sendo sintetizada tanto pelo trato biliar como pelos
705 ossos, placenta e em menor quantidade no intestino delgado (GIANNI; TESTA;
706 SAVARINO, 2005). No entanto, patologias do fígado e dos ossos são a causa
707 mais comuns de elevação dos valores da FA (DUFOUR et al., 2000, LOOMBA,
708 2013). Entretanto, para se certificar que a elevação dessa enzima é de origem
709 hepática, há necessidade de se dosar em conjunto com a GGT, que
710 provavelmente mostrará elevada se houver distúrbio hepático (MINCIS;
711 MINCIS, 2007).

712 A GGT é uma enzima que possui como função, catalisar a transferência
713 de aminoácidos e peptídeos através das membranas celulares, síntese proteica

714 e peptídica e regulação dos níveis teciduais de glutathione (MOTTA, 2009). Ela
715 está presente nos hepatócitos, nas células do epitélio biliar, nos túbulos renais,
716 pâncreas e intestino (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005; MANNING;
717 AFDAHAL, 2008). Porém, a sua atividade plasmática provém maioritariamente
718 do fígado, onde se localiza no epitélio dos canalículos biliares (DUFOUR et al.,
719 2000; LOOMBA, 2013). Assim, seus níveis se elevam em situações onde os
720 ductos biliares intra-hepáticos estão comprometidos, podendo avaliar a função
721 hepatobiliar (MOTTA, 2009).

722 Sua utilização como teste de função hepática é justificada por ser um
723 marcador de fibrose progressiva, sendo importante para identificar estágios
724 mais avançados da doença, pois reflete anormalidades da estrutura e da
725 função hepática. É um indicador de colestase mais específica do que a FA e a
726 sua alta concentração plasmática é característica da cirrose. Os níveis
727 plasmáticos aumentados de FA e GGT indicam origem hepatobiliar da lesão
728 (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005; MANNING; AFDAHAL, 2008).

729 Além das enzimas já citadas, a ALB e a bilirrubina também são
730 rotineiramente realizadas em laboratórios clínicos em amostras de soro e
731 plasma (BAYNES, DOMINICZAK, 2007). A ALB é uma proteína usualmente
732 utilizada em testes de função hepática, isso porque ela é a proteína mais
733 abundante no plasma, perfazendo um total de 50% das proteínas totais do soro
734 humano (SANTOS et al., 2004). Ela é sintetizada exclusivamente no fígado e
735 concentrações baixas no plasma ocorrem comumente na doença hepática
736 (BAYNES, DOMINICZAK, 2007). Ela desempenha papel importante na
737 manutenção do equilíbrio ácido-básico do organismo, no transporte de uma
738 ampla variedade de substâncias fisiológicas, também serve como sítio de
739 ligação para muitas drogas, além de atuar como um reservatório de
740 aminoácidos (SANTOS et al., 2004).

741 O fígado também sintetiza a maioria das globulinas (GLOB). A
742 concentração plasmática dessas GLOB modifica-se nas hepatopatias e
743 doenças sistêmicas (BAYNES, DOMINICZAK, 2007). A GLOB juntamente com
744 a ALB compõe a proteína plasmática total (PPT) (BANKS, 1992).

745 A bilirrubina é um produto da degradação da hemoglobina, mais
746 precisamente do grupo heme, ocorrida no baço. A bilirrubina, que é insolúvel,
747 circula ligada à albumina até atingir o fígado onde, é conjugada com ácido
748 glucorónico, tornando-se solúvel e possível de eliminar através da bile
749 (HOULIHAN; ARMSTRONG; NEWSOME, 2011). Em indivíduos saudáveis, a
750 bilirrubina conjugada encontra-se ausente da circulação sanguínea (DUFOUR
751 et al., 2000; GILMORE; GARVEY, 2013).

752 Diversas conclusões podem ser obtidas através de análises laboratoriais.
753 Entretanto, mesmo na presença de graves lesões hepáticas, a função hepática,
754 em especial as dosagens séricas dos marcadores de função hepática, pode
755 mostrar-se inalterada (BORGES, 1998). Dessa forma, a avaliação da função e
756 lesão hepáticas não deve incluir apenas essas dosagens e deve ser sempre
757 correlacionada com a clínica do paciente (SCHINONI, 2006).

758

759 • **Rim**

760

761 Outro órgão que normalmente é afetado em condições patológicas
762 hepáticas é o rim. A vasodilatação sistêmica que apresenta no quadro de
763 cirrose, decorrente da super produção de óxido nítrico, reduz a perfusão dos
764 rins, e ativa sistemas vasoconstritores renais (GARCIA-TSAO; PARIKH;
765 VIOLA, 2008). Além disso, a imunodepressão aumenta a chance de ocorrer
766 doenças infecciosas (WASMUTH et al., 2005), que podem agravar a
767 vasodilatação sistêmica e precipitar injúria renal aguda. Segundo Garcia-Tsao,
768 Parikh; Viola (2008), a injúria renal aguda ocorre em aproximadamente 19%
769 dos pacientes hospitalizados com insuficiência hepática, aumentando o risco
770 de morte na cirrose.

771 Ainda devemos ressaltar que eliminação de fármacos, decorrentes da
772 desintoxicação pelos hepatócitos, ocorrem por via biliar ou por via renal, após
773 passagem pela circulação sanguínea no último caso. Este processo é muito
774 importante para o metabolismo e eliminação de fármacos, assim como dos

775 seus metabolitos (SEELEY; STEPHENS; TATE, 2003), esse fato,
776 consequentemente, pode acarretar em nefrotoxicidade (DEKANT, 2001).

777

778 • **Ossos**

779

780 Nas doenças em que o osso está marcadamente acometido, os
781 marcadores menos específicos, menos sensíveis, mais baratos e mais
782 facilmente disponíveis (cálcio, fosfato e magnésio) mostram-se efetivos no
783 auxílio diagnóstico e acompanhamento destes casos (SARAIVA;
784 LAZARETTICASTRO, 2002). A falta de especificidade destes marcadores
785 tradicionais levou seu uso a ser restrito ao estudo de patologias ósseas onde
786 as alterações são muito marcadas, como, por exemplo, a doença de Paget e a
787 osteoporose.

788 Avanços recentes no isolamento e caracterização das células e dos
789 componentes extracelulares da matriz óssea, resultaram no desenvolvimento
790 de métodos para a medida sérica ou urinária de novos marcadores bioquímicos
791 do metabolismo ósseo. Podemos definir marcadores bioquímicos do
792 metabolismo ósseo como substâncias que retratam a formação ou a
793 reabsorção óssea. Como a formação é dependente da ação dos osteoblastos,
794 os marcadores de formação, na realidade, medem produtos decorrentes da
795 ação destas células; da mesma maneira, os marcadores de reabsorção medem
796 a ação dos osteoclastos, o principal tipo celular envolvido na reabsorção da
797 matriz óssea. Consequentemente, no caso dos marcadores de formação, são
798 todos frutos da síntese osteoblástica, enquanto os de reabsorção são produto
799 da atuação do osteoclasto sobre a matriz óssea (VIEIRA, 2007).

800 Entre os marcadores de formação óssea estão a fosfatase alcalina óssea,
801 que é secretada pelos osteoblastos e hidrólisa ésteres de fosfato, o que
802 provavelmente está envolvida no processo de calcificação (VIEIRA, 2007), e a
803 osteocalcina, uma proteína não colágena abundante no osso e dentina, possui
804 49aa e, embora sua função específica não seja conhecida, sabe-se que é

805 sintetizada predominantemente pelos osteoblastos diferenciados, incorporada à
806 matriz óssea extracelular e relacionada à mineralização da matriz osteóide.

807 Entre os marcadores de reabsorção óssea estão a deoxipiridinolina livre
808 (expressa em razão da creatinina urinária), a fosfatase ácida tartarato-
809 resistente, os telopeptídeos das ligações cruzadas de colágeno tipo I, como o
810 C- telopeptídeo, sendo bastante utilizado atualmente devido a sua
811 especificidade (HENRY, 2008; VIEIRA, 2007).

812

813 **2.7. Resposta inflamatória, imunomodulação e apoptose**

814

815 A ação dos glicocorticoides no sistema imune ocorre em vários pontos,
816 culminando com o desvio da resposta para um padrão T helper2, com
817 características antiinflamatórias dependentes do aumento de citocinas como
818 IL1, IL4, IL5, IL6, IL10, IL13 e o fator estimulante de colônias provenientes de
819 granulócitos e macrófagos (GMSF). São capazes de inibir citocinas pró-
820 inflamatórias, como IL2 e IL12, o interferon gama (INF γ) e o fator de necrose
821 tumoral alfa (TNF α) (DAMIANI, et al., 2004).

822 A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina com atuação tanto na resposta
823 imune inata como na adaptativa. Ela é sintetizada por monócitos, células
824 endoteliais, fibroblastos e outras células em resposta a microrganismos e
825 também à estimulação por outras citocinas, principalmente interleucina-1 (IL-1)
826 e fator de necrose tumoral (TNF-alfa). A IL-6 se constitui em importante
827 marcador inflamatório. É uma citocina envolvida numa série de atividades
828 imunológicas, em especial a síntese de substâncias de fase aguda pelo fígado,
829 estando envolvida na regulação metabólica da própria PCR. Tal como o seu
830 receptor (gp130), é amplamente expressa durante a reação inflamatória,
831 produzindo efeitos indesejáveis em vários órgãos. A IL-6 normalmente é
832 expressa em níveis baixos, exceto durante infecção, trauma ou outros fatores
833 estressantes. Entre os vários fatores que regulam a expressão do gene da IL-6,
834 estão o estrógeno e a testosterona (GOMES et al., 2009). Após a menopausa
835 ou andropausa, os níveis de IL-6 são elevados mesmo na ausência de
836 infecção, trauma ou estresse. A própria hiperglicemia característica da

837 intolerância à glicose tem relação com a síntese imediata de marcadores como
838 IL-6, com variações dos níveis séricos positivamente relacionados e com
839 aumentos mais significativos na hiperglicemia em pulsos, situação comum no
840 diabético (GOMES et al., 2009).

841 A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que atua aumentando a lipólise,
842 com inibição da lipase lipoprotéica (LPL) e aumento da liberação de ácidos
843 graxos livres e glicerol. Reduz a expressão do substrato do receptor de
844 insulina-1 (IRS-1) e GLUT-4 nos tecidos muscular e hepático. A IL-6 é a
845 principal citocina pró-coagulante, pois determina a produção e a elevação das
846 concentrações plasmáticas de fibrinogênio e em especial, da proteína C reativa
847 (FRANCISCO; HERNÁNDEZ; SIMÓ, 2006).

848 TNF- α é expresso por adipócitos e células do estroma vascular, incluindo
849 os macrófagos. Alguns estudos demonstram que seus níveis plasmáticos
850 possuem correlação positiva com os corticoides. Ele reprime a expressão de
851 genes envolvidos na captação e armazenamento de ácidos graxos livres e
852 glicose; suprime genes de fatores de transcrição envolvidos na lipogênese;
853 diminui a expressão da adiponectina e aumenta a da IL-6. No fígado, o TNF- α
854 suprime a expressão de genes envolvidos na captação de glicose e no
855 metabolismo e oxidação de ácidos graxos (RUAN et al. 2002). Tais citocinas
856 pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α , assim como citocinas anti-inflamatórias
857 como a IL-10 são amplamente sintetizadas no baço, considerado o maior órgão
858 linfóide do corpo e desempenha um importante papel no sistema imune do
859 hospedeiro (LAMAS; MARTÍNEZ; MARTI, 2004).

860 A reação de TUNEL é método confiável para detecção de apoptoses,
861 sobretudo quando confirmada por outro método, como a análise
862 morfológica (HUENTA et al., 2007).

863 A apoptose consiste, basicamente, de três estágios sucessivos: (1) o
864 comprometimento à morte provocado por sinais extras e intracelulares; (2)
865 execução da morte celular por ativação de proteases intracelulares; (3)
866 formação e remoção dos corpos apoptóticos por fagocitose, seguido da
867 degradação lisossomal pelas células fagocíticas (VAUX; STRASSER, 1996). O
868 mecanismo molecular de indução de apoptose pelos glicocorticoides é incerto.
869 Por outro lado, os GC diminuem a apoptose e aumentam a sobrevivência de

870 neutrófilos. Ao mesmo tempo, inibem o acúmulo de neutrófilos nos sítios da
871 inflamação (RAMAMOORTHY; CIDLOWSKI, 2016).

872 Os glicocorticoides são capazes de modular a proliferação celular
873 (LONGUI et al., 2005), pois reduzem a expressão do heterodímero c-myc, entre
874 outros fatores de transcrição que regulam a sobrevivência e multiplicação celular,
875 determinando a parada entre as fases G1 e S do ciclo celular. São também
876 capazes de induzir a morte celular pelo mecanismo de apoptose, culminando
877 com a ativação de proteínas com ação nuclear envolvidas na degradação do
878 DNA, do RNA e de outras proteínas estruturais da célula (LONGUI, 2007;
879 SERRA; ROGANOVICH; RIZZO, 2012; KAMANGA-SOLLO, et al., 2017).

880 O avanço do conhecimento acerca dos mecanismos celulares e
881 moleculares de ação dos glicocorticóides tem contribuído de forma decisiva
882 para o desenvolvimento de associações que minimizem esses efeitos
883 colaterais e possuam alta eficácia antiinflamatória. Desta forma estudos são
884 necessários afim de analisar o estrógeno como alternativa para minimizar
885 efeitos adversos.

886

887 **3. REFERÊNCIAS**

888

889 ALEXANDER, A.; IRVING, A. J.; HARVEY, J. Emerging roles for the novel
890 estrogen-sensing receptor GPER1 in the CNS. **Neuropharm.** n. 113, p. 652-
891 660, 2017.

892 BARACHO, N. C. V.; PAULA, A. M.; FRANZINI – JÚNIOR, R.; SILVA, R. M. B.;
893 APPOLARI, B.; IRULEGUI, R. S. C. Avaliação da eficácia de administração de
894 dexametasona ou metilprednisolona para produzir osteoporose em ratas. **Rev.**
895 **Bras. Ciênc. Saúde**, v. 1, p. 1-7, 2011.

896 BAVARESCO, L.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A.M.O. Glicocorticóides: Usos
897 clássicos e emprego no tratamento do câncer. **Infarma**, v.17, p.58-60, n.7/9,
898 2005.

899 BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. K. H. **Bioquímica Médica**. Rio de Janeiro:
900 Elsevier, 2007. 716 p.

901 BAZSÓ, A.; SZAPPANOS, A.; PATÓCS, A. B.; GYULA POÓR, A. D.;
902 SHOENFELD, Y.; EMESE, K. The importance of glucocorticoid receptors in
903 systemic lúpus erythaematosus. A systematic review. **Autoimm. Ver.** v.14, p.
904 349–351, 2015.

905 BEHL, C. Estrogen can protect neurons: modes of action. **J. Steroid Biochem.**
906 **Biol.** v.83, p.195-197, 2003.

907 BOLANOWSKI, M.; HALUPCZOK, J.; JAWIARCZYK – PRZBYLOWSKA, A.
908 Pituitary disorders and osteoporosis. **Int. J. Endocrinol.** v. 1, p. 1-7, 2015.

909 BOZZINI, C.; CHMPING, G.; ALIPPIN, R. M.; BOZZINI, C. E. Effeect of
910 dexamethasone on mandibular boné biomechanics in rats during the growth
911 plase as assessed by bending test and perioheral quantitative computerized
912 tomography. **Acta Odontol. Catinoam.** v. 26, n. 1, p. 83-88, 2015.

913 BUTTGEREIT F.; SAAG K. G.; CUTOLO, M.; DA SILVA, J. A.; BIJLSMA, J. W.
914 The molecular basis for the effectiveness, toxicity and resistance to
915 glucocorticoids: focus on the treatment of rheumatoid arthistis. **Scand J.**
916 **Rheumatol.**, v. 34, n. 1, p. 14-21, 2005.

917 CALDAS, D.; SCHRANK, Y. Cushing syndrome after abusive use of a nasal
918 preparation containing dexamethasone: A case report. **Rev. Bras.**
919 **Otorrinolaring.** v. 67, n. 6, p. 868-871, 2001.

920 CHARMANDARI, E.; TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. Endocrinology of the stress
921 response. **Annu. Ver. Physiol.** v. 67, p. 259-84, 2005.

922 CHENG, Y.; WANG, W. L.; LIANG, J. J. Glucocorticoid-induced bone deleterious
923 effects through regulation EPH/ephrin expression in aged mice. **Int. J. of**
924 **Clinical Exp. Pathology.** v. 8, n. 1, p. 394-403, 2015.

925 clinical doses of antenatal betamethasone on nephron endowment and
926 glomerular filtration rate in adult sheep. **Reprod. Sci.** v. 17, p. 186–195, 2010.

927 COMPSTON, J. E. Sex steroids and bone. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 1,
928 p. 419-47, 2001.

929 CONSTANCIA, M.; ANGIOLINI, E.; SANDOVICI, I.; SMITH, P.; SMITH, R.;
930 KELSEY, G.; DEAN, W.; FERGUSON-SMITH, A.; SIBLEY, C.P.; REIK, W.;
931 FOWDEN, A. Adaptation of nutrient supply to fetal demand in the mouse
932 involves interaction between the Igf2 gene and placental transporter systems.
933 **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 102, p. 19219–19224, 2005.

934 CUSHING, H. The basophilic adenomas of the pituitary body and their clinical
935 manifestation. **Bull. Johns Hopkins Hosp.**, v. 50, p. 137-195, 1932.

936 DAMIANI, D.; DAMIANI, D.; KUPERMAN, H. O que se deve saber antes de

937 DICKINSON, H.; WALKER, D.W.; WINTOUR, E.M.; MORITZ, K. Maternal
938 dexamethasone treatment at midgestation reduces nephron number and alters
939 renal gene expression in the fetal spiny mouse. **Am. J. Physiol.-Regul. Integr.**
940 **Comp. Physiol.** v. 292, R453–R461, 2007.

941 DUFOUR, D. R.; LOTT, J. A.; NOLTE, F. S.; GRETCH, D. R.; KOFF, R. S.;
942 SEEFF, L. B. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance
943 characteristics of laboratory tests. **Clin. Chem.**, v. 46. n. 12, p. 2017-2049,
944 2000.

945 MINCIS, M.; MINCIS, R. Enzimas hepáticas: por que são importantes para o
946 estudo de patologias do fígado. **Prática Hosp.**, v. 51, p. 44-48, 2007.

947 ERIKSEN, E. F. et al. Evidence of estrogen receptors in normal human
948 osteoblas-like cells. **Science**, v. 241, p. 84-6, 1988.

949 FELIX, L. O efeito colateral de remédios de uso livre. 2006.

950 FINAMOR, L. P.; FINAMOR JR, F.; MUCCIOLI, C. Corticoterapia e Uveítes.
951 **Arq. Bras. Oftalmol.** v.65, n. 4, p. 123-125, 2002.

952 FREITAS, T. H. P.; SOUZA, D. A. F. Costicosteróides sistêmicos na prática
953 dermatológica. Parte I – Principais efeitos adversos. **Anais Brasil.**
954 **Dermatolog.** v. 82, n. 1, p. 63-70, 2007.

955 FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. Farmacologia clínica: Fundamentos da
956 Terapêutica **Racional**. v. 4. p.194-201, 1998.

957 FUGLSANG, J., OVESEN, P. Aspects of placental growth hormone physiology.
958 **Growth Horm. IGF Res.** 16, 67–85, 2006.

959 GARCIA-TSAO, G.; PARIKH, C. R.; VIOLA, A. Acute kidney injury in cirrhosis.
960 **Hepatol.**, v. 48, n. 6, p. 2064-2077, 2008.

961 GIANNINI, E. G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide
962 for clinicians. **Canad. Med. Assoc. J.**, v. 172, n. 3, p. 367-379, 2005.

963 glucocorticoid sensitivity and the renin-angiotensin system. **Hypertension.** v.
964 50, p. 579–584, 2007.

965 GOMES, B. C.; ESTEVES, C. T.; PALAZZO, I. C.; DARINI, A. L.; FELIS, G. E.;
966 SECHI, L. A.; FRANCO, B. D.; DE MARTINIS, E. C. Prevalence and
967 characterization of Enterococcus spp. isolated from Brazilian foods. **Food**
968 **Microbiol.**, v. 25, n. 5, p. 668-675, 2008.

969 GOY-THOLLOT, I.; PECHEREAU, D.; KEROACK, S.; DEZEMPTE, J.C.;
970 BONNET, J.M. Investigation of the role of aldosterone in hypertension
971 associated with spontaneous pituitary-dependent hyperadrenocorticism in dogs.
972 **J. Small Anim. Pract.** v. 43, p. 489–492, 2002.

973 GUREVITZ, S.L.; SNYDER, J.A.; WESSEL, E.K.; FREY, J.; WILLIAMSON, B.A.
974 Systemic lupus erythematosus: a review of the disease and treatment options.
975 **Consult Pharm.** n. 28, v. 2, p. 110-121, 2013.

976 GUTIÉRREZ-POLO, R. Glucocorticoid-induced osteoporosis. **Na. Sist. Navar.**,
977 v. 26, p. 63-80, 2003.

978 HADDAD, J. J.; SAADÉ, N. E.; SAFIEH-GARABEDIAN, B. Cytokines and
979 neuro-immune-endocrine interaction: a role for the hypothalamic-pituitary-drenal
980 revolving axis. **J. Neuroimmunol.**, v. 133, n. 2, p. 1-19, 2002.

981 HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. Farmacologia Ilustrada. Porto Alegre: **Artmed**, p.
982 272-277, 1998.

983 HOULIHAN, D. D.; ARMSTRONG, M. J.; NEWSOME, P. N. Investigation of
984 jaundice. **Med.**, v. 39, n. 9, p. 518-522, 2011.

985 IZZO, A. A.; ERNST, E. Interactions between herbal medicines and prescribed
986 drugs: a systematic review. **Drugs.**, v. 61, p. 2163-2175, 2001.

987 KAMANGA-SOLLO, E.; THORNTON, K. J.; WHITE, M. E.; DAYTON, W. Role
988 of G protein-coupled estrogen receptor-1 in estradiol 17b-induced alterations in
989 protein synthesis and proteindegradation rates in fused bovine satellite cell
990 cultures. **Domest. Animal Endocrinol.** n. 58, p. 90-96, 2017.

991 KATZUNG, B. G. Farmacologia Básica & Clínica. Rio de Janeiro: **Guanabara**
992 KOMM, B. S. et al. Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in
993 osteoblast-like osteosarcoma cells. **Science**, v. 241, n. 4681, p. 81-3, 1988.
994 **Koogan**. p. 300. p. 574-587, 2003.

995 LEMKE U.; KRONES-HERZIG, A.; DIAZ, M. B.; NARVEKAR, P.; ZIEGLER, A.;
996 VEGIOPOULOS, A.; CATO, A.; BOHL, S.; KLINGMÜLLER, U.; SCREATON, R,
997 A.; MÜLLER-DECKER, K.; KERSTEN, S.; HERZIG, S. The Glucocorticoid
998 Receptor Controls Hepatic Dyslipidemia through Hes1. **Cell Metabolism.** v. 8,
999 n. 3, p. 212-215, 2008.

1000 LONGUI, C. A. Glucocorticoid therapy: minimizing side effects. **J. Pediatr.** v.
1001 83, p. 163-171, 2007.

1002 MANNING, D.; AFDHAL, N. Diagnosis and quantitation of fibrosis.
1003 **Gastroenterol.**, 134, n. 6, p. 1670-1681, 2008.

1004 MARTINS, J.P.C.; MONTEIRO, J.C.; PAIXAO, A.D.O. Renal function in adult
1005 rats

1006 MINUK, G. Y. Canadian Association of Gastroenterology Practice Guidelines:
1007 evaluation of abnormal liver enzyme tests. **Can. J. Gastroenterol.**, v. 12, n. 6,
1008 p. 417-421, 1998.

1009 MORITZ, K.M.; JOHNSON, K.; DOUGLAS-DENTON, R.; WINTOUR, E.M.;
1010 DODIC, M.; Maternal glucocorticoid treatment programs alterations in the renin–
1011 angiotensin system of the ovine fetal kidney. **Endocrinology**. v. 143, p. 4455–
1012 4463, 2002.

1013 MOSCA, M.; TANI, C.; CARLI, L.; BOMBARDIERI, S. Glucocorticoids in
1014 systemic lupus erythematosus. **Clin Exp Rheumatol**. n. 29, v. 5, p. 126-129,
1015 2011.

1016 MOTTA, V. T. Bioquímica clínica: princípios e interpretações. 5ª ed. Medbook,
1017 2009.

1018 MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica: princípios e interpretações**. Editora:
1019 Médica Massau, vol. 9, 2000.

1020 NOVELLAS, R.; DE GOPEGUI, R.R.; ESPADA, Y. Determination of renal
1021 vascular resistance in dogs with diabetes mellitus and hyperadrenocorticism.
1022 **Vet Rec**. n.15, v. 20, p. 592-596, 2008.

1023 OH, S. M.; CHUNG, K. H. Estrogenic activities of *Ginkgo biloba* extracts. **Life**
1024 **Sci.**, v. 74, n. 11, p. 1325-1335, 2008.

1025 ÖSTERLUND, M.K. AND HURD, Y.L. Estrogen receptors in the human
1026 forebrain and relation to neuropsychiatric disorders. Prog. **Neurobiol**.v.64,
1027 p.251-267, 2001.

1028 PEREIRA, A. L. C.; BOLZANI, F. C. B.; STEFANI, M.; CHARLIN, R. Uso
1029 sistêmico de corticosteroids: revisão de literature. **Med. Cutan. Iber Lat Am**. v.
1030 35, n. 1, p. 35-50, 2007.

1031 RHODUS, N.L.; CHENG, B.; BOWLES, W.; MYERS, S.; MILLER, L.; ONDREY,
1032 F. Proinflammatory cytokine levels in saliva before and after treatment of
1033 (erosive) oral lichen planus with dexamethasone. **Ora.l Dis**. v.12, n.2, p. 112-
1034 116, 2006.

- 1035 SAFIEH-GARABEDIAN, B.; DARDENNE, M.; PLÉU, J. M.; SAADÉ, N. E.
1036 Potent analgesic and anti-inflammatory actions of a novel thymulin- related
1037 peptide in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 136, n. 6, p. 947-955, 2002.
- 1038 SANTIAGO, T.; DA SILVA, J. A. Safety of glucocorticoids in rheumatoid
1039 arthritis: evidence from recent clinical trials. **Neuroimmunom.** v. 22, n. 1, p. 57–
1040 65, 2015.
- 1041 SANTOS, N. S. J.; DRAIBE, S. A.; KAMIMURA, M. A.; CUPPARI, L. Albumina
1042 sérica como marcador nutricional de pacientes em hemodiálise. **Rev. nutrição**,
1043 v. 17, n. 3, p. 339-349, 2004.
- 1044 SARAIVA, E. M.; SOARES, J.M.F.; GAVINA, C. Oscilações do cortisol na
1045 depressão sono-vigília. **Revista Portuguesa de Psicossomática.**v. 7, n. 1-2,
1046 p. 89-100, 2005.
- 1047 SCHIMMER, B. P.; PARKER, K. L. Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical
1048 steroids and their synthetic analogs; inhibitors of the synthesis and action of
1049 adrenocortical hormones. **Therapeutics.** v. 11, p. 1587-1612, 2007.
- 1050 SEELEY, R.R., STEPHENS, T.D., TATE, P. **Anatomy & Physiology.** In:
1051 Seeley et al.. (Ed.). Aparelho Urinário. 6ª Edição. McGraw-Hill Companies.
1052 2003, p. 990-992.
- 1053 SEGURO, L. P.; ROSARIO, C.; SHOENFELD, Y. Long-term complication of
1054 past glucocorticoid use. **Autoimmun Ver.** n. 12, v. 5, p. 629–632, 2013.
- 1055 SERRA HA, ROGANOVICH JM, RIZZO LF. Glucocorticoides: paradigma de
1056 medicina transnacional. De lo molecular al uso clínico. **Medicina (Buenos**
1057 **Aires)**. v. 72, n. 1, p. 158-170, 2012.
- 1058 SHANTHINI KASTURI, M.D.; SAMMARITANO, L. R. Corticosteroids in Lupus.
1059 **Rheum Dis Clin N Am.** n. 42, p. 47-62, 2016.
- 1060 SINHA, A.; SAHA, A.; KUMAR, M.; SHARMA, S.; AFZAL, K.; MEHTA, A.
1061 Extending initial prednisolone treatment in a randomized control trial from 3 to
1062 6 months did not significantly influence the course of illness in children with
1063 steroid-sensitive nephrotic syndrome. **Kidney Int.** v. 87, n. 1, p. 217–224, 2015.

1064 SORIANELLO, E.; SCHILLACI, R.; CHAMSON-REIG, A; LUX-LANTOS, V.;
1065 LIBERTUN, C. Actions of immunosuppressor drugs the development of an
1066 experimental ovarian tumor. **Exp. Biol. Med. (Maywood)**. v.227, n. 8, p. 658-
1067 664, 2002.

1068 SOUZA, M. C.; ASSEMANY, F. S.; LIMA, A. T. C.; SOUZA, R. F.
1069 Glicocorticoides e osteoporose – Artigo de revisão. **Rev. Ciênc. Med. Biol.**, v.
1070 9, supl. 1, p. 57-64, 2010.

1071 THIELE, K.; BUTTGEREIT, F.; ZINK, A. Current use of glucocorticoids in
1072 patients with rheumatoid arthritis in Germany. **Arthritis Rheum.**, v. 53, n. 5, p.
1073 740-74, 2005.

1074 VAN DER GOES, M. C.; JACOBS, J.W.; BIJLSMA, J. W. The value of
1075 glucocorticoid co-therapy in different rheumatic diseases—positive and adverse
1076 effects. **Arthritis Res Ther.** v. 16, p. 234-236, 2014.

1077 VAN RAALTE, D.H.; DIAMANT, M. Steroid diabetes: from mechanism to
1078 treatment? **Neth J Med.** v. 72, n.2, p. 62-72, 2014.

1079 VAN STAA, T. P.; LEUFKENS, H. G. M.; COOPER, C. The epidemiology of
1080 corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-analysis. **Osteoporos. Int.**, v. 13,
1081 p. 777-787, 2002.

1082 VAN STAA, T.P.; LEUFKENS, H. G. M.; ABENHAIM, L.; ZHANG, B.; COOPER,
1083 C. Oral corticosteroids and fractures risk: relationship to daily and cumulative
1084 doses. **Rheumatol.**, n. 39, p. 1383-1389, 2000.

1085 WASMUTH, H. E.; KUNZ, D.; YAGMUR, E.; TIMMER-STRANGHÖNER, A.;
1086 VIDACEK, D.; SIEWERT, E.; BACH, J.; GEIER A, PURUCKER EA,
1087 GRESSNER AM, MATERN S, LAMMERT F. Patients with acute on chronic liver
1088 failure display "sepsis-like" immune paralysis. **J. Hepatol.**, v. 42, n. 2, p. 195-
1089 201, 2005.

1090 WINTOUR, E.M.; MORITZ, K.M.; JOHNSON, K.; RICARDO, S.; SAMUEL,
1091 C.S.; DODIC, A. Reduced nephron number in adult sheep, hypertensive as a
1092 result of prenatal glucocorticoid treatment. **J. Physiol.-Lond.** V. 549, p. 929–
1093 935, 2013.

1094 WISE, P.M. Estrogens and neuroprotection. **Endocrinol. Metab.** v.13, n.6, p.
1095 229-230, 2002.

1096 WYRWOLL, C.S.; MARK, P.J.; WADDELL, B.J. Developmental programming of
1097 renal

1098 ZANETTE, E.; STRINGARI, F.; MACHADO, F.; MARRONI, B. J.; NG, D. P. K.;
1099 CANANI, L. H. Avaliação de diagnóstico densitométrico de
1100 Osteoporose/Osteopenia conforme o sítio ósseo. **Arq. Bras. Endocrinol.**
1101 **Metab.**, v. 47, n. 1, p. 30-36, 2003.

1102 ZHANG, J.; MASSMANN, G.A.; ROSE, J.C.; FIGUEROA, J.P. Differential
1103 effects of clinical doses of antenatal betamethasone on nephron endowment
1104 and glomerular filtration rate in adult sheep. **Reprod Sci.** n. 17, v. 2, p. 186-195,
1105 2010.

1106 ZIMANYI, M.A.; BERTRAM, J.F.; BLACK, M.J. Nephron number and blood
1107 pressure in rat offspring with maternal high-protein diet. **Pediatr. Nephrol.** v.17,
1108 p. 1000– 1004, 2002.

1109

CAPÍTULO II

1110

1111

1112

1113 **Ação estrogênica no tecido renal e hepático após corticoterapia prolongada**

1114

1115 Hilda Michelly Paiva dos Santos¹; Álvaro Aguiar Coelho Teixeira¹; Valéria Wanderley

1116

Teixeira¹ *

1117

1118 ¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia

1119

Animal, Recife, Brasil

1120

1121

1122 *Autor para correspondência: UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois

1123

Irmãos-Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389

1124

E-mail: valeria.wanderley@ufrpe.br (WANDERLEY-TEIXEIRA V.)

1125

1126 **RESUMO**

1127

1128 Os glicocorticoides são drogas amplamente usadas em função de seu amplo
1129 efeito no tratamento de doenças reumáticas e inflamatórias. Contudo, seu uso é muitas
1130 vezes limitado por numerosas reações adversas. O presente artigo teve por objetivo
1131 analisar a associação de estrógeno na corticoterapia prolongada sobre parâmetros
1132 histopatológicos, bioquímicos e imunohistoquímicos no fígado e rins em ratas. Para
1133 isso, foram utilizadas 35 ratas albinas, com 90 dias de idade, divididas nos seguintes
1134 grupos: I – ratas que receberam placebo; II - ratas submetidas à corticoterapia por 45
1135 dias; III - ratas submetidas à corticoterapia por 45 dias e tratadas simultaneamente com
1136 Alendronato de Sódio 0,2 mg/Kg por via intragástrica; IV - ratas submetidas à
1137 corticoterapia por 45 dias e tratadas simultaneamente com estrógeno 50mg/Kg por via
1138 subcutânea; V - ratas submetidas à corticoterapia por 45 dias adicionado estrógeno nos
1139 últimos 15 dias. A corticoterapia foi induzida por meio de injeções de 2mg/mL de
1140 Decadron®, por via intramuscular. A análise histopatológica revelou no fígado das ratas
1141 do grupo II alterações estruturais caracterizadas pela presença de nódulos multifocais no
1142 parênquima hepático, vacuolização celular difusa e congestão de sinusoides. O rim
1143 mostrou-se sem alterações histopatológicas, porém apresentou diminuição da área
1144 glomerular, área da cápsula de Bowman, volume glomerular e volume da cápsula de
1145 Bowman pela análise morfométrica. Ao final do tratamento (45° dia) os parâmetros
1146 bioquímicos avaliados permanecem aumentados apenas nas ratas do grupo II com
1147 exceção do HDL que permaneceu reduzido durante todo o período experimental. As
1148 marcações para IL-6 e TNF- α foram mais intensas nas ratas do grupo II tanto no fígado
1149 quanto nos rins. O índice de apoptose mostrou-se inalterado no fígado das ratas. Os rins
1150 das ratas do grupo III mostrou maior marcação para o teste de túnel. Com isso conclui-
1151 se que o estrógeno atua de forma protetora e reparadora contra os danos hepáticos e
1152 renais decorrentes da corticoterapia por período prolongado.

1153

1154

1155 **Palavras-chaves:** corticoterapia, estrógeno, fígado, rins, morfometria, bioquímica,
1156 imunohistoquímica, ratas.

1157

1158 **ABSTRACT**

1159 Glucocorticoids are drugs widely used because of their wide effect in the treatment of
1160 rheumatic and inflammatory diseases. However, its use is often limited by numerous
1161 adverse reactions. The present article aimed to analyze the association of estrogen in
1162 prolonged corticosteroid therapy on histopathological, biochemical and
1163 immunohistochemical parameters in the liver and kidneys in rats. For this, 35 albino
1164 rats, 90 days old, were divided into the following groups: I - rats that received placebo;
1165 II - rats submitted to corticosteroid therapy for 45 days; III - rats submitted to
1166 corticotherapy for 45 days and treated simultaneously with 0.2 mg / kg Sodium
1167 Alendronate intragastric; IV - rats submitted to corticotherapy for 45 days and treated
1168 simultaneously with estrogen 50mg / kg subcutaneously; V - rats submitted to
1169 corticotherapy for 45 days added estrogen in the last 15 days. Corticosteroids were
1170 induced by injections of 2 mg / mL Decadron® intramuscularly. Histopathological
1171 analysis revealed in the liver of the rats of group II structural alterations characterized
1172 by the presence of multifocal nodules in the hepatic parenchyma, diffuse cellular
1173 vacuolization and congestion of sinusoids. The kidney showed no histopathological
1174 changes, but showed a decrease in the glomerular area, Bowman's capsule area,
1175 glomerular volume and Bowman's capsule volume by morphometric analysis. At the
1176 end of the treatment (45th day) the biochemical parameters evaluated were only
1177 increased in the rats of group II with the exception of HDL that remained reduced
1178 throughout the experimental period. The markers for IL-6 and TNF- α were more intense
1179 in the rats of group II in both the liver and the kidneys. The rate of apoptosis was
1180 unchanged in the liver of the rats. The kidneys of the rats of group III showed greater
1181 marking for the tunnel test. With this, it is concluded that estrogen acts in a protective
1182 and reparative way against the hepatic and renal damages resulting from corticosteroid
1183 therapy for a prolonged period.

1184

1185 **Key words:** corticoterapia, estrogen, liver, kidneys, morphometry, biochemistry,
1186 imuhistochemistry, rats.

1187

1188

1189

1190 **1. INTRODUÇÃO**

1191

1192 Atualmente a terapia com glicocorticoides (GC), denominada corticoterapia, vêm
1193 sendo utilizada em diversas especialidades médicas, incluindo a dermatologia,
1194 endocrinologia, oncologia e oftalmologia (MOSCA et al., 2011), sendo tratamento
1195 indicado em casos como deficiência da suprarrenal (congenita ou adquirida), doenças
1196 reumáticas, renais, alérgicas, infecciosas, leucemias e linfomas, edema cerebral e
1197 trauma cervical (SEGURO; ROSARIO; SHOENFELD, 2013).

1198 Em contrapartida, diversos estudos relatam efeitos indesejáveis durante o
1199 tratamento, em geral associados ao tempo de duração e uso de GC de ação prolongada,
1200 incluindo, alteração da disposição de gordura (SERRA et al., 2012), disfunção
1201 hipofisária (RIZZO 2012), patologias no sistema renal (PEREIRA et al., 2007),
1202 alterações cardiovasculares (RIZZO 2012), alterações no sistema hematopoiético
1203 (DIAMANT 2014) e imunológico (RHODUS et al., 2006). Possuindo ainda atuação
1204 direta sobre o metabolismo ósseo e hepático (LONGUI 2007).

1205 O principal efeito da terapia com corticoides é a esteatose hepática (lipidose) ou
1206 hepatomegalia, porém isso não é clinicamente aparente, sendo rapidamente reversível
1207 com a descontinuação da terapia. Altas doses e uso prolongado de corticoides têm sido
1208 associados ao desenvolvimento ou exacerbação de esteato-hepatite não alcoólica (uma
1209 condição que, mesmo se for causada pelos corticoides, pode demorar a ser curada) com
1210 elevação nos níveis de aminotransferase sérica e histologia hepática semelhante à
1211 hepatite alcoólica com esteatose, inflamação crônica, degeneração em balão
1212 centrolobular e Corpúsculos de Mallory (FREITAS; SOUZA 2007; WOODS et al.,
1213 2015).

1214 Há também efeitos da corticoterapia sobre o tecido renal. Estudos realizados por
1215 Dickinson et al. (2007) utilizando dexametasona e betametasona por 15 dias mostraram
1216 que os GC estimulam angiotensina II, vasopressina, ACTH e receptor de leptina, bem
1217 como enzimas metabólicas, canais de Na⁺ epiteliais, Na⁺/K⁺ ATPase e transportadores
1218 de íons Na⁺/H⁺ e aquaporinas. Outros estudos demonstraram efeito como redução do
1219 número de néfrons nos animais que receberam dose de 0,2 mg prednisona diariamente,
1220 o que pode ocasionar um quadro de hipertensão na vida adulta (ZIMANYI et al., 2002,
1221 WINTOUR et al., 2003).

1222 Existem trabalhos na literatura que evidenciam a ação dos GC sobre o sistema
1223 imune, estudos indicam que seu uso provoca aumento de citocinas pró-inflamatórias
1224 como a IL-1, IL-6, IL-10 e do fator de necrose tumoral alfa (DAMIANI et al., 2004).
1225 Estudos realizados por Brasil e colaboradores (2000) evidenciam um aumento da IL-6 e
1226 TNF- α no nível plasmático de 86,6% dos pacientes que receberam corticoterapia em
1227 comparação ao grupo que não recebeu corticóides. Sabe-se ainda que os GC conseguem
1228 inibir a apoptose, porém por mecanismos não totalmente elucidados
1229 (RAMAMOORTHY; CIDLOWSKI, 2016).

1230 Tendo em vista a problemática da corticoterapia na saúde pública, pesquisas são
1231 necessárias para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que minimizem os
1232 efeitos colaterais decorrentes ao uso de GC. Nesse contexto, a reposição hormonal,
1233 principalmente pelo estrógeno, tem se destacado por atuar diretamente sobre diversos
1234 tecidos, possuindo receptores em células ósseas, renais e hepáticas mostrando assim ser
1235 boa alternativa para minimizar os efeitos da corticoterapia (OH; KIM; CHUNG, 2008;
1236 KAMANGA-SOLLO et al., 2017). Segundo a literatura, a associação de GC com outros
1237 fármacos em especial com outros anti-inflamatórios ou hormônios mais específicos,
1238 promovem efeitos sinérgicos que permitem diminuir a dose/tempo de corticoterapia e

1239 assim atenuar nos possíveis efeitos indesejados (LONGUI, 2007; PEREIRA et al.,
1240 2007; ERRANTE et al., 2014).

1241 Dessa forma, a presente pesquisa visou avaliar os efeitos da administração de
1242 estrógeno associado à corticoterapia prolongada sobre a histofisiologia renal e hepática,
1243 a fim de identificar uma estratégia de tratamento que reduza os efeitos indesejados
1244 nesses órgãos.

1245

1246 **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

1247

1248 *2.1 Animais e grupos experimentais*

1249

1250 Foram utilizadas 35 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar,
1251 com 90 dias de idade, pesando em torno de 200 ± 25 g, procedentes do Biotério do
1252 Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Universidade Federal Rural de
1253 Pernambuco. Esses animais foram mantidos em gaiolas, com alimentação e água *ad*
1254 *libitum*, na temperatura de 22 ± 1 °C e iluminação artificial que estabeleceram um
1255 fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o período de luz das
1256 06:00 às 18:00 h. As ratas foram divididas, ao acaso, em cinco grupos, cada um,
1257 constituído por 7 animais, a saber:

1258 **Grupo I** – ratas que receberam placebo (CONTROLE);

1259 **Grupo II** - ratas submetidas à corticoterapia com dexametasona por 45 dias
1260 (CONTROLE NEGATIVO);

1261 **Grupo III** - ratas submetidas à corticoterapia com dexametasona por 45 dias e
1262 tratadas com simultaneamente com alendronato de sódio 0,2 mg/Kg por via intragástrica
1263 (CONTROLE POSITIVO);

1264 **Grupo IV** - ratas submetidas à corticoterapia com dexametasona por 45 dias e
1265 tratadas simultaneamente com 50 mg/Kg de estrógeno (hexaidrobenzoato de estradiol);

1266 **Grupo V** - ratas submetidas à corticoterapia com dexametasona por 45 dias
1267 adicionado 50 mg de estrógeno (hexaidrobenzoato de estradiol) nos últimos 15 dias.

1268 O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética institucional, de
1269 nº. 083/2014.

1270

1271 2.2. *Corticoterapia*

1272

1273 A corticoterapia foi realizada nas ratas de todos os grupos experimentais, exceto
1274 no controle, através da injeção do glicocorticoide dexametasona (Decadron® - 2
1275 mg/mL, diluído em soro fisiológico) por via intramuscular, na dose de 2,0 mg/kg do
1276 peso corporal, diariamente, durante 45 dias. (GOUDOCHNIKOV; PETTENON 2001).

1277 As ratas do grupo controle receberam a mesma dose de soro fisiológico.

1278

1279 2.3. *Tratamento com estrógeno*

1280

1281 As injeções de estrógeno (hexaidrobenzoato de estradiol, diluído em óleo de
1282 amêndoas) foi administrado nas ratas dos grupos V e IV na dose de 50 mg por rata, via
1283 subcutânea, durante 45 e 15 dias respectivamente. (GOUDOCHNIKOV; PETTENON,
1284 2001).

1285

1286 2.4. *Administração de Alendronato de Sódio*

1287

1288 As ratas do grupo III foram submetidas ao tratamento de alendronato de sódio na
1289 dosagem de 0,2mg/Kg por via intragástrica, durante 45 dias.

1290

1291 2.5 *Análise Bioquímica*

1292

1293 Em cada grupo foram realizadas três coletas no 1°, 15° e 45° dia de tratamento.
1294 De cada coleta após contenção mecânica, foi retirado 1 mL de sangue de cada rata por
1295 meio da punção na veia caudal lateral com uso de cateter (24G). O sangue obtido foi
1296 acondicionado em microtubos com anticoagulante (heparina sódica - 20 µL),
1297 homogeneizado com delicadeza e mantido à temperatura ambiente. Para subsequente
1298 obtenção do plasma as amostras foram submetidas à centrifugação a uma temperatura
1299 de -4 °C com a velocidade de 3.000 rpm durante 10 minutos. As amostras de plasma
1300 foram mantidas em freezer -80 °C até o momento da dosagem.

1301 Foram avaliados os níveis plasmáticos de indicadores específicos de lesão
1302 hepática e renal como as enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato
1303 aminotransferase (AST), gama-glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (FA),
1304 albumina (ALB), colesterol, triglicérides, HDL, LDL, VLDL, ureia, creatinina e
1305 glicose. As amostras foram analisadas em triplicata e determinadas com o auxílio do
1306 analisador bioquímico Vet test 8008 (*Blood chemistry analyzer*).

1307

1308 2.6. *Análise histopatológica*

1309

1310 Sete ratas de cada grupo foram eutanasiadas por aprofundamento anésteico após
1311 os períodos experimentais. Para tanto, foram anestesiados com hidrocloridrato de
1312 cetamina (80 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg), por via intramuscular. Em seguida, procedeu-
1313 se à remoção do fígado e rins, os quais foram imersos em formol tamponado à 10%,
1314 permanecendo no mesmo por 24 horas. Após esse procedimento, os órgãos foram
1315 clivados e submetidos à técnica histológica de inclusão em parafina. A seguir, os blocos

1316 foram cortados, corados com Hematoxilina e Eosina (H.E) e Picrosirius para análise de
1317 rotina histopatológica e detecção de colágeno, respectivamente.

1318

1319 2.5. *Morfometria Renal*

1320

1321 A morfometria foi realizada através de aplicativo Morfometria de Linhas,
1322 calibrado em micrômetros, associado ao programa Optimas[®] 6.2 para Windows. Para a
1323 obtenção da área glomerular o cursor foi posicionado na área central deste,
1324 estabelecendo-se, a partir daí, uma linha circular externa, coincidente com os limites do
1325 tufo glomerular. Foi utilizada a mesma metodologia para a mensuração da cápsula de
1326 Bowman (AKAOKA; WHITE; RAAFAT 1994). O volume glomerular e da cápsula de
1327 Bowman, foi calculado de acordo com os critérios preconizados por Pagtalunan;
1328 Drachman; Meyer (2000). Para essa estimativa, foi utilizada a equação $4/3\pi r^3$,
1329 destinada ao cálculo do volume da esfera, na qual “r” representa o raio.

1330

1331 2.6 *Imunohistoquímica (IL6 e TNF- α)*

1332

1333 Para análise imunohistoquímica, as lâminas silanizadas foram desparafinizadas e
1334 reidratadas em xilol e álcoois. A recuperação antigênica foi realizada através de uma
1335 solução de tampão citrato (pH 8.0) em alta temperatura no micro-ondas por 5 minutos.
1336 A peroxidase endógena foi inibida através de uma solução de peróxido de hidrogênio
1337 (3%) em metanol. A reação antígeno-anticorpo inespecífica foi bloqueada através da
1338 incubação das lâminas em PBS e albumina sérica bovina (BSA) 5% durante uma hora.
1339 Todos os anticorpos (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) foram
1340 diluídos em PBS/BSA 1% por uma hora. Subsequentemente, as lâminas foram tratadas
1341 com o anticorpo secundário por trinta minutos. A reação antígeno-anticorpo foi

1342 observada através de um precipitado marrom após aplicação de 3,3 diaminobenzidina
1343 por quatro minutos e contra corados com hematoxilina. As imagens foram capturadas
1344 por meio de câmera de Vídeo Sony®, acoplada ao microscópio Olympus® Bx50, as
1345 quais foram submetidas ao aplicativo Gimp 2.0 para a quantificação por meio de
1346 Histograma RGB (Red-Green-Blue) (OBERHOLZER et al., 1996; LEE et al., 2001).

1347

1348 *2.7. Índice apoptótico*

1349 Para isso foi utilizado o método TUNEL como indicador de apoptose. Os cortes
1350 foram inicialmente desparafinados e hidratados e, logo em seguida, incubados em PBS
1351 (pH 7,4) por 5 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, a Proteinase K foi
1352 aplicada sobre as lâminas por 15 minutos. As lâminas foram lavadas em água destilada
1353 e incubadas em peróxido de hidrogênio por 5 minutos em temperatura ambiente. Os
1354 cortes foram lavados em PBS e incubados em tampão equilíbrio por 60 minutos a 4 °C.
1355 Depois, os cortes foram incubados em TdT a 37 °C por 1 hora em câmara úmida. Foi
1356 aplicada a solução stop por 10 minutos em temperatura ambiente, em seguida, as
1357 lâminas foram lavadas em PBS e incubadas em anti-digoxigenina. As lâminas foram
1358 enxaguadas em PBS e os cortes revelados com substrato cromogênico
1359 diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation™) (\pm 20 minutos), sendo contracorados com
1360 hematoxilina por 20 a 30 segundos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água
1361 corrente, desidratadas em concentrações crescentes de álcool e colocadas em xilol para
1362 serem montadas e observadas em microscópio de luz. O índice apoptótico foi
1363 determinado pela contagem da porcentagem de células positivas a partir de, pelo menos
1364 500 núcleos subdivididos em 10 campos escolhidos aleatoriamente utilizando-se a
1365 objetiva de 40X (WU et al., 2013)

1366

1367 *2.8. Análise estatística*

1368

1369 A análise estatística foi realizada em um programa computacional InStat®, onde
1370 dados foram avaliados por meio de testes não paramétricos de Kruskal-Wallis com post-
1371 hoc de Dunn ($p < 0,05$).

1372

1373 **3. RESULTADOS**

1374

1375 *3.1. Histopatologia*

1376

1377 O fígado das ratas do grupo controle apresentou parênquima hepático sem
1378 alterações com cordões de hepatócitos organizados margeando a veia centro lobular,
1379 entremeados por capilares sinusoides (Figura 1A). Entretanto, o fígado das ratas do
1380 grupo II observou-se alterações estruturais caracterizadas pela presença de nódulos
1381 multifocais no parênquima hepático (Figura 1B). Esses nódulos são revestidos por uma
1382 cápsula de tecido conjuntivo, camada de neutrófilos em processo degenerativo com
1383 núcleos hipersegmentados e área central com necrose (Figura 1C). No fígado das ratas
1384 dos grupos III a V, evidenciou-se discreta vacuolização celular difusa, congestão de
1385 sinusóides, além da presença de células inflamatórias mononucleares difusas e discreta
1386 lipidose (Figuras 1D, E e F).

1387 Os rins das ratas dos grupos submetidas à corticoterapia não mostraram alterações
1388 histopatológicas, apresentando todos os seus componentes estruturais bem definidos,
1389 constituindo-se de cápsula fibrosa, região cortical e medular (Figura 2). Observou-se
1390 cápsula de Bowman e espaço capsular bem diferenciado, além de glomérulos bem
1391 desenvolvidos.

1392

1393 *3.2. Morfometria renal*

1394 Através da análise morfométrica dos rins das ratas verificou-se que no grupo II
1395 houve uma diminuição da Área Glomerular (AG), Área da Cápsula de Bowman (ACB),
1396 Volume Glomerular (VG) e Volume da Cápsula de Bowman (VCB) quando comparado
1397 aos rins das ratas dos demais grupos experimentais (Tabela 1).

1398

1399 *3.2. Análise bioquímica*

1400

1401 As análises bioquímicas apresentaram-se sem alterações significativas, ao 1° dia
1402 de tratamento. Ao 15° dia as ratas do grupo II e V diferiram estatisticamente das demais
1403 ratas dos grupos experimentais em relação a todos os parâmetros avaliados,
1404 apresentando níveis séricos elevados de todos eles com exceção do HDL, onde houve
1405 uma redução, e da albumina que não foi observada diferenças significativas em relação
1406 aos demais grupos experimentais. Ao final do tratamento (45° dia) os parâmetros
1407 avaliados permaneceram aumentados apenas nas ratas do grupo II com exceção do HDL
1408 que permaneceu reduzido, diferindo dos demais grupos experimentais (Tabelas 2, 3 e
1409 4).

1410

1411 *3.3. Imunohistoquímica - IL6 e TNF- α*

1412

1413 A análise imunohistoquímica para o IL-6 hepático, mostrou uma maior expressão
1414 desse fator nas ratas do grupo induzido a corticoterapia sem tratamento. Os demais
1415 grupos experimentais não diferiram entre si. (Figura 3). O mesmo comportamento foi
1416 observado para os rins (Figura 4).

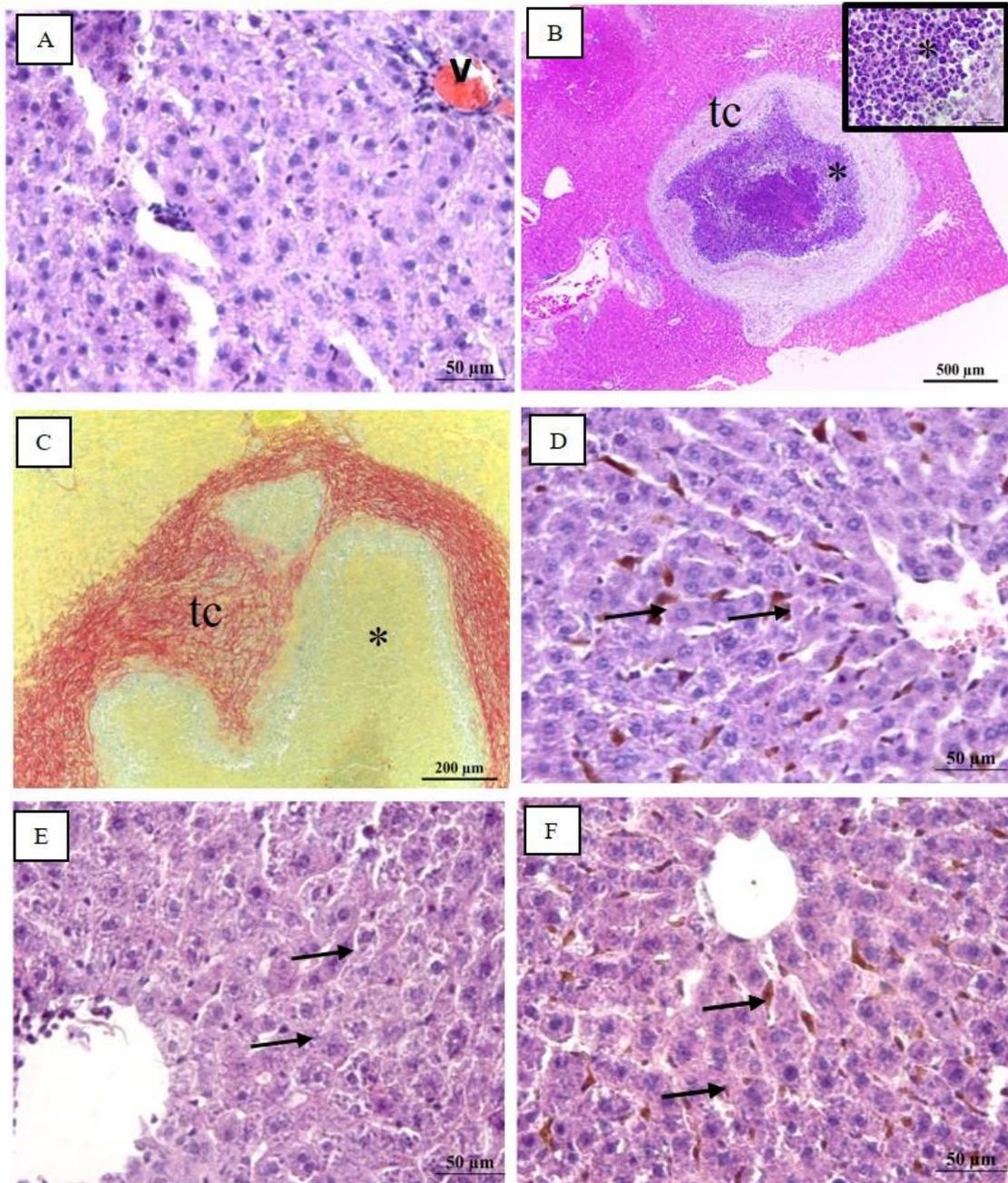
1417 A marcação do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) hepático e renal, mostrou
1418 elevada marcação no grupo II, diferindo dos demais grupos experimentais. Os demais
1419 grupos equipararam-se com o grupo controle. (Figuras 5 e 6).

1420

1421 *3.4. Índice apoptótico*

1422

1423 O índice apoptótico no fígado das ratas dos grupos experimentais não apresentou
1424 diferenças significativas (Figura 7). A marcação para a apoptose renal mostrou que as
1425 ratas do grupo III apresentaram aumento significativo, quando comparado aos outros
1426 grupos. Nos demais grupos esse índice não diferiu do controle (Figura 8).

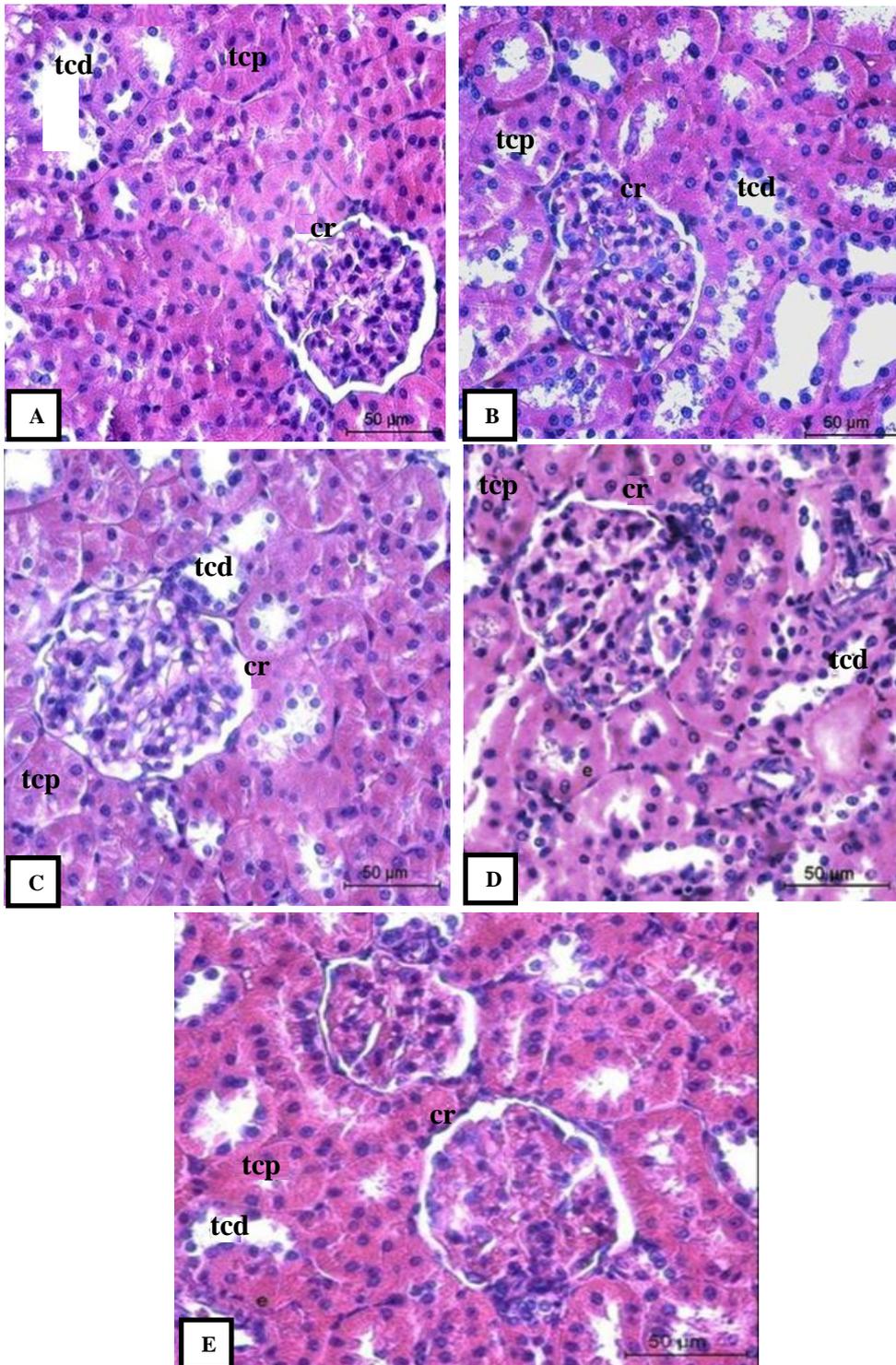


1427

1428 **Figura 1:** Fígado das ratas dos grupos experimentais. A – Controle - normal.
 1429 Coloração H.E.; B- induzidos à corticoterapia sem tratamento, observar detalhe dos
 1430 neutrófilos em processo de degeneração com presença de núcleos hipersegmentados.
 1431 Coloração H.E.; C – induzidos à corticoterapia sem tratamento, observar cápsula de
 1432 tecido conjuntivo – coloração Picrosirius. D – induzidos à corticoterapia +
 1433 alendronato de sódio simultâneo. Coloração H.E.; E – induzidos à corticoterapia +
 1434 estrógeno simultâneo; F – induzidos à corticoterapia + estrógeno últimos 15 dias

1435 Coloração H.E. V – veia centro lobular, tc – tecido conjuntivo, Asteristico –
1436 neutrófilos em processo degenerativo, Seta longa – congestão de sinusóides.

1437



1438

1439 **Figura 2:** Rim das ratas dos grupos experimentais. A – controle; B – induzidos à
 1440 corticoterapia sem tratamento; C – induzidos à corticoterapia + alendronato de sódio
 1441 simultâneo; D - induzidos à corticoterapia + estrógeno simultâneo; E - induzidos à
 1442 corticoterapia + estrógeno últimos 15 dias. tcd – túbulo contorcido distal; tcp – túbulo
 1443 contorcido proximal; cr – corpúsculo renal. Coloração H.E.

1444 **Tabela 1:** Média \pm desvio padrão da área glomerular (AG) e da capsula de Bowman
 1445 (ACB), do volume do glomérulo (VG) e da cápsula de Bowman (VCB) dos rins das
 1446 ratas dos grupos experimentais.

1447

Grupos Experimentais	AG(μm^2)	ACB(μm^2)	VG (μm^3)	VCB (μm^3)
I	15692,5000 \pm 1432a	21172,9096 \pm 1376a	1574027,22 \pm 1100a	1765132,14 \pm 1027a
II	10136,6100 \pm 1211b	12033,7655 \pm 1033b	1055317,65 \pm 1003b	1213442,11 \pm 1090b
III	15541,8594 \pm 1609a	21099,8123 \pm 1160a	1367859,01 \pm 1099a	1699756,00 \pm 1101a
IV	14332,7722 \pm 1471a	21235,3901 \pm 1249a	1446717,12 \pm 1119a	1787238,53 \pm 1200a
V	14475,6544 \pm 1332a	21266,7721 \pm 1088a	1500065,99 \pm 1212a	1678024,74 \pm 1199a
P	0,1606	0,0102	0,0413	0,0035

1448 Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si
 1449 pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

1450

1451 **Tabela 2:** Média das dosagens séricas das enzimas indicadoras da função hepática e renal, colesterol,
 1452 triglicerídeos e glicose nas ratas dos grupos experimentais, no primeiro dia de tratamento.

Grupos	G I	G II	G III	G IV	G V	P
Glicose (mg/dL)	146,00 ± 7,02a	137,00 ± 11,68a	139,70 ± 8,96a	138,30 ± 11,26a	139,70 ± 6,38a	0,9183
Albumina (g/dL)	3,80 ± 0,04a	3,43 ± 0,17a	3,47 ± 0,13 ^a	3,45 ± 0,09 ^a	3,39 ± 0,10a	0,2203
Colesterol (mg/dL)	84,67 ± 14,38a	91,67 ± 6,66a	100,70 ± 12,67a	84,33 ± 9,95 ^a	95,00 ± 9,29a	0,7228
Triglicerídeos (mg/dL)	197,00 ± 24,25a	166,00 ± 7,55a	170,00 ± 10,91a	158,00 ± 2,39 ^a	187,70 ± 11,68a	0,1870
HDL (mg/dL)	33,74 ± 4,69a	35,68 ± 2,95a	32,94 ± 3,59a	30,97 ± 1,70a	30,35 ± 3,84a	0,4640
LDL (mg/dL)	19,52 ± 2,45a	16,06 ± 3,19a	23,60 ± 3,90a	15,10 ± 4,01a	20,45 ± 5,58a	0,4290
VLDL (mg/dL)	39,40 ± 4,85a	33,27 ± 1,47a	34,13 ± 2,18a	31,60 ± 0,46a	37,53 ± 2,33a	0,1754
Uréia (mg/dL)	47,33 ± 4,25a	48,33 ± 4,91a	56,67 ± 4,25a	57,00 ± 4,19a	47,67 ± 5,78a	0,4609
Creatinina (mg/dL)	0,43 ± 0,06a	0,54 ± 0,03a	0,52 ± 0,03 ^a	0,48 ± 0,04a	0,50 ± 0,10a	0,2981
ALT (U/L)	51,33 ± 7,68a	58,67 ± 4,05a	52,67 ± 2,96a	56,00 ± 6,55a	45,33 ± 7,62a	0,6052
AST (U/L)	90,67 ± 14,44a	80,67 ± 13,33a	113,70 ± 12,17a	108,70 ± 14,19a	100,30 ± 11,05a	0,3496
GGT (U/L)	1,85 ± 0,37a	2,18 ± 0,37a	2,59 ± 0,34 ^a	2,22 ± 0,64a	1,51 ± 0,35a	0,4813
FA (U/L)	22,33 ± 5,36a	41,00 ± 14,43a	21,67 ± 5,66a	35,99 ± 16,50a	37,67 ± 12,91a	0,5371

1453 Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si pelo teste de
 1454 Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato
 1455 aminotransferase (AST), Gama-glutamil transferase (GGT), Fosfatase alcalina (FA).

1456

1457

1458 **Tabela 3:** Média das dosagens séricas das enzimas indicadoras da função hepática e renal,
 1459 colesterol, triglicerídeos e glicose nas ratas dos grupos experimentais, no décimo quinto dia de
 1460 tratamento.

Grupos	G I	G II	G III	G IV	G V	P
Glicose (mg/dL)	116,30 ± 6,80b	185,00 ± 7,00a	128,70 ± 6,35b	124,00 ± 10,58b	179,70 ± 1,32a	0,0283
Albumina (g/dL)	3,36 ± 0,37a	4,39 ± 0,85a	3,55 ± 0,44 ^a	2,75 ± 0,30a	3,19 ± 0,14a	0,0603
Colesterol (mg/dL)	74,00 ± 5,36b	86,33 ± 2,37a	74,33 ± 4,23b	77,33 ± 1,65b	85,33 ± 3,02a	0,0146
Triglicerídeos (mg/dL)	169,30 ± 6,11b	205,70 ± 7,09a	167,00 ± 4,73b	160,00 ± 13,00b	198,70 ± 9,71a	0,0029
HDL (mg/dL)	41,27 ± 5,49a	24,05 ± 5,26b	40,93 ± 5,22b	42,93 ± 4,81a	29,94 ± 3,60b	0,0006
LDL (mg/dL)	11,41 ± 5,51b	31,99 ± 8,21a	14,60 ± 2,73b	9,067 ± 4,72b	32,00 ± 1,40a	0,0017
VLDL (mg/dL)	33,87 ± 1,22b	46,33 ± 4,04a	34,47 ± 4,47b	32,00 ± 2,60b	43,73 ± 1,94a	0,0004
Uréia (mg/dL)	45,00 ± 2,64b	63,33 ± 3,21a	44,67 ± 2,08b	42,33 ± 2,51b	64,33 ± 4,50a	0,0119
Creatinina (mg/dL)	0,35 ± 0,02b	0,49 ± 0,03a	0,34 ± 0,07b	0,34 ± 0,03b	0,54 ± 0,04a	0,0042
ALT (U/L)	29,33 ± 4,86b	72,00 ± 8,71a	33,05 ± 2,00b	31,00 ± 1,73b	76,33 ± 5,68a	0,0003
AST (U/L)	85,00 ± 8,88b	112,30 ± 5,87a	83,33 ± 3,45b	84,00 ± 2,68b	105,33 ± 2,51a	0,0126
GGT (U/L)	1,14 ± 0,97b	3,14 ± 0,63a	2,18 ± 0,44b	2,14 ± 0,62b	3,18 ± 0,57a	0,0038
FA (U/L)	21,33 ± 4,61b	54,67 ± 9,01a	18,33 ± 2,51b	21,67 ± 7,31b	50,00 ± 2,64a	0,0111

1461

1462 Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si pelo teste de
 1463 Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato
 1464 aminotransferase (AST), Gama-glutamil transferase (GGT), Fosfatase alcalina (FA).

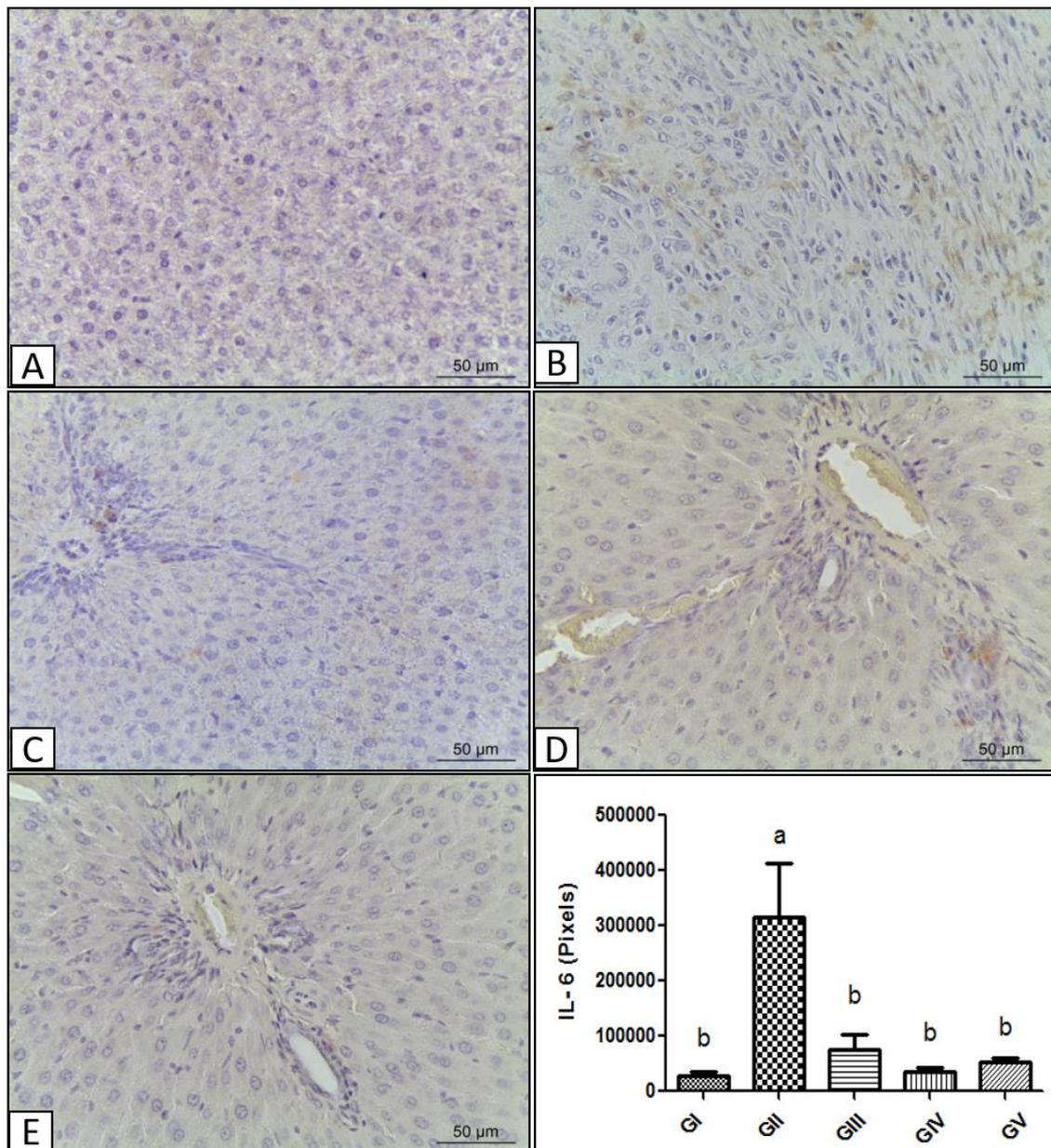
1465 **Tabela 4:** Média das dosagens séricas das enzimas indicadoras da função hepática e renal,
 1466 colesterol, triglicerídeos e glicose nas ratas dos grupos experimentais, 45 dias pós-tratamento.

Grupos	G I	G II	G III	G IV	G V	P
Glicose (mg/dL)	188,70 ± 1,15b	269,00 ± 6,08a	182,30 ± 6,10b	181,70 ± 9,01b	178,00 ± 9,84b	0,0246
Albumina (g/dL)	3,85 ± 0,14a	3,88 ± 0,36a	3,10 ± 0,38a	3,01 ± 0,28a	3,03 ± 0,48a	0,0222
Colesterol (mg/dL)	77,33 ± 6,69b	119,70 ± 7,31a	66,67 ± 5,85b	71,00 ± 4,58b	76,00 ± 7,09b	0,0143
Triglicerídeos (mg/dL)	160,70 ± 4,93b	196,70 ± 2,51a	162,00 ± 8,25b	157,00 ± 4,35b	159,30 ± 3,21b	0,0301
HDL (mg/dL)	49,00 ± 2,07a	30,70 ± 3,60b	47,82 ± 4,95a	52,59 ± 3,42a	47,10 ± 5,78a	0,0111
LDL (mg/dL)	21,10 ± 2,63b	48,00 ± 5,02a	24,76 ± 2,82b	23,67 ± 3,84b	27,12 ± 6,32b	0,0255
VLDL (mg/dL)	32,20 ± 1,87b	46,00 ± 3,37a	34,13 ± 4,44b	31,40 ± 3,66b	30,17 ± 4,24b	0,0011
Uréia (mg/dL)	44,33 ± 2,08b	60,17 ± 2,51a	43,00 ± 4,35b	40,43 ± 4,91b	45,00 ± 4,35b	0,0405
Creatinina (mg/dL)	0,33 ± 0,02b	0,55 ± 0,01a	0,34 ± 0,08b	0,35 ± 0,03b	0,32 ± 0,05b	0,0312
ALT (U/L)	34,00 ± 2,00b	56,33 ± 3,78a	36,33 ± 2,57b	38,00 ± 3,12b	35,45 ± 5,68b	0,0178
AST (U/L)	97,33 ± 3,84b	128,70 ± 8,95a	95,13 ± 4,16b	100,70 ± 6,02b	95,33 ± 7,21b	0,0079
GGT (U/L)	1,55 ± 0,57b	3,18 ± 0,03a	1,59 ± 0,64b	1,51 ± 0,61b	1,58 ± 0,54b	0,0129
FA (U/L)	20,00 ± 3,46b	41,33 ± 2,88a	22,33 ± 1,66b	18,67 ± 4,63b	24,33 ± 4,91b	0,0042

1467

1468 Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si pelo teste de
 1469 Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato
 1470 aminotransferase (AST), Gama-glutamil transferase (GGT), Fosfatase alcalina (FA).

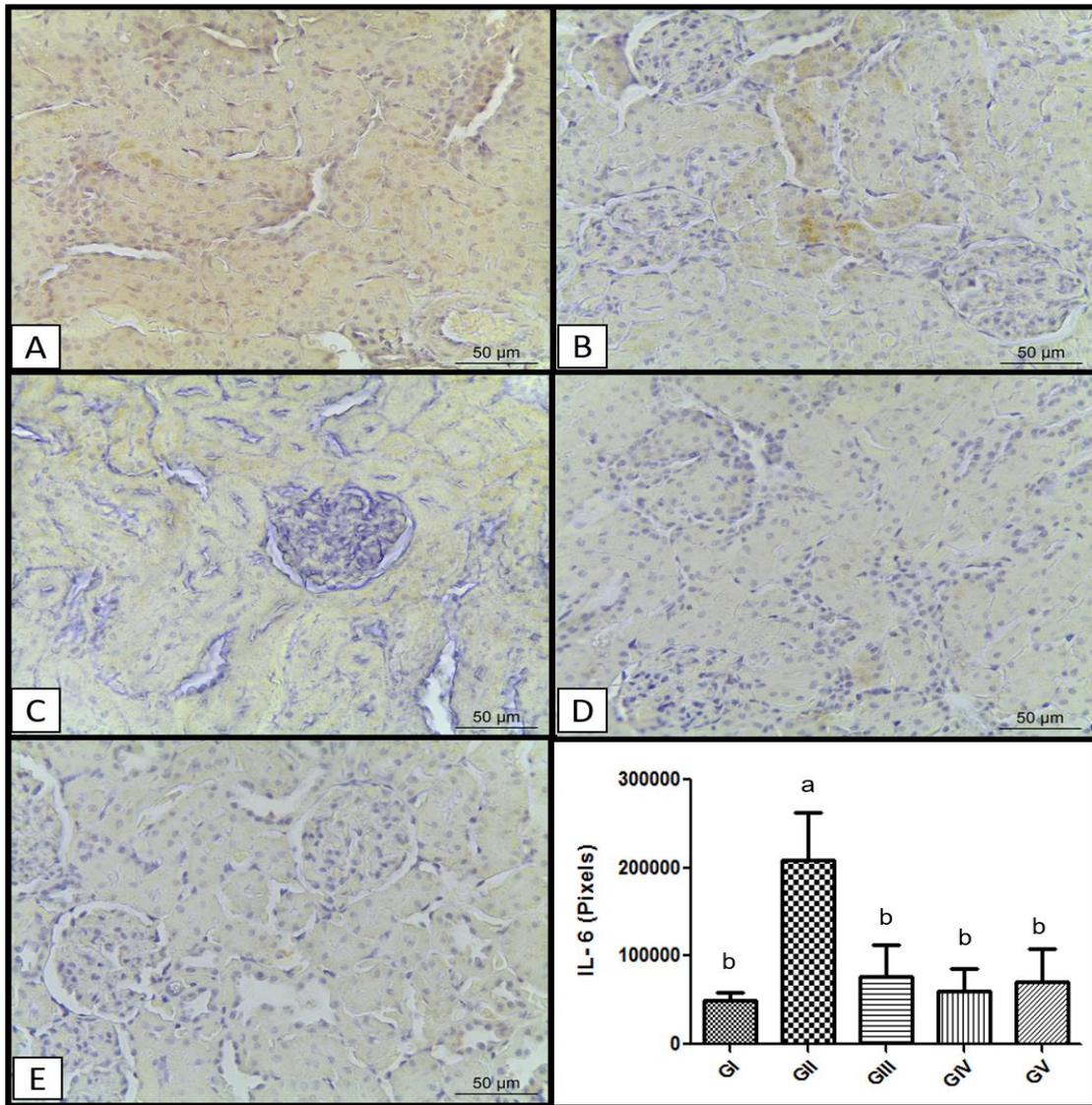
1471



1472

1473 **Figura 3:** Imunohistoquímica e quantificação do IL-6 no fígado. A: GI – controle; B:
 1474 GII– induzidos à corticoterapia sem tratamento; C: GIII– induzidos à corticoterapia +
 1475 alendronato de sódio simultâneo; D: GIV- induzidos à corticoterapia + tratamento com
 1476 estrógeno simultâneo; E: GV - induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno
 1477 nos últimos 15 dias; F – Quantificação em pixels da expressão do fator IL- 6. Notar
 1478 aumento significativo dos pixels no grupo GII em relação aos outros. Médias seguidas
 1479 pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis
 1480 com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

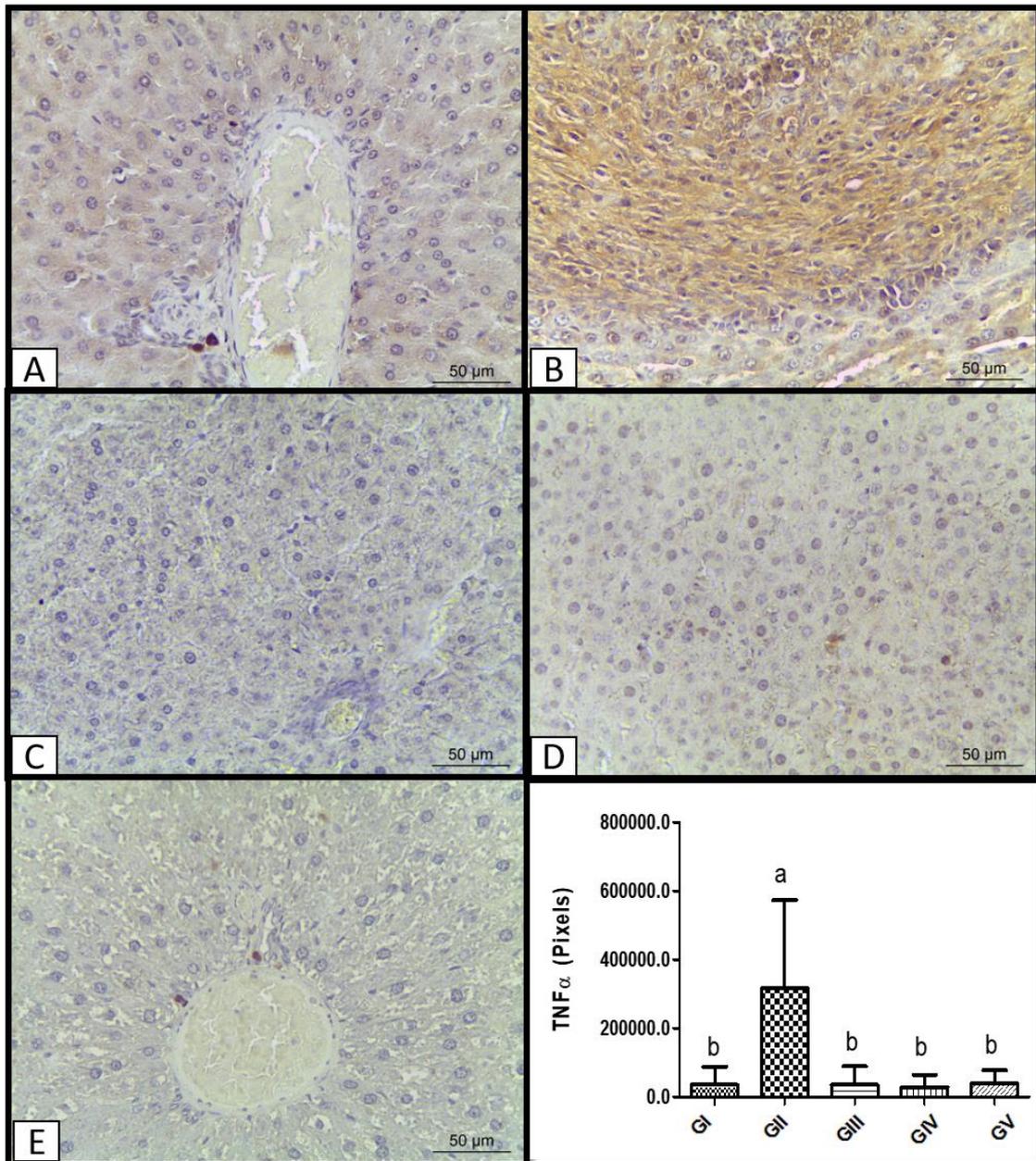
1481



1482

1483 **Figura 4:** Imunohistoquímica e quantificação do IL-6 no rim. A: GI – controle; B: GII–
 1484 induzidos à corticoterapia sem tratamento; C: GIII– induzidos à corticoterapia +
 1485 alendronato de sódio simultâneo; D: GIV- induzidos à corticoterapia + tratamento com
 1486 estrógeno simultâneo; E: GV - induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno
 1487 nos últimos 15 dias; F – Quantificação em pixels da expressão do fator IL- 6. Notar
 1488 aumento significativo dos pixels no grupo GII em relação aos outros. Médias seguidas
 1489 pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis
 1490 com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

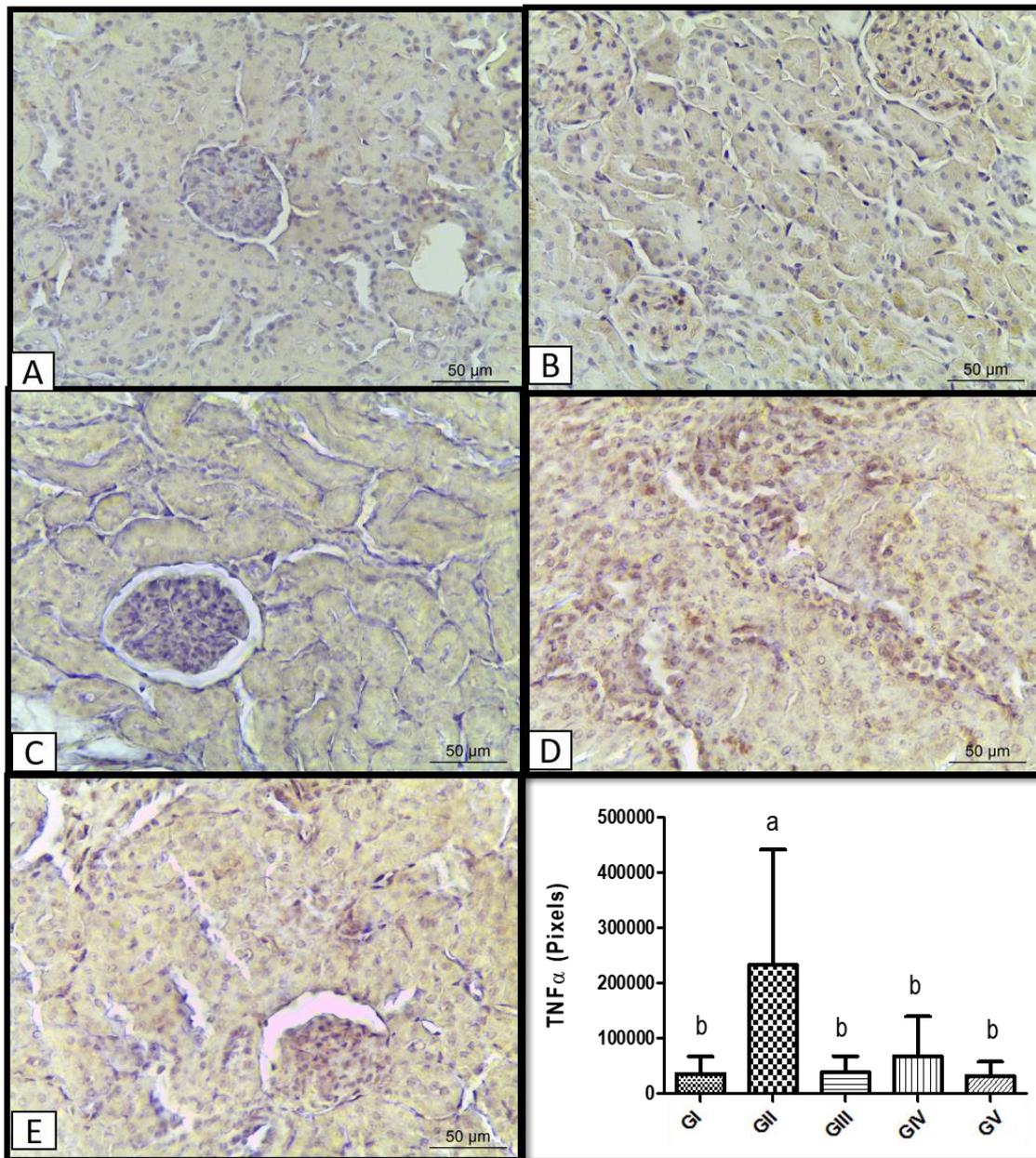
1491



1492

1493 **Figura 5:** Imunohistoquímica e quantificação do TNF- α no fígado. A: GI – controle; B:
 1494 GII– induzidos à corticoterapia sem tratamento; C: GIII– induzidos à corticoterapia +
 1495 alendronato de sódio simultâneo; D: GIV- induzidos à corticoterapia + tratamento com
 1496 estrógeno simultâneo; E: GV - induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno
 1497 nos últimos 15 dias; F – Quantificação em pixels da expressão do fator TNF α . Notar
 1498 aumento significativo dos pixels nos grupos GII em relação aos outros. Médias seguidas
 1499 pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis
 1500 com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

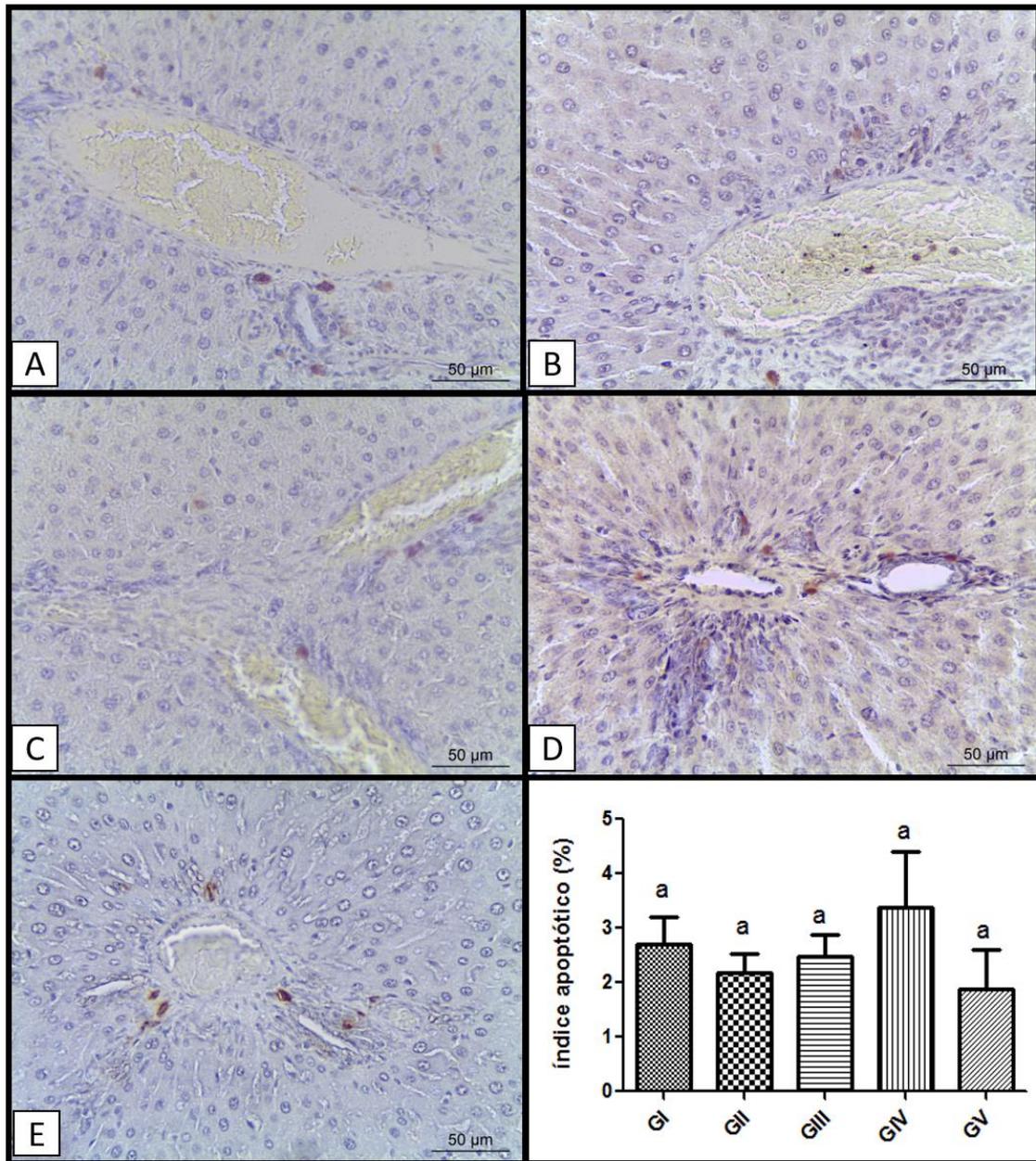
1501



1502

1503 **Figura 6:** Imunohistoquímica e quantificação do TNF- α no rim. A: GI – controle; B:
 1504 GII– induzidos à corticoterapia sem tratamento; C: GIII– induzidos à corticoterapia +
 1505 alendronato de sódio simultâneo; D: GIV- induzidos à corticoterapia + tratamento com
 1506 estrógeno simultâneo; E: GV - induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno
 1507 nos últimos 15 dias; F – Quantificação em pixels da expressão do fator TNF α . Notar
 1508 aumento significativo dos pixels nos grupos GII em relação aos outros. Médias seguidas
 1509 pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis
 1510 com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

1511



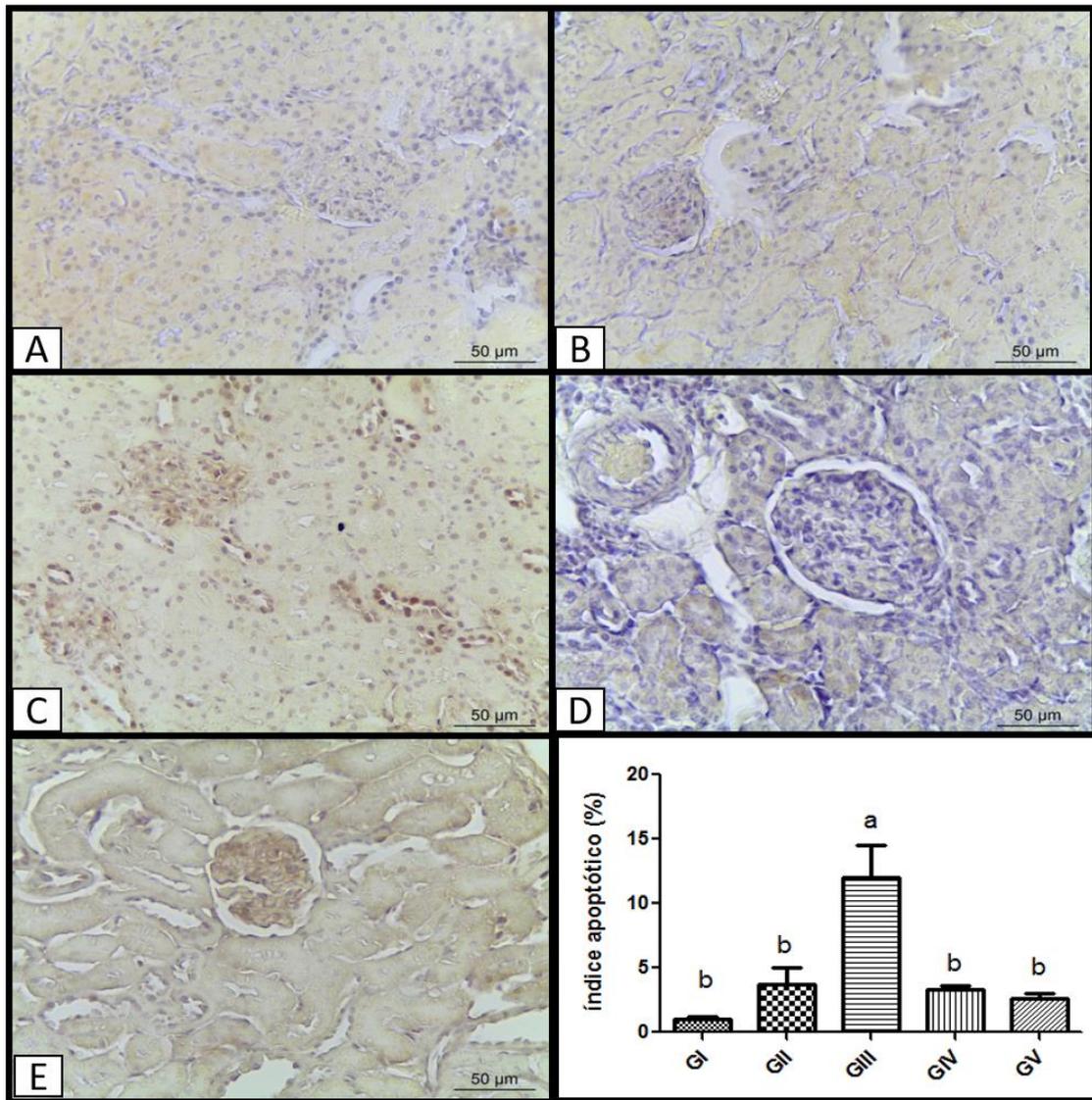
1512

1513 **Figura 7:** Índice apoptótico no fígado. A: GI – controle; B: GII– induzidos à
 1514 corticoterapia sem tratamento; C: GIII– induzidos à corticoterapia + alendronato de sódio
 1515 simultâneo; D: GIV- induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno simultâneo;
 1516 E: GV - induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno nos últimos 15 dias; F –
 1517 Quantificação dos núcleos em apoptose. Médias seguidas pela mesma letra não diferem
 1518 significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

1519

1520

1521



1522

1523 **Figura 8:** Índice apoptótico no rim. A: GI – controle; B: GII– induzidos à corticoterapia
 1524 sem tratamento; C: GIII– induzidos à corticoterapia + alendronato de sódio simultâneo; D:
 1525 GIV- induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno simultâneo; E: GV -
 1526 induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno nos últimos 15 dias; F –
 1527 Quantificação dos núcleos em apoptose. Notar aumento significativo dos núcleos em
 1528 apoptose no grupo GIII em relação aos outros. Médias seguidas pela mesma letra não
 1529 diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn
 1530 ($p < 0,05$).

1531 4. DISCUSSÃO

1532

1533 Os efeitos colaterais decorrentes da corticoterapia prolongada tem se tornado um
1534 problema de saúde pública, por isso o aumento na busca de novas alternativas
1535 terapêuticas para minimizar esses danos. Nesse trabalho os grupos que receberam
1536 simultaneamente ou nos últimos 15 dias de tratamento dose de estrógeno apresentaram
1537 uma melhora aos danos decorrentes da corticoterapia no tecido hepático e renal,
1538 comprovado pela análise histopatológica, morfométrica, bioquímica e
1539 imunohistoquímica. Mostrando assim, um efeito benéfico do estrógeno.

1540 O estrógeno mostra ser uma possível alternativa terapêutica por apresentar
1541 receptores nos mais diversos tecidos, e com isso conseguir diferentes expressões
1542 gênicas, dependentes do tipo de tecido alvo. A literatura descreve a presença de receptor
1543 estrogênico alfa ($RE\alpha$) no útero, fígado, rins, sistema cardiovascular e glândulas
1544 mamárias (BRUNETTE; LECLERC, 2002; SHEARMAN et al., 2003). Enquanto o
1545 receptor de estrogênico beta ($RE\beta$) é expresso nas células da granulosa do folículo
1546 ovariano, no tecido ósseo e em núcleos do sistema nervoso central (TAYLOR et al.,
1547 2009).

1548 A histopatologia do fígado demonstrou que os grupos que receberam
1549 corticoterapia, apresentaram nódulos multifocais por todo o tecido hepático, com a
1550 presença de neutrófilos em processo degenerativo e células inflamatórias
1551 mononucleares difusas, mostrando um processo de inflamação nesse tecido. O que não
1552 foi evidenciado no grupo que recebeu o estrógeno. Acredita-se que esse hormônio
1553 diminua os níveis de substâncias pró- inflamatórias presentes após uma lesão,
1554 atenuando o dano tecidual. Isso foi evidenciado no presente trabalho, onde os grupos

1555 que receberam estrógeno não apresentaram aumento de IL-6 e TNF- α . Além disso,
1556 existem relatos na literatura da capacidade do estrógeno em atuar como antioxidante,
1557 esse mecanismo parece ser independente da ativação de receptores estrogênicos e que é
1558 favorecida pela sua estrutura química contendo um anel fenólico (NASSIF et al., 2005).
1559 O átomo de hidrogênio pertencente ao grupo fenólico da molécula de estrógeno pode
1560 ser doado e assim detoxificar radicais hidroxilas altamente reativos, suprimindo o
1561 estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio, ânions superóxido e outras
1562 neurotoxinas pró-oxidantes geradas após uma lesão (BEHL, 2003). Isso explicaria o
1563 efeito reparador no fígado demonstrado pelo estrógeno.

1564 Uma forma de fornecer informações sobre o estado do fígado de paciente, é
1565 através dos testes bioquímicos (GOMES et al., 2008), uma vez que a maioria das
1566 proteínas plasmáticas são sintetizadas no fígado e as doenças hepatocelulares podem
1567 alterar a síntese proteica, tanto quantitativamente quanto qualitativamente (BAYNES,
1568 DOMINICZAK, 2007). O estrógeno também se mostrou eficaz em reverter às
1569 alterações bioquímicas apresentadas no fígado das ratas que receberam a corticoterapia,
1570 como aumento de colesterol, triglicerídeos, LDL e VLDL e redução de HDL,
1571 retomando a níveis normais esses parâmetros ao final do tratamento. Justificando assim
1572 o resultado deste trabalho. Confirmando esse resultado temos o estudo de Pedrosa et al.,
1573 (2009) em humanos que descreve que o estrógeno conseguiu reduzir significativamente
1574 a incidência de doença cardíaca por diminuir os níveis de lipoproteínas plasmáticas, que
1575 são as principais responsáveis por doenças cardíacas.

1576 Os níveis plasmáticos das enzimas ALT, AST, GGT e FA, são também utilizados
1577 para verificar a integridade do tecido hepático. Houve uma elevação dessas enzimas no
1578 grupo que recebeu a corticoterapia, entretanto nos animais que receberam 50 mg de

1579 estrógeno simultaneamente e nos últimos 15 dias, mostrou uma melhora no parâmetro
1580 dessas enzimas ao final do tratamento, igualando-se ao grupo controle. As enzimas AST
1581 e ALT estão relacionadas com a integridade dos hepatócitos e quando ocorrem lesões
1582 ou destruição das células hepáticas, há liberação destas para a circulação sanguínea
1583 (MOTTA, 2000). Além disso, quando os níveis de GGT e fosfatase alcalina,
1584 apresentam-se elevados há distúrbio hepático (MINCIS; MINCIS, 2007).

1585 A redução dos níveis plasmáticos dessas enzimas nos grupos tratados com
1586 estrógeno mostra que esse hormônio melhora e previne o tecido hepático dos danos
1587 causados pelo GC. Esta teoria é reforçada ao se analisar publicações de experimentos
1588 que utilizaram a estrógeno como tratamento de injúrias hepáticas variadas, como
1589 esteatose hepática não-álcoolica (WISE, 2002), isquemia (BEHL, 2003) e fibrose
1590 (GARCIA-SEGURO et al., 2001), obtendo a redução dos níveis das enzimas hepáticas.
1591 Esses autores relacionaram essa redução ao aumento das enzimas antioxidantes,
1592 principalmente pela glutathiona reduzida, mostrando que além do efeito protetor, o
1593 estrógeno apresenta uma capacidade de reverter os efeitos tóxicos da GC sobre o fígado.

1594 Outro fator avaliado no presente trabalho foram às concentrações séricas de
1595 albumina, que se mostrou inalterada entre os grupos experimentais durante todo o
1596 tempo experimental. A ALB é uma proteína usualmente utilizada em testes de função
1597 hepática, isso porque ela é a proteína mais abundante no plasma, perfazendo um total de
1598 50% das proteínas totais do soro humano (SANTOS et al., 2004). Essa não alteração
1599 pode ter sido devido ao tempo de tratamento, pois a albumina tem um longo tempo de
1600 meia vida, a hipoalbuminemia é no entanto comum nas doenças hepáticas crônicas
1601 como a cirrose (NUNES; MOREIRA, 2007).

1602 A dexametasona, usada neste trabalho é metabolizada principalmente no fígado,
1603 entretanto, em doses altas e com o uso sistêmico (como nos casos de corticoterapia), os
1604 rins também são afetados (CONSTANCIA et al., 2005). A lesão renal pode ser
1605 identificada por vários parâmetros, sendo caracterizada pela dosagem sérica de creatina,
1606 volume urinário e proteinúria (HUANG et al., 2011). Pesquisas experimentais recentes
1607 em modelos animais estão utilizando como possíveis sinalizadores de lesão renal as
1608 análises morfológicas, histopatológicas, presença de mediadores inflamatórios nos
1609 tecidos renais e alterações no sistema renina - angiotensina II (TAO et al., 2013). No
1610 presente trabalho não foi verificada alterações renais na histopatologia, porém houve
1611 diferenças morfométricas e aumento dos níveis séricos de ureia e creatinina no grupo
1612 que recebeu a corticoterapia, mostrando que a dosagem de 2 mg/kg por 45 dias, já é
1613 capaz de interferir na função renal. Resultado este que não foi evidenciado no grupo que
1614 recebeu o estrógeno. Em seu estudo Wu et al. (2012) demonstraram que a injeção
1615 intraperitoneal de estrógeno na dose de 100mg/kg diminui os níveis plasmáticos de
1616 ureia, creatinina, óxido nítrico após a corticoterapia. Essa melhora pode ser devido ao
1617 efeito antioxidante apresentado por esse hormônio, como já descrito anteriormente.

1618 Algumas citocinas, como a interleucina 6 e o fator de necrose tumoral α ,
1619 normalmente é expressa em níveis baixos, exceto durante infecção, traumas ou outros
1620 fatores estressantes, como o uso excessivo de fármacos (GOMES et al., 2009), isso
1621 justificaria o aumento dessa citocina no grupo que recebeu apenas a corticoterapia.
1622 Além disso, sabe-se que a liberação de IL-6 é estimulada pela interleucina 1 e o TNF- α
1623 (GÜVEN et al., 2015). Mostrando que o aumento do TNF- α pode ter estimulado o
1624 aumento da IL-6, o que foi confirmado nesse trabalho tanto no fígado quanto no rim.
1625 Reforçando essa hipótese temos o estudo realizado por Brasil et al., (2000) que

1626 demonstraram aumento dos níveis plasmáticos de IL-6 e TNF- α no grupo que recebeu
1627 30 mg/kg de metilprednisolona. O aumento dessas citocinas não foi verificado nos
1628 animais que receberam o estrógeno. Isso pode ser justificado, pois esse hormônio
1629 consegue atuar nos monócitos, linfócitos T e B e neutrófilos pelo receptor estrogênico α
1630 , e na falta do estrógeno essas células do sistema imune estão mais ativas, sugerindo um
1631 efeito modulador do estrógeno sobre a atividade dessas células (SHEARMAN et al.,
1632 2003; CERRAVOLO et al., 2007). Estudos *in vitro* demonstram que o estrógeno afeta a
1633 liberação de citocinas pró-inflamatórias por essas células, provavelmente por uma
1634 ligação cruzada entre os receptores e o fator de transcrição nuclear (NF-kB), que resulta
1635 na redução da atividade desse fator. Além disso, estudos vêm sugerindo que a
1636 deficiência do estrógeno durante os primeiros anos da menopausa tem ligação com
1637 várias citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas (IL-6 e IL-1) e a expressão de
1638 seus receptores (SALTIKI, ALEVIZAKI 2007). Confirmando essa hipótese temos o
1639 estudo de Faloni; Cerri, (2007) o qual mostra que o estrógeno atua sobre os monócitos
1640 promovendo redução dos níveis de IL-1 e TNF- α e conseguem interferir
1641 consequentemente nos níveis de IL-6.

1642 Em relação a marcação das células em apoptose no fígado, não verificamos
1643 diferenças significativas em relação aos grupos experimentais, mostrando que durante o
1644 tempo de tratamento os GC não conseguiram interferir nos níveis de morte celular
1645 hepática. Pouco se sabe sobre o efeito dos corticoides na apoptose celular. Trottier et al.
1646 (2008) relatam que o GC é capaz de aumentar o número de neutrófilos circulantes por
1647 um mecanismo associado com a redução na sua taxa de apoptose. Já o rim das ratas do
1648 grupo III, que receberam corticoterapia e Alendronato de Sódio, mostraram as maiores
1649 marcações para apoptose. Estudos relatam que os bifosfonatos quando administrados

1650 oralmente e em altas doses, podem facilitar a formação de complexos de cálcio e ferro.
1651 Esses complexos, principalmente pelo cálcio, são fagocitados por macrófagos ou podem
1652 ser depositados nos rins e levar a quadros de insuficiência renal, e a nível celular pode
1653 estimular a apoptose renal (NEVES et al., 2003).

1654 **5. CONCLUSÃO**

1655 Assim conclui-se que o estrógeno atua como uma alternativa terapêutica eficiente
1656 na prevenção e reparação dos efeitos colaterais decorrentes da corticoterapia por tempo
1657 prolongado minimizando os danos hepáticos e renais.

1658

1659 **6. REFERÊNCIAS**

1660

1661 BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. K. H. **Bioquímica Médica**. Rio de Janeiro:
1662 Elsevier, 2007. 716 p.

1663 BAZSÓ, A.; SZAPPANOS, A.; PATÓCS, A. B.; GYULA POÓR, A. D.;
1664 SHOENFELD, Y.; EMESE, K. The importance of glucocorticoid receptors in systemic
1665 lúpus erythaematosus. A systematic review. **Autoimm. Ver.** v.14, p. 349–351, 2015.

1666 BEHL, C. Estrogen can protect neurons: modes of action. **J. Steroid Biochem. Biol.**
1667 v.83, p.195-197, 2003.

1668 BRASIL, L. A.; GOMES, W. J.; SALOMÃO, R.; FONSECA, J. H. P.; BRANCO, J. N.
1669 R.; BUFFOLO, E. Uso de corticóide como inibidor da resposta inflamatória sistêmica
1670 induzida pela circulação extracorpórea. **Rev Bras Cir Cardiovasc.** n. 14, v. 3, p. 254-
1671 68, 2000.

1672 BRUNETTE, M. G.; LECLERC, M. Renal action of progesterone: effect on calcium
1673 reabsorption. **Mol Cell Endocrinol.** v. 30, n. 194, p. 183-90, 2002.

1674 TAYLOR, S. E.; MARTIN-HIRSCH, P.; MARTIN, F. Oestrogen receptor splice
1675 variants in the pathogenesis of disease. **Cancer Lett.** v. 15, 2009.

1676 NADAL, A. et al. The estrogen trinity: membrane, cytosolic, and nuclear effects. **News**
1677 **in Physiol. Scienc.** v. 16, p. 251–255, 2001.

1678 CERAVOLO, G. S.; TOSTES, R. C.; FORTES, Z. B.; CARVALHO, M. H. C. Efeitos
1679 do estrógeno no sistema cardiovascular. **Hipertensão.** São Paulo, v.10(4), p.124-130,
1680 2007.

1681 CHARMANDARI, E.; TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. Endocrinology of the stress
1682 response. **Annu. Ver. Physiol.** v. 67, p. 259-84, 2005.

1683 CONSTANCIA, M.; ANGIOLINI, E.; SANDOVICI, I.; SMITH, P.; SMITH, R.;
1684 KELSEY, G.; DEAN, W.; FERGUSON-SMITH, A.; SIBLEY, C.P.; REIK, W.;
1685 FOWDEN, A. Adaptation of nutrient supply to fetal demand in the mouse involves
1686 interaction between the Igf2 gene and placental transporter systems. **Proc. Natl. Acad.**
1687 **Sci.** v. 102, p. 19219–19224, 2005.

1688 DIAMANT, M. Steroid diabetes: from mecDELMEZism to treatment? **Neth J Med.** v.
1689 72, n.2, p. 62-72, 2014.

1690 DICKINSON, H.; WALKER, D. W.; WINTOUR, E. M.; MORITZ, K. Maternal
1691 dexamethasone treatment at midgestation reduces nephron number and alters renal gene
1692 expression in the fetal spiny mouse. **Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.** v.
1693 292, R453–R461, 2007.

1694 FALONI, A. P. S.; CERRI, P. S. Mecanismos celulares e moleculares do estrógeno na
1695 reabsorção óssea. **Rev. de Odontologia da UNESP.** v. 36, n.2, p. 181-88, 2007.

1696 FREITAS, T. H. P.; SOUZA, D. A. F. Costicosteróides sistêmicos na prática
1697 dermatológica. Parte I – Principais efeitos adversos. **Anais Brasil. Dermatolog.** v. 82,
1698 n. 1, p. 63-70, 2007.

1699 GARCIA-SEGURA, L.M.; AZCOITIA, I.; CARLOS, L.L. Neuroprotection by
1700 estradiol. **Prog. Neurobiol.** v.63, p. 29-60, 2001.

1701 GOMES, B. C.; ESTEVES, C. T.; PALAZZO, I. C.; DARINI, A. L.; FELIS, G. E.;
1702 SECHI, L. A.; FRANCO, B. D.; DE MARTINIS, E. C. Prevalence and characterization
1703 of Enterococcus spp. isolated from Brazilian foods. **Food Microbiol.,** v. 25, n. 5, p.
1704 668-675, 2008.

1705 GOMES, M. A. M.; NETO, N. C. M.; BISPO, I. G. A. Interleucina-6, Moléculas de
1706 Adesão Intercelular-1 e Microalbuminúria na Avaliação da Lesão Endotelial: Revisão
1707 de Literatura. **Rev SOCERJ**. v. 22, n. 6, p. 398-403, 2009.

1708 GOMES, M. A. M.; NETO, N. C. M.; BISPO, I. G. A. Interleucina-6, Moléculas de
1709 Adesão Intercelular-1 e Microalbuminúria na Avaliação da Lesão Endotelial: Revisão
1710 de Literatura. **Rev SOCERJ**. v. 22, n. 6, p. 398-403, 2009.

1711 GÜVEN, O.; TEKIN, U.; SALMANOĞLU, B.; KAYMAK, E. Tumor necrosis factor-
1712 alpha levels in the synovial fluid of patients with temporomandibular joint internal
1713 derangement. **J. Craniomaxillofac Surg**. n. 43, v. 1, p. 102-105, 2015.

1714 HUANG, A.; SUN, D.; KOLLER, A.; KALEY, G. 17beta-estradiol restores endothelial
1715 nitric oxide release to shear stress in arterioles of male hypertensive rats. **Circulation**,
1716 v.101, p. 94–100, 2000.

1717 KAMANGA-SOLLO, E.; THORNTON, K. J.; WHITE, M. E.; DAYTON, W. Role of
1718 G protein-coupled estrogen receptor-1 in estradiol 17b-induced alterations in protein
1719 synthesis and proteindegradation rates in fused bovine satellite cell cultures. **Domest.**
1720 **Animal Endocrinol**. n. 58, p. 90-96, 2017.

1721 LONGUI, C. A. Glucocorticoid therapy: minimizing side effects. **J. Pediatr**. v. 83, p.
1722 163-171, 2007.

1723 LONGUI, C. A.; SANTOS, M. C.; FORMIGA C. B.; OLIVEIRA, D. V.; ROCHA M.
1724 N.; FARIA C. D. Antiproliferative and apoptotic potencies of glucocorticoids:
1725 nonconcordance with their anti-inflammatory and immunosuppressive properties. **Arq.**
1726 **Bras. Endocrinol. Metabol**. n. 49, n.1, p. 378-383, 2005.

1727 MINCIS, M.; MINCIS, R. Enzimas hepáticas: por que são importantes para o estudo de
1728 patologias do fígado. **Prática Hosp.**, v. 51, p. 44-48, 2007.

1729 MOSCA, M.; TANI, C.; CARLI, L.; BOMBARDIERI, S. Glucocorticoids in systemic
1730 lupus erythematosus. **Clin Exp Rheumatol**. n. 29, v. 5, p. 126-129, 2011.

1731 MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica: princípios e interpretações**. Editora: Médica
1732 Massau, vol. 9, 2000.

- 1733 NASSIF, M. C.; CIMAROSTI, H. I.; ZAMIN, L. L.; SALBEGO, C. G. Estrógeno
1734 versus isquemia cerebral: hormônio feminino como agente neuroprotetor. **Infarma**. n.
1735 59 , v.17, p. 57 - 60, 2005.
- 1736 NEVES, C. L.; DIAS, C. B.; MOYSÉS, R. M.; JORGETTI, V. Should biphosphonetes
1737 be used to treat osteodyst cophy? **J. Bras. Nefrol**. v. 254, p. 215-223, 2003.
- 1738 NORMAN, A. W. et al. Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a
1739 conformational ensemble model. **Nature Rev**. v. 3, p. 27–40, 2004.
- 1740 OH, S. M.; CHUNG, K. H. Estrogenic activities of *Ginkgo biloba* extracts. **Life Sci.**, v.
1741 74, n. 11, p. 1325-1335, 2008.
- 1742 PEREIRA, A. L. C.; BOLZANI, F. C. B.; STEFANI, M.; CHARLIN, R. Uso sistêmico
1743 de corticosteroids: revisão de literature. **Med. Cutan. Iber Lat Am**. v. 35, n. 1, p. 35-
1744 50, 2007.
- 1745 PEDROSA, D. F.; REZENDE, L. C. D.; SILVA, I. V.; RANGEL, L. B. A.;
1746 GONÇALVES, W. L. S.; GRACELI, J. B. Efeitos benéficos do estrogênio no sistema
1747 cardiovascular. **Perspectivas Online**. v. 3, n. 12, p. 190-196, 2009.
- 1748 RHODUS, N. L.; CHENG, B.; BOWLES, W.; MYERS, S.; MILLER, L.; ONDREY, F.
1749 Proinflammatory cytokine levels in saliva before and after treatment of (erosive) oral
1750 lichen planus with dexamethasone. **Oral Dis**. v.12, n.2, p. 112-116, 2006
- 1751 SALTIKI, K.; ALEVIZAKI, M. Coronary heart disease in postmenopausal women; the
1752 role of endogenous estrogens and their receptors. **Hormones (Athens)**, v.6, n.1, p. 9–
1753 24, 2007.
- 1754 SANTOS, N. S. J.; DRAIBE, S. A.; KAMIMURA, M. A.; CUPPARI, L. Albumina
1755 sérica como marcador nutricional de pacientes em hemodiálise. **Rev. nutrição**, v. 17, n.
1756 3, p. 339-349, 2004.
- 1757 SCHIMMER, B. P.; PARKER, K. L. Adrenocorticotropic hormone; adrenocortical
1758 steroids and their synthetic analogs; inhibitors of the synthesis and action of adrenocortical
1759 hormones. **Therapeutics**. v. 11, p. 1587-1612, 2007.
- 1760 SEGURO, L. P.; ROSARIO, C.; SHOENFELD, Y. Long-term complication of past
1761 glucocorticoid us. **Autoimmun Ver**. n. 12, v. 5, p. 629–632, 2013.

1762 SERRA H. A., ROGANOVICH J. M., RIZZO L. F. Glucocorticoides: paradigma
1763 medicina transnacional. De lo molecular al uso clínico. **Medicina (Buenos Aires)**. v. 72,
1764 n. 1, p. 158-170, 2012.

1765 SHEARMAN, A.M.; CUPPLES, L.A.; DEMISSIE, S.; PETER, I.; SCHMID, C.H.;
1766 KARAS, R.H.; MENDELSON, M.E.; HOUSMAN, D.E.; LEVY, D. Association
1767 between estrogen receptor alpha gene variation and cardiovascular disease. **JAMA**, v.
1768 290, n. 17, p. 2263–2270, 2003.

1769 SHEARMAN, A.M.; CUPPLES, L.A.; DEMISSIE, S.; PETER, I.; SCHMID, C.H.;
1770 KARAS, R.H.; MENDELSON, M.E.; HOUSMAN, D.E.; LEVY, D. Association
1771 between estrogen receptor alpha gene variation and cardiovascular disease. **JAMA**, v.
1772 290, n. 17, p. 2263–2270, 2003.

1773 TERRAL, R.; SILVA, S. A. G.; PINTOLL, V. S.; DUTRAL, P. M. L. Efeito do
1774 exercício no sistema imune: resposta, adaptação e sinalização celular. **Rev Bras Med**
1775 **Esporte**. v.18, n., p. 101-110, 2012.

1776 TROTTIER, M. D.; NEWSTED, M. M.; KING, L. E.; FRAKER, P. J. Natural
1777 glucocorticoids induce expansion of all developmental stages of murine bone marrow
1778 granulocytes without inhibiting function. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 105, n. 5, p.
1779 2028-2033, 2008

1780 VAN RAALTE, D. H.; DIAMANT, M. Steroid diabetes: from mechanism to treatment?
1781 **Neth J Med**. v. 72, n.2, p. 62-72, 2014.

1782 WISE, P.M. Estrogens and neuroprotection. **Endocrinol. Metab.** v.13, n.6, p. 229-230,
1783 2002.

1784 WU, X.; CHENG, B.; CAI, Z. D.; LOU, L. M. Determination of the apoptotic index in
1785 osteosarcoma tissue and its relationship with patients prognosis. **Cancer Cell Int.**, v.
1786 13, n. 56, p. 1-4, 2013.

1787 ZHANG, J.; MASSMANN, G. A.; ROSE, J. C.; FIGUEROA, J. P. Differential effects
1788 of clinical doses of antenatal betamethasone on nephron endowment and glomerular
1789 filtration rate in adult sheep. **Reprod Sci**. n. 17, v. 2, p. 186-195, 2010.

1790 ZIMANYI, M. A.; BERTRAM, J. F.; BLACK, M. J. Nephron number and blood
1791 pressure in rat offspring with maternal high-protein diet. **Pediatr. Nephrol.** v.17, p.
1792 1000– 1004, 2002.

1793

1794 **CAPÍTULO III**

1795

1796 **Estrógeno protege e repara o tecido ósseo dos danos da corticoterapia por**
1797 **interferir nas citocinas pró-inflamatórias e nos marcadores de reabsorção óssea**

1798

1799 Hilda Michelly Paiva dos Santos¹; Álvaro Aguiar Coelho Teixeira¹; Valéria Wanderley

1800

Teixeira¹ *

1801

1802 ¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia

1803

Animal, Recife, Brasil

1804

1805

1806 *Autor para correspondência: UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois

1807

Irmãos-Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389

1808

E-mail: valeria.wanderley@ufrpe.br (WANDERLEY-TEIXEIRA V.)

1809

1810 **RESUMO**

1811

1812 O interesse pelo estrógeno e suas ações no organismo têm crescido muito, nos
1813 últimos anos, principalmente, como alternativa terapêutica durante a corticoterapia. O
1814 presente artigo teve por objetivo avaliar os efeitos da administração de estrógeno
1815 associado à corticoterapia por 45 dias analisando o fêmur de ratas, a fim de identificar
1816 uma estratégia de tratamento com menor efeito colateral. Para isso, foram utilizadas 35
1817 ratas albinas, com 90 dias de idade, divididas nos seguintes grupos: I – ratas que
1818 receberam placebo; II - ratas submetidas à corticoterapia por 45 dias; III - ratas
1819 submetidas à corticoterapia por 45 dias e tratadas simultaneamente com Alendronato de
1820 Sódio 0,2 mg/Kg por via intragástrica; IV - ratas submetidas à corticoterapia por 45 dias
1821 e tratadas simultaneamente com estrógeno 50mg/Kg por via subcutânea; V - ratas
1822 submetidas à corticoterapia por 45 dias adicionado estrógeno nos últimos 15 dias. A
1823 corticoterapia foi induzida por meio de injeções de 2mg/mL de Decadron®, por via
1824 intramuscular. A análise histopatológica revelou no fêmur das ratas do grupo II perda da
1825 microarquitetura óssea, notada pela diminuição da conectividade entre as trabéculas. Na
1826 análise histoquímica pelo Von Kossa observou-se marcação cálcio positiva próximos ao
1827 disco epifisário em todas as ratas dos grupos experimentais. Ao 15º dia as ratas do
1828 grupo II e V diferiram estatisticamente das demais ratas dos grupos experimentais em
1829 relação a todos os parâmetros avaliados, apresentando níveis séricos diminuídos de
1830 cálcio, magnésio e osteocalcina e elevação das taxas de fosfatase alcalina óssea,
1831 fosfatase ácida tartarato-resistente e C- telopeptídeo. Ao final do tratamento (45º dia) os
1832 parâmetros avaliados permanecem alterados apenas nas ratas do grupo II. As marcações
1833 para TNF- α foram mais intensas nas ratas do grupo II. A marcação para IL-6 e o índice
1834 de apoptose mostrou-se inalterado em todos os grupos. Assim, conclui-se que o
1835 estrógeno se mostrou eficaz em prevenir e reparar os danos ósseos provocados pela
1836 corticoterapia por período prolongado.

1837

1838 **Palavras-chaves:** corticoterapia, estrógeno, fêmur, bioquímica, imunoquímica, ratas.

1839

1840 **ABSTRACT**

1841

1842 The interest in estrogen and its actions in the body have grown a lot, in recent years,
1843 mainly, as a therapeutic alternative during steroid therapy. The objective of this study
1844 was to evaluate the effects of estrogen administration associated with corticosteroid
1845 therapy for 45 days by analyzing the femur of rats, in order to identify a treatment
1846 strategy with a lower collateral effect. For this, 35 albino rats, 90 days old, were divided
1847 into the following groups: I - rats that received placebo; II - rats submitted to
1848 corticosteroid therapy for 45 days; III - rats submitted to corticotherapy for 45 days and
1849 treated simultaneously with 0.2 mg / kg Sodium Alendronate intragastric; IV - rats
1850 submitted to corticotherapy for 45 days and treated simultaneously with estrogen 50mg
1851 / kg subcutaneously; V - rats submitted to corticotherapy for 45 days added estrogen in
1852 the last 15 days. Corticosteroids were induced by injections of 2 mg / mL Decadron®
1853 intramuscularly. The histopathological analysis revealed in the femur of the rats of
1854 group II loss of the bone microarquitectura, noticed by the decrease of the connectivity
1855 between the trabeculae. In the histochemical analysis by Von Kossa, a positive calcium
1856 label was observed near the epiphyseal disk in all rats of the experimental groups. At
1857 day 15, the rats of group II and V differed statistically from the other rats of the
1858 experimental groups in relation to all parameters evaluated, with decreased serum levels
1859 of calcium, magnesium and osteocalcin and elevated levels of bone alkaline
1860 phosphatase, acid phosphatase tartrate- resistant and C-telopeptide. At the end of the
1861 treatment (45 days) the parameters evaluated remain altered only in the rats of group II.
1862 The TNF- α markers were more intense in the rats of group II. The labeling for IL-6 and
1863 the apoptosis index was unchanged in all groups. Thus, it has been concluded that
1864 estrogen has been shown to be effective in preventing and repairing bone damage
1865 caused by long-term corticosteroid therapy.

1866

1867 **Key words:** corticoid therapy, estrogen, femur, biochemistry, imuhistochemistry, rats.

1868

1869

1870

1871 1. INTRODUÇÃO

1872

1873 A administração de glicocorticoides (GC) pode ser realizada com três durações de
1874 tratamento: curto (< 10 dias), intermediário (10 a 30 dias) e prolongado (> 30 dias). A
1875 corticoterapia, ou seja, a administração prolongada de GC é o tratamento cada vez mais
1876 indicado para diversas especialidades médicas. Seu uso bastante difundido deve-se a
1877 capacidade de reduzir a exposição antigênica ao sistema imune, diminuindo a liberação
1878 de citocinas pró-inflamatórias e a eficiência da eliminação do agente agressor e células
1879 infectadas (LONGUI, 2007).

1880 Apesar do seu uso tão comum a corticoterapia vem apresentando alguns efeitos
1881 colaterais indesejáveis, em geral associadas ao tempo de tratamento e uso de GC de
1882 ação prolongada, como: alteração da disposição de gordura, disfunção hipofisária,
1883 alteração no eixo endócrino-metabólico, modificação no sistema renal, cardiovascular,
1884 hematopoiético e imunológico. Porém o principal efeito colateral decorrente do uso
1885 sistêmico de corticoides é sobre o tecido ósseo, podendo ocasionar: osteoporose,
1886 fraturas ósseas, fraqueza, miopatia, necrose asséptica de cabeça de fêmur e úmero em
1887 ratos (SCHIMMER; PARKER 2007; VAN RAALTE; DIAMANT 2014).

1888 A osteoporose é uma doença óssea metabólica caracterizada por diminuição da
1889 quantidade de osso mineralizado, com alteração da microarquitetura óssea, induzindo
1890 aumento da fragilidade e maior risco de fraturas (RHODUS et al., 2006). Segundo
1891 Longui (2007), a indução da osteoporose pelos glicocorticóides resulta da supressão da
1892 atividade de formação óssea dos osteoblastos, combinado com o aumento da atividade
1893 de reabsorção óssea pelos osteoclastos. Enquanto o efeito sobre a atividade osteoblástica
1894 parece ser direto, seus efeitos sobre a atividade osteoclástica são resultantes da
1895 diminuição da absorção de cálcio intestinal, concomitantes com aumento da excreção

1896 urinária de cálcio, ambos como causas secundárias do hiperparatireoidismo (PEREIRA,
1897 et al., 2007).

1898 O estudo do tratamento da osteoporose, ocasionada por terapia com
1899 glicocorticoides (osteoporose secundária) tem sido especialmente motivado, pois os
1900 mesmos, não raramente, são insubstituíveis para o tratamento médico de muitas e
1901 variadas enfermidades (POLO, 2003). Os agentes terapêuticos, que podem ser utilizados
1902 no tratamento da osteoporose, de acordo com suas propriedades farmacológicas, podem
1903 ser divididos em antirreabsortivos e agentes formadores de osso (KIM et al., 2003).
1904 Dentre estes, pode-se citar os bifosfatos como o Alendronato de sódio, que atua ligando-
1905 se aos cristais de hidroxiapatita e acumulando-se no tecido ósseo. Os bifosfatos são
1906 drogas muito eficientes no tratamento da osteoporose, porém alguns efeitos adversos
1907 destes medicamentos têm sido relatados, tais como: intolerância gastrointestinal
1908 (SOUZA, 2010) e osteonecrose mandibular (POZZI et al., 2007).

1909 Devido a estes efeitos colaterais, buscam-se alternativas terapêuticas para
1910 minimizar tais danos decorrentes da corticoterapia, como: diminuição do tempo de
1911 administração e associação com outras drogas, hormônios ou fitoterápicos. Dentre essas
1912 opções, uma estratégia que tem se mostrado eficiente é a reposição hormonal,
1913 principalmente pelo estrógeno, que se destaca por atuar na remodelação óssea, contudo
1914 por mecanismos ainda não totalmente elucidados.

1915 A presença de receptores para estrógeno em células ósseas sugere efeito direto
1916 desse hormônio sobre esse tecido (OH; KIM; CHUNG, 2008; KAMANGA-SOLLO, et
1917 al., 2017). Podendo ser uma boa alternativa para minimizar os efeitos da terapia com
1918 GC, por conseguir atuar diretamente via receptor. No entanto, poucos são os trabalhos
1919 na literatura que avaliem o uso de corticoides por período prolongado (acima de 30 dias)
1920 ou a associação estrógeno+glicocorticoide, o que dificulta esse esclarecimento.

1921 Assim, a presente pesquisa visa avaliar os efeitos da administração de estrógeno
1922 associado à corticoterapia por 45 dias analisando a histopatologia, histoquímica,
1923 bioquímica e imunohistoquímica do tecido ósseo de ratas, a fim de auxiliar na
1924 elucidação da ação do estrógeno no processo de osteoporose.
1925

1926 **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

1927

1928 *2.1 Animais e grupos experimentais*

1929

1930 Foram utilizadas 35 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar,
1931 com 90 dias de idade, pesando em torno de 200 ± 25 g, procedentes do Biotério do
1932 Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Universidade Federal Rural de
1933 Pernambuco. Esses animais foram mantidos em gaiolas, com alimentação e água *ad*
1934 *libitum*, na temperatura de 22 ± 1 °C e iluminação artificial que estabeleceram um
1935 fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o período de luz das
1936 06:00 às 18:00 h. As ratas foram divididas, ao acaso, em cinco grupos, cada um,
1937 constituído por 7 animais, a saber:

1938 **Grupo I** – ratas que receberam placebo (CONTROLE);

1939 **Grupo II** - ratas submetidas à corticoterapia com dexametasona por 45 dias
1940 (CONTROLE NEGATIVO);

1941 **Grupo III** - ratas submetidas à corticoterapia com dexametasona por 45 dias e
1942 tratadas com simultaneamente com alendronato de sódio 0,2 mg/Kg/dia por via
1943 intragástrica (CONTROLE POSITIVO);

1944 **Grupo IV** - ratas submetidas à corticoterapia com dexametasona por 45 dias e
1945 tratadas simultaneamente com 50 mg de estrógeno (hexaidrobenzoato de estradiol);

1946 **Grupo V** - ratas submetidas à corticoterapia com dexametasona por 45 dias
1947 adicionado 50 mg de estrógeno (hexaidrobenzoato de estradiol) nos últimos 15 dias.

1948 O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética institucional, de
1949 nº. 083/2014.

1950

1951 *2.2. Corticoterapia*

1952 A corticoterapia foi realizada nas ratas de todos os grupos experimentais, exceto
1953 no controle, através da injeção do glicocorticoide dexametasona (Decadron® - 2
1954 mg/mL, diluído em soro fisiológico) por via intramuscular, na dose de 2,0 mg/kg do
1955 peso corporal, diariamente, durante 45 dias. (GOUDOCHNIKOV; PETTENON, 2001).
1956 As ratas do grupo controle receberam a mesma dose de soro fisiológico.

1957

1958 2.3 *Tratamento com estrógeno*

1959

1960 As injeções de estrógeno (hexaidrobenzoato de estradiol, diluído em óleo de
1961 amêndoas) foi administrado nas ratas dos grupos V e IV na dose de 50 mg por rata, via
1962 subcutânea, durante 45 e 15 dias respectivamente. (GOUDOCHNIKOV; PETTENON,
1963 2001).

1964

1965 2.4 *Administração de Alendronato de Sódio*

1966

1967 As ratas do grupo III foram submetidas ao tratamento de Alendronato de sódio na
1968 dosagem de 0,2mg/Kg por via intragástrica, durante 45 dias.

1969

1970 2.5 *Análise Bioquímica*

1971

1972 Em cada grupo foram realizadas três coletas no 1º, 15º e 45º dia de tratamento.
1973 De cada coleta após contenção mecânica, foi retirado 1 mL de sangue de cada rata por
1974 meio da punção na veia caudal lateral com uso de cateter (24G). O sangue obtido foi
1975 acondicionado em microtubos com anticoagulante (heparina sódica - 20 µL),
1976 homogeneizado com delicadeza e mantido à temperatura ambiente. Para subsequente
1977 obtenção do plasma as amostras foram submetidas à centrifugação a uma temperatura

1978 de -4 °C com a velocidade de 3.000 rpm durante 10 minutos. As amostras de plasma
1979 foram mantidas em freezer -80 °C até o momento da dosagem.

1980 Foram avaliados os níveis plasmáticos de indicadores do tecido ósseo como
1981 cálcio, magnésio, além de marcadores de formação e reabsorção óssea como: fosfatase
1982 alcalina óssea, osteocalcina, Fosfatase Ácida tartarato-resistente (TRAP) e C-
1983 Telopectideo (CTX- 1). As amostras foram analisadas em triplicata e determinadas com
1984 o auxílio do analisador bioquímico Vet test 8008 (*Blood chemistry analyzer*).

1985

1986 2.6 *Análise histopatológica*

1987

1988 As ratas de cada grupo foram eutanasiadas por aprofundamento anestésico após os
1989 períodos experimentais. Para tanto, foram anestesiadas com hidrocloridrato de cetamina
1990 (80 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg), por via intramuscular. A seguir, foi realizada a
1991 dissecação e coleta do fêmur de cada animal que foi fixado em formol tamponado a
1992 10%, durante 48 horas. Após a fixação o osso foi descalcificado em solução de EDTA a
1993 10%, durante três meses. Posteriormente, o material foi processado de acordo com as
1994 técnicas de rotina para inclusão em parafina, e corados pela hematoxilina - eosina (H.
1995 E.), Von Kossa (detecção de Cálcio) e analisados em microscópio de luz, da marca
1996 OLYMPUS BX-49 e fotografados em fotomicroscópio OLYMPUS BX-50.

1997

1998 2.7 *Imunohistoquímica (IL6 e TNF- α)*

1999 Para análise imunohistoquímica, as lâminas silanizadas foram desparafinizadas e
2000 reidratadas em xilol e álcoois. A recuperação antigênica foi realizada através de uma
2001 solução de tampão citrato (pH 8.0) em alta temperatura no micro-ondas por 5 minutos.
2002 A peroxidase endógena foi inibida através de uma solução de peróxido de hidrogênio
2003 (3%) em metanol. A reação antígeno-anticorpo inespecífica foi bloqueada através da

2004 incubação das lâminas em PBS e albumina sérica bovina (BSA) 5% durante uma hora.
2005 Todos os anticorpos (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) foram
2006 diluídos em PBS/BSA 1% por uma hora. Subsequentemente, as lâminas foram tratadas
2007 com o anticorpo secundário por trinta minutos. A reação antígeno-anticorpo foi
2008 observada através de um precipitado marrom após aplicação de 3,3 diaminobenzidina
2009 por quatro minutos e contra corados com hematoxilina. As imagens foram capturadas
2010 por meio de câmera de Vídeo Sony®, acoplada ao microscópio Olympus® Bx50, as
2011 quais foram submetidas ao aplicativo Gimp 2.0 para a quantificação por meio de
2012 Histograma RGB (Red-Green-Blue) (OBERHOLZER et al., 1996; LEE et al., 2001).

2013

2014 *2.8 Índice apoptótico*

2015

2016 Para isso foi utilizado o método TUNEL como indicador de apoptose. Os cortes
2017 foram inicialmente desparafinados e hidratados e, logo em seguida, incubados em PBS
2018 (pH 7,4) por 5 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, a Proteinase K foi
2019 aplicada sobre as lâminas por 15 minutos. As lâminas foram lavadas em água destilada
2020 e incubadas em peróxido de hidrogênio por 5 minutos em temperatura ambiente. Os
2021 cortes foram lavados em PBS e incubados em tampão equilíbrio por 60 minutos a 4 °C.
2022 Depois, os cortes foram incubados em TdT a 37 °C por 1 hora em câmara úmida. Foi
2023 aplicada a solução stop por 10 minutos em temperatura ambiente, em seguida, as
2024 lâminas foram lavadas em PBS e incubadas em anti-digoxigenina. As lâminas foram
2025 enxaguadas em PBS e os cortes revelados com substrato cromogênico
2026 diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation™) (± 20 minutos), sendo contracorados com
2027 hematoxilina por 20 a 30 segundos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água
2028 corrente, desidratadas em concentrações crescentes de álcool e colocadas em xilol para

2029 serem montadas e observadas em microscópio de luz. O índice apoptótico foi
2030 determinado pela contagem da porcentagem de células positivas a partir de, pelo menos
2031 500 núcleos subdivididos em 10 campos escolhidos aleatoriamente utilizando-se a
2032 objetiva de 40X (WU et al., 2013)

2033

2034 *2.9. Análise estatística*

2035

2036 A análise estatística foi realizada em um programa computacional InStat[®], onde
2037 dados foram avaliados por meio de testes não paramétricos de Kruskal-Wallis com post-
2038 hoc de Dunn ($p < 0,05$).

2039

2040 **3. RESULTADOS**

2041

2042 *3.1. Histopatologia e Histoquímica dos fêmures*

2043

2044 No fêmur dos animais de todos os grupos experimentais observa-se
2045 desorganização e inativação do disco epifisário (Figuras 1A, C e E e 2A e C). No grupo
2046 I as características histológicas ósseas apresentaram-se normais (Figura 1A)
2047 principalmente referentes à conformação do osso esponjoso, o qual não mostrou perda
2048 de conectividade trabecular, com presença de osteoblastos e osteócitos ativos,
2049 caracterizados pela presença de espaço entre a lacuna e a matriz óssea (Figura 1B).

2050 Nos fêmures dos animais do grupo II, induzido à osteoporose e não tratado
2051 constatou-se perda da microarquitetura óssea (Figura 1C), notada pela diminuição da
2052 conectividade entre as trabéculas tanto na epífise quanto na diáfise. Na diáfise

2053 observou-se regiões com matriz óssea alterada, demonstrando o processo de osteólise
2054 osteocítica (Figura 1D).

2055 No grupo III, constatou-se áreas de reparação em todo o tecido ósseo. As
2056 trabéculas apresentaram-se delgadas e com melhor conectividade quando comparadas
2057 ao grupo II (Figura 1E), porém observou-se áreas de matriz óssea alterada, mostrando o
2058 processo de remodelação óssea (Figura 1F). Nos fêmures dos animais que receberam as
2059 dosagens de estrógeno simultaneamente ou nós últimos 15 dias (grupos IV e V),
2060 também evidenciou-se recuperação da conectividade trabecular, além da presença de
2061 áreas de matriz óssea alterada, com osteoblastos (Figura 3).

2062 Na análise histoquímica observou-se marcação cálcio positiva em todos os
2063 fêmures dos animais dos grupos experimentais, próximos ao disco epifisário (Figura 3).

2064

2065 3.2. *Análise bioquímica*

2066

2067 As análises bioquímicas apresentaram-se sem alterações significativas, ao 1° dia
2068 de tratamento (Tabela 1). Ao 15° dia as ratas do grupo II e V diferiram estatisticamente
2069 das demais ratas dos grupos experimentais em relação a todos os parâmetros avaliados,
2070 apresentando níveis séricos diminuídos de cálcio, magnésio e osteocalcina e elevação
2071 das taxas de fosfatase alcalina óssea, fosfatase ácida tartarato -resistente e C-
2072 telopeptídeo (Tabela 2). Ao final do tratamento (45° dia) os parâmetros avaliados
2073 permanecem alterados apenas nas ratas do grupo II, diferindo dos demais grupos
2074 experimentais (Tabela 3).

2075

2076 3.3. *Imunohistoquímica - IL6, TNF- α e Teste de Tunel.*

2077

2078 A análise imunohistoquímica para o IL-6, mostrou sem alterações entre os grupos
2079 experimentais (Figura 4). A marcação do fator de necrose tumoral alfa para o fêmur
2080 mostrou elevada marcação no grupo II, diferindo dos demais grupos experimentais. Os
2081 demais grupos equipararam-se com o grupo controle (Figura 5). O índice apoptótico no
2082 fêmur das ratas dos grupos experimentais não apresentou diferenças significativas
2083 (Figura 6).
2084

2085 **Tabela 1:** Média das dosagens séricas das enzimas indicadoras da função óssea nos
 2086 animais dos grupos experimentais, no primeiro dia de tratamento.

Grupos	G I	G II	G III	G IV	G V	P
Cálcio (mg/dL)	9,83 ± 0,91a	10,03 ± 0,71a	9,48 ± 0,43a	10,23 ± 0,61a	9,82 ± 0,90a	0,7904
Magnésio (mg/dL)	3,81 ± 0,08a	3,43 ± 0,17a	3,47 ± 0,13a	3,45 ± 0,09a	3,39 ± 0,10a	0,1649
FA Óssea (U/L)	22,33 ± 9,29a	24,33 ± 14,43a	21,67 ± 9,81a	25,00 ± 12,12a	21,00 ± 6,24a	0,9902
Osteocalcina (mg/dL)	11,00 ± 1,0a	10,33 ± 0,57a	10,67 ± 0,57a	11,00 ± 1,0a	10,67 ± 1,15a	0,8768
TRACP (U/L)	7,81 ± 2,23a	9,08 ± 0,61a	8,91 ± 0,47a	9,46 ± 0,21a	9,50 ± 0,33a	0,3575
CTX- 1 (U/L)	7,81 ± 2,23a	8,09 ± 2,23a	9,37 ± 0,60a	8,59 ± 1,96a	9,33 ± 0,40a	0,7258

2087

2088 Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si
 2089 pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). Fosfatase alcalina óssea
 2090 (FAO), Fosfatase ácida tartarato -resistente (TRAP), C- telopeptídeo (CTX-1).

2091

2092 **Tabela 2:** Média das dosagens séricas das enzimas indicadoras da função óssea nos
 2093 animais dos grupos experimentais, no décimo quinto dia de tratamento.

Grupos	G I	G II	G III	G IV	G V	P
Cálcio (mg/dL)	10,15 ± 0,94a	7,56 ± 0,43b	10,31 ± 0,04a	10,48 ± 0,70a	7,11 ± 0,22b	0,0022
Magnésio (mg/dL)	4,03 ± 0,28a	2,390 ± 0,39b	3,89 ± 0,13a	4,08 ± 0,75a	2,19 ± 0,14b	0,0022
FAO (U/L)	11,33 ± 4,61b	38,00 ± 12,17a	10,33 ± 2,08b	11,67 ± 3,21b	38,67 ± 13,05a	0,0002
Osteocalcina (mg/dL)	12,33 ± 1,52a	7,00 ± 1,00b	11,54 ± 1,52a	10,67 ± 1,52a	6,12 ± 1,0b	0,0018
TRACP (U/L)	9,05 ± 0,81b	12,00 ± 0,70a	8,48 ± 1,26b	8,36 ± 0,10b	12,25 ± 1,10a	0,004
CTX- 1 (U/L)	8,14 ± 0,54b	14,48 ± 2,40a	8,323 ± 1,15b	8,96 ± 0,44b	14,37 ± 2,77a	0,0013

2094

2095 Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si
 2096 pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). Fosfatase alcalina óssea
 2097 (FAO), Fosfatase ácida tartarato -resistente (TRAP), C- telopeptídeo (CTX-1).

2098

2099 **Tabela 3:** Média das dosagens séricas das enzimas indicadoras da função óssea nos
 2100 animais dos grupos experimentais, 45 dias pós-tratamento.

2101

Grupos	G I	G II	G III	G IV	G V	P
Cálcio (mg/dL)	10,03 ± 0,34a	5,56 ± 1,28b	12,33 ± 1,64a	11,15 ± 0,28a	10,32 ± 0,36a	0,0132
Magnésio (mg/dL)	3,85 ± 0,14a	2,22 ± 0,50b	3,44 ± 0,33a	3,35 ± 0,29a	3,34 ± 0,13a	0,0009
FAO (U/L)	20,00 ± 3,46b	38,00 ± 5,00a	22,33 ± 2,88b	15,33 ± 3,78b	21,00 ± 4,35b	0,0004
Osteocalcina (mg/dL)	11,37 ± 0,63a	5,00 ± 1,00b	13,00 ± 1,73a	13,67 ± 0,57a	11,00 ± 1,0a	0,0341
TRACP (U/L)	9,14 ± 0,36b	15,46 ± 2,39a	11,56 ± 1,11b	8,84 ± 1,20b	8,98 ± 1,36b	0,0019
CTX- 1 (U/L)	9,11 ± 0,41b	15,50 ± 4,87a	9,19 ± 0,75b	8,86 ± 1,59b	9,06 ± 0,63b	0,0239

2102 Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si
 2103 pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). Fosfatase alcalina óssea
 2104 (FAO), Fosfatase ácida tartarato -resistente (TRAP), C- telopeptídeo (CTX-1).

2105

2106
2107
2108
2109
2110
2111
2112
2113
2114
2115
2116
2117
2118
2119
2120
2121
2122
2123
2124
2125
2126
2127
2128
2129
2130
2131
2132
2133
2134
2135
2136
2137
2138
2139
2140
2141
2142
2143
2144
2145
2146
2147
2148
2149
2150
2151
2152
2153
2154
2155
2156
2157
2158

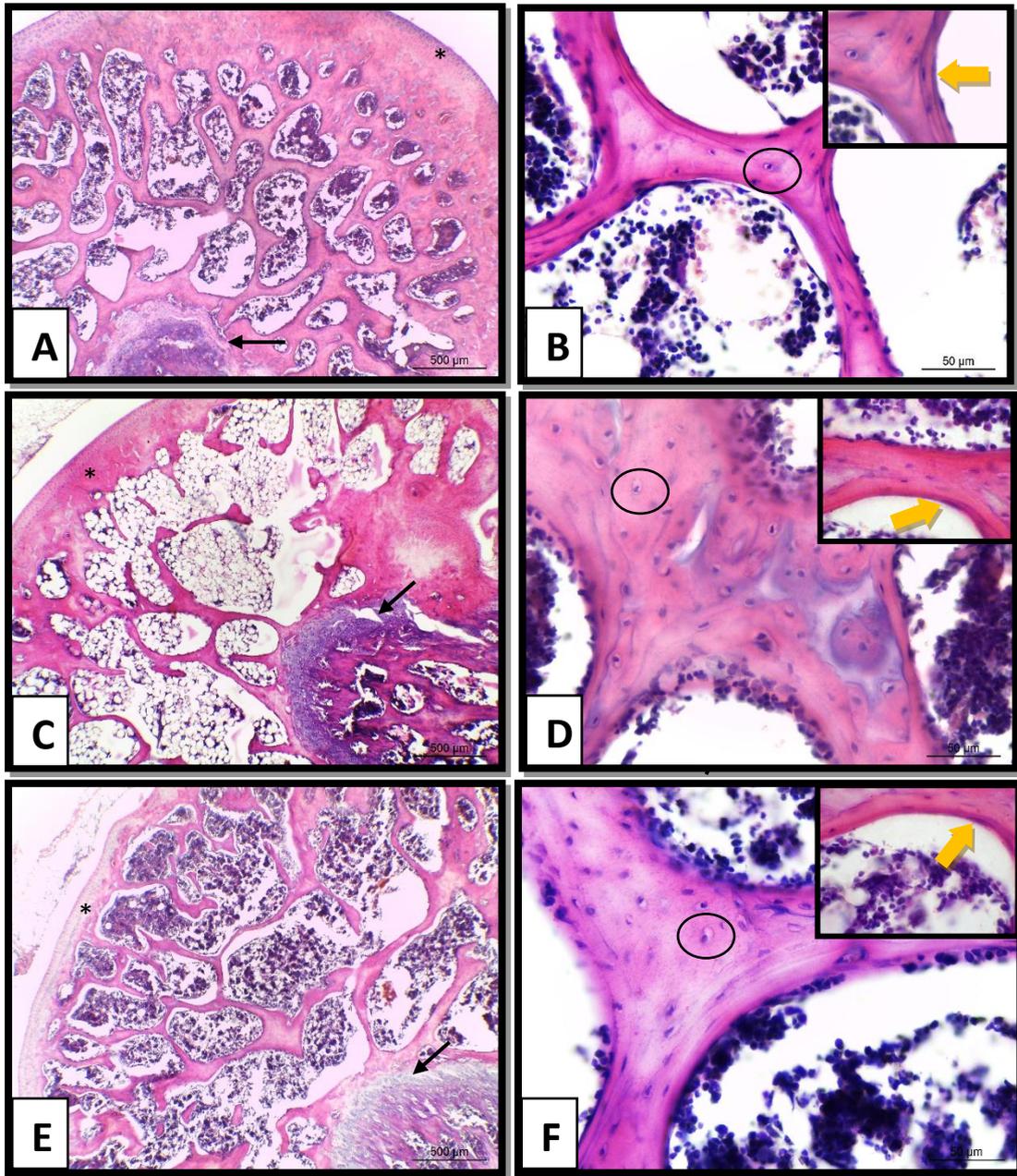


Figura 1: Fêmures dos animais dos grupos I, II e III. A, B – Grupo Controle (I). A – Observar arquitetura óssea preservada. B – Observar presença de osteoblastos (seta amarela) e osteócitos ativos (círculo). C e D – Grupo induzidos à corticoterapia sem tratamento. C - Observar perda de microarquitetura óssea. D – Notar áreas com matriz alterada, desmostrando o processo de osteólise osteocítica (ma). E e F – induzidos à corticoterapia + Alendronato de Sódio simultâneo (Controle Positivo). E - Observar arquitetura óssea preservada. F – Observar trabécula com presença de osteoblastos (seta amarela), osteócitos ativos (círculo) e matriz alterada (ma). Coloração H.E. Asterístico – Cartilagem articular; Seta curta – Inativação do disco epifisário.

2159
2160
2161
2162
2163
2164
2165
2166
2167
2168
2169
2170
2171
2172
2173
2174
2175
2176
2177
2178
2179
2180
2181
2182
2183
2184
2185

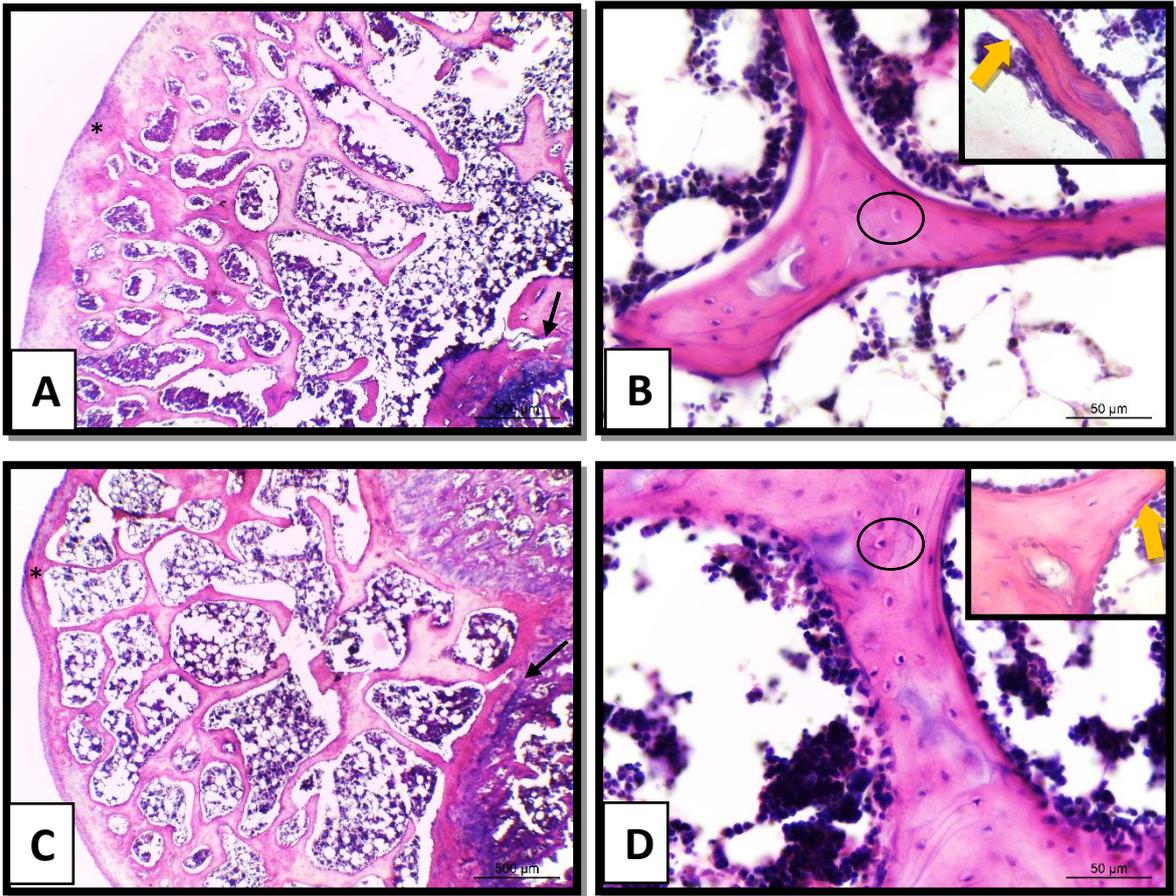


Figura 2: Fêmures dos animais dos grupos IV e V. A e B – induzidos à corticoterapia + estrógeno simultâneo. A - Observar perda da microarquitetura óssea. B – Observar osteoblastos (seta amarela), osteócitos ativos (círculo) e áreas de matriz alterada (ma). Coloração H.E. C e D – induzidos à corticoterapia + estrógeno últimos 15 dias). C - Observar arquitetura óssea preservada. D – Observar osteoblastos (seta amarela), osteócitos (círculo) e áreas de matriz alterada (ma). Coloração H.E. Asterístico – Cartilagem articular; Seta curta – Inativação do disco epifisário.

2186

2187

2188

2189

2190

2191

2192

2193

2194

2195

2196

2197

2198

2199

2200

2201

2202

2203

2204

2205

2206

2207

2208

2209

2210

2211

2212

2213

2214

2215

2216

2217

2218

2219

2220

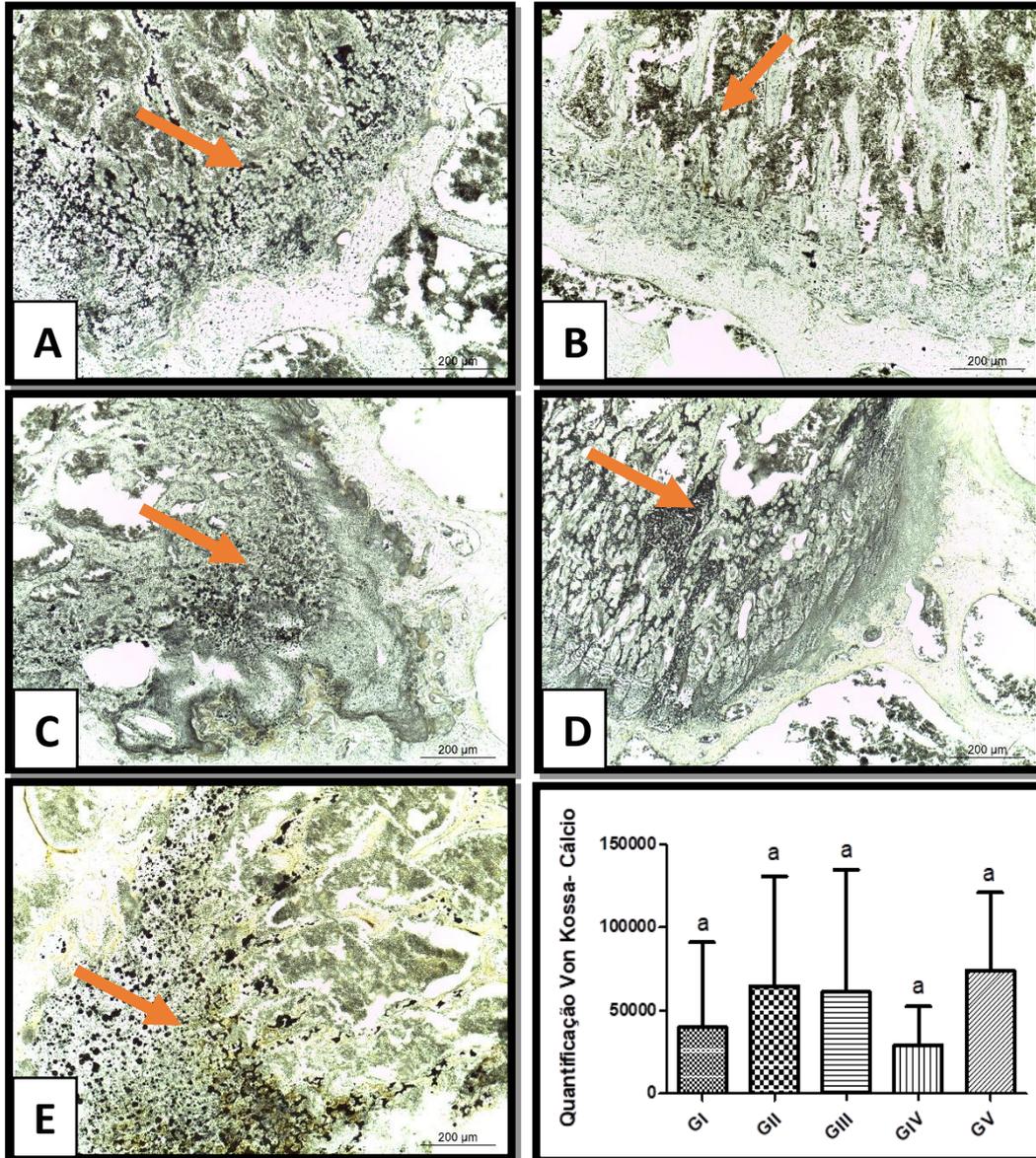
2221

2222

2223

2224

2225



2226

2227

2228

2229

2230

2231

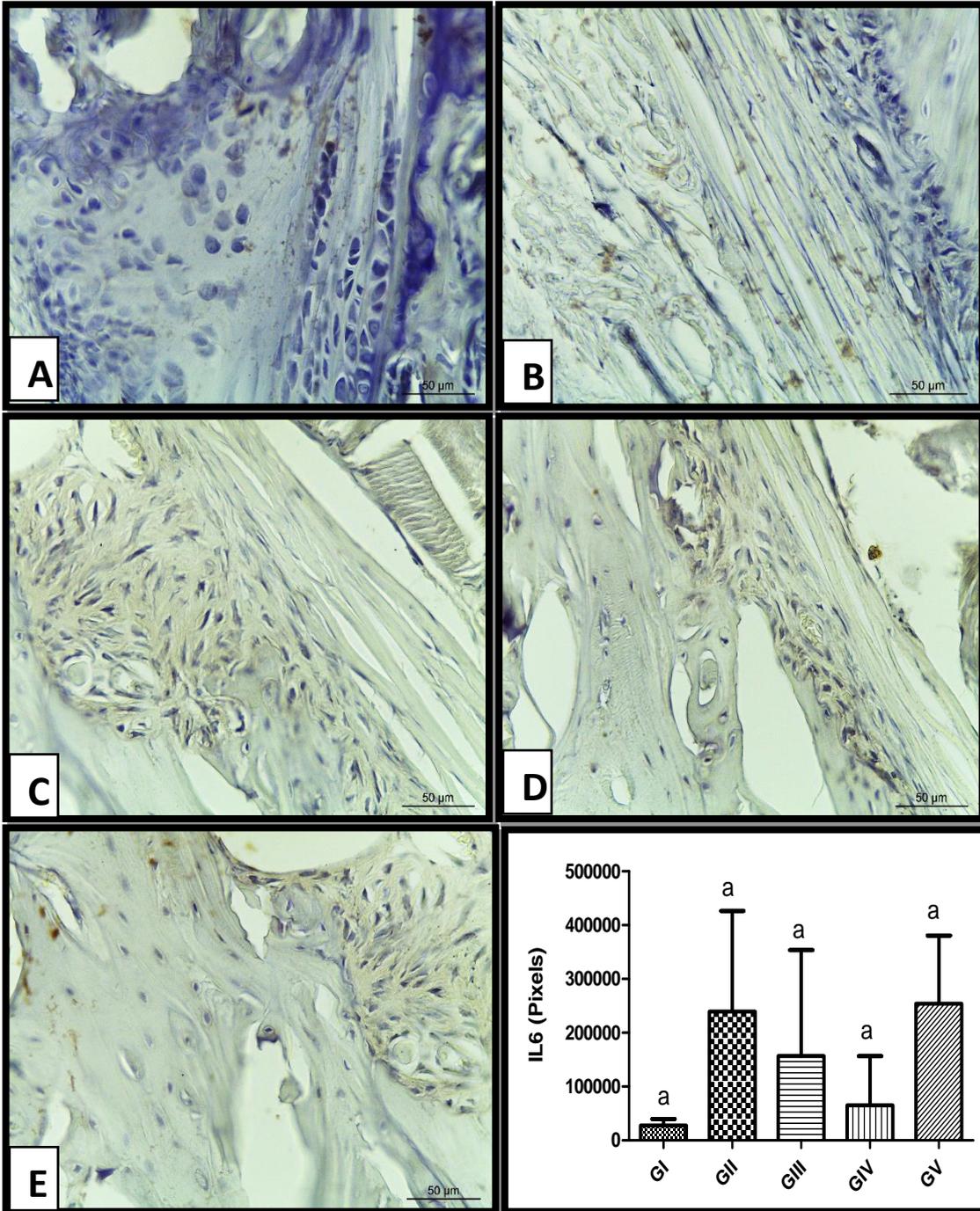
2232

2233

Figura 3: Detecção de Cálcio nos fêmures dos animais dos grupos experimentais. A – Grupo controle (I). Evidenciar grande depósito de cálcio junto ao centro de ossificação; B – Grupo induzidos à corticoterapia sem tratamento. C – induzidos à corticoterapia + alendronato de sódio simultâneo (Controle Positivo); D – induzidos à corticoterapia + estrógeno simultâneo; E – induzidos à corticoterapia + estrógeno últimos 15 dias, evidenciar grande depósito de cálcio junto ao centro de ossificação. Coloração Von Kossa.. Setas – Marcação positiva para cálcio.

2234

2235
2236
2237
2238
2239
2240
2241
2242
2243
2244
2245
2246
2247
2248



2249
2250
2251
2252
2253
2254
2255
2256
2257
2258
2259
2260
2261
2262
2263
2264
2265
2266
2267
2268
2269
2270
2271
2272
2273
2274
2275
2276
2277
2278
2279
2280

2281 **Figura 4:** Imunohistoquímica e quantificação do IL-6 no fêmur. A: GI – controle; B:
2282 GII– induzidos à corticoterapia sem tratamento; C: GIII– induzidos à corticoterapia +
2283 alendronato de sódio simultâneo; D: GIV- induzidos à corticoterapia + tratamento com
2284 estrógeno simultâneo; E: GV - induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno
2285 nos últimos 15 dias; F – Quantificação em pixels da expressão do fator IL- 6. Médias
2286 seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-
2287 Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).
2288

2289

2290

2291

2292

2293

2294

2295

2296

2297

2298

2299

2300

2301

2302

2303

2304

2305

2306

2307

2308

2309

2310

2311

2312

2313

2314

2315

2316

2317

2318

2319

2320

2321

2322

2323

2324

2325

2326

2327

2328

2329

2330

2331

2332

2332

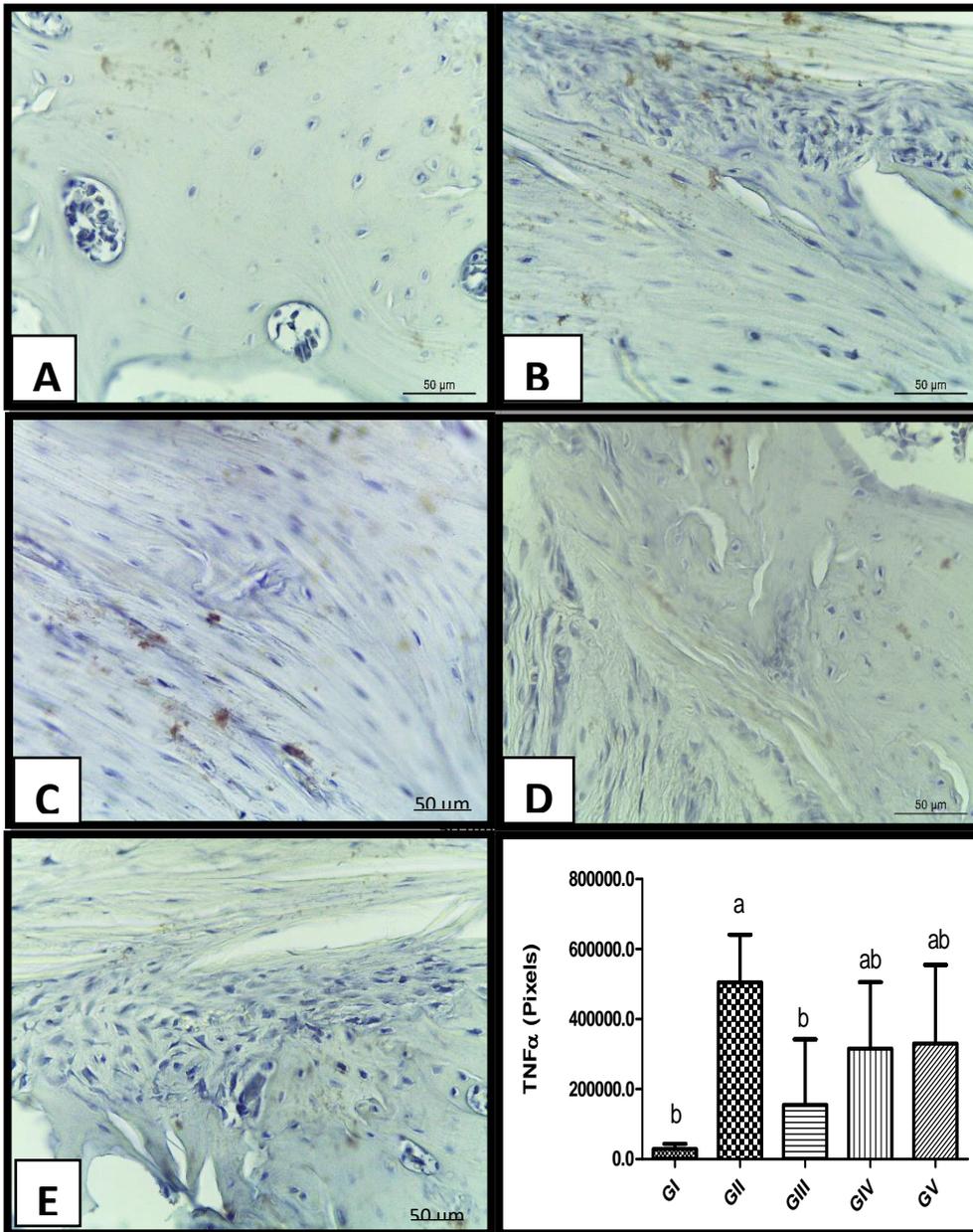


Figura 5: Imunohistoquímica e quantificação do TNF- α no fêmur. A: GI – controle; B: GII– induzidos à corticoterapia sem tratamento; C: GIII– induzidos à corticoterapia + alendronato de sódio simultâneo; D: GIV- induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno simultâneo; E: GV - induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno nos últimos 15 dias; F – Quantificação em pixels da expressão do fator TNF α . Notar aumento significativo dos pixels nos grupos GII em relação aos outros. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

2333

2334

2335

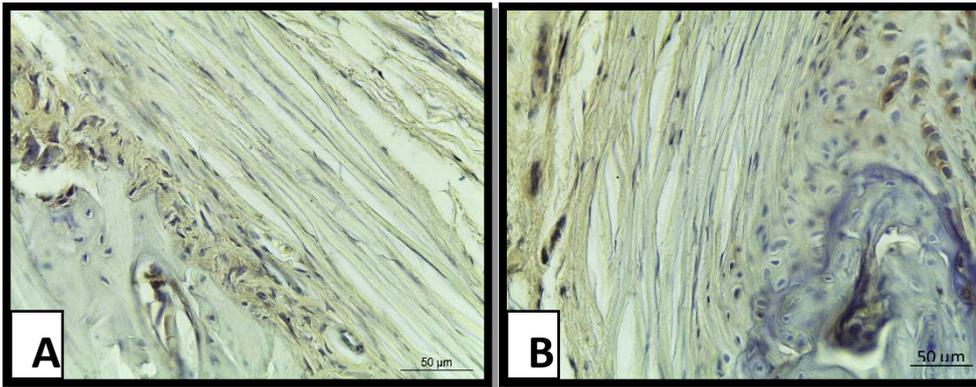
2336

2337

2338

2339

2340



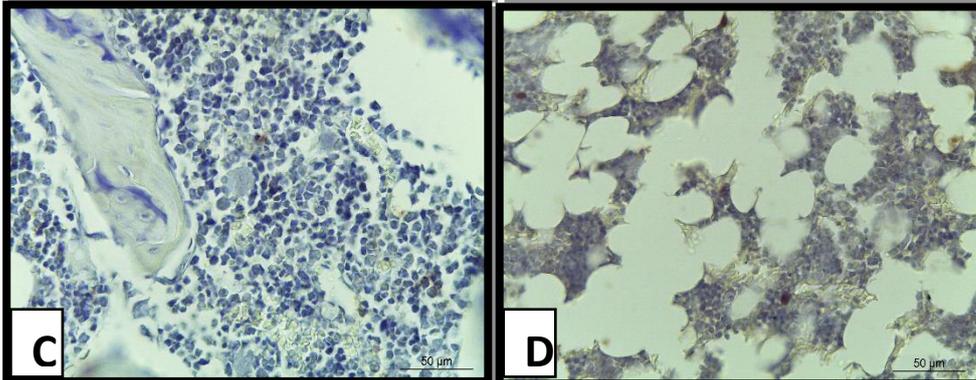
2341

2342

2343

2344

2345



2346

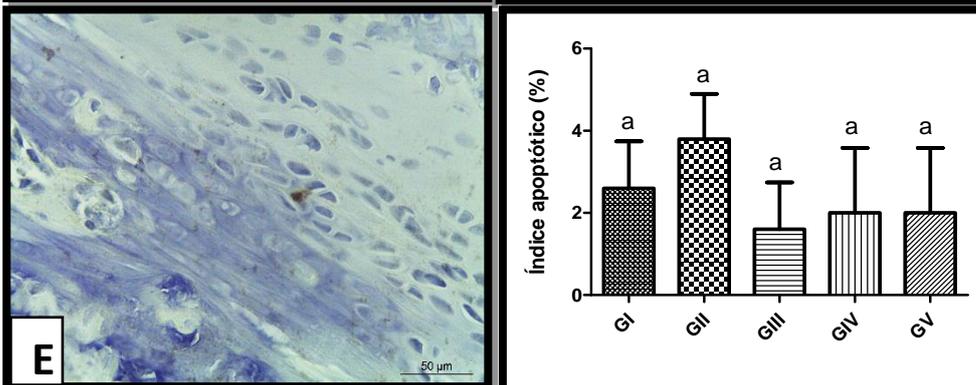
2347

2348

2349

2350

2351



2352

2353

2354

2355

2356

2357

2358

Figura 6: Índice apoptótico no fêmur. A: GI – controle; B: GII– induzidos à corticoterapia sem tratamento; C: GIII– induzidos à corticoterapia + alendronato de sódio simultâneo; D: GIV- induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno simultâneo; E: GV - induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno nos últimos 15 dias; F – Quantificação dos núcleos em apoptose. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

2359 4. DISCUSSÃO

2360

2361 A reposição pelo estrógeno vem sendo estudada para tentar minimizar os efeitos
2362 colaterais decorrentes da corticoterapia. O principal impacto do uso prolongado de
2363 glicocorticoides (GC) é no tecido ósseo (BARACHO, et al., 2011). Através da análise
2364 histopatológica, histoquímica, bioquímica e imunohistoquímica não só foi confirmada o
2365 efeito desse hormônio na proteção aos danos causado pelo uso prolongado de GC como
2366 também seu efeito reparador. No fêmur dos grupos tratados com estrógeno tanto
2367 simultaneamente quanto nos últimos 15 dias foi observada recuperação da
2368 conectividade trabecular, com áreas apresentando matriz óssea alterada mostrando que o
2369 tecido estava em remodelação.

2370 Esses efeitos podem ser explicados pela capacidade do estrógeno em inibir a
2371 reabsorção óssea (pelos osteoclastos) e promover a formação de novo tecido ósseo
2372 (estimulando osteoblastos) (FALONI; CERRI, 2007). A via de ação desse hormônio
2373 não está totalmente elucidada, porém acredita-se que esse efeito benéfico sobre o osso
2374 ocorra possivelmente pela ligação aos receptores nos osteoblastos, influenciado pelo
2375 fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) (AMADEI et al., 2006) e atuando
2376 também indiretamente nos osteoclastos, via receptor, diminuindo seu recrutamento e
2377 sua atividade reabsortiva (STEEVE et al., 2004). Isso poderia justificar o efeito de
2378 prevenção pelo estrógeno encontrado neste trabalho, pois mostra que ele é capaz de
2379 estimular a formação óssea e/ou inibir a reabsorção óssea e contribuir para a
2380 homeostasia do tecido.

2381 Montilla; Marucci (2004) em uma pesquisa avaliando o efeito da reposição
2382 hormonal pelo estrógeno em pacientes que recebem GC, mostraram que a reposição

2383 consegue prevenir a perda óssea a curto prazo. Esse trabalho ainda demonstra que a
2384 melhora tende a desaparecer com a supressão da reposição pelo estrógeno, pois ocorre
2385 uma perda acelerada de massa óssea. Os autores sugerem que essa reposição deve ser
2386 prolongada. O que foi mostrado no presente trabalho.

2387 Um parâmetro bastante utilizado para avaliar a homeostasia do tecido ósseo é a
2388 análise bioquímica. A matriz óssea é formada por elementos orgânicos (fibras
2389 colágenas, proteoglicanos e glicoproteínas) e elementos inorgânicos que constituem
2390 cerca de 50% da matriz óssea, como íons fosfato, cálcio, bicarbonato, magnésio,
2391 potássio, sódio e citrato. Fosfato e cálcio são mais abundantes que os demais elementos
2392 inorgânicos e formam cristais que têm a estrutura da hidroxiapatita (LERNER, 2000).
2393 Isso explicaria a marcação de cálcio pela histoquímica em todos os grupos
2394 experimentais, já que o cálcio é um componente importante do tecido ósseo.

2395 O paratormônio (PTH) regula as concentrações séricas de cálcio por ações
2396 diretas nos ossos e nos rins e ações indiretas no intestino, aumentando a síntese de
2397 calcitriol (1,25(OH)2D3). As ações do PTH no osso variam de acordo com as suas
2398 concentrações plasmáticas. Em níveis fisiológicos, esse hormônio tem um efeito ósseo
2399 anabólico. Já a sua secreção contínua e/ou aumentada apresenta efeito catabólico,
2400 ocorrendo perda de massa óssea (BEDANI; ROSSI, 2005). Pesquisas afirmam que o
2401 estrógeno, assim como as drogas anti-reabsorvitivas (Alendronato de Sódio), tem ação
2402 direta no osso e ações indiretas via PTH, vitamina D e calcitonina (LANZILLOTTI et
2403 al., 2003). Corroborando assim com os nossos resultados, onde os grupos que
2404 receberam doses de estrógeno conseguiram reverter a níveis normais as concentrações
2405 de cálcio ao final do tratamento.

2406 A literatura relata que alterações nos níveis de magnésio raramente ocorrem como
2407 um fenômeno isolado. Geralmente são acompanhadas por desordens no metabolismo do
2408 potássio, cálcio e fósforo e são bastante comuns nos quadros de osteoporose induzida
2409 por GC, como relata Amorim; Tirapegui (2008). Isso aconteceu no presente trabalho,
2410 onde os níveis de cálcio e magnésio apresentaram diminuídos durante a corticoterapia e
2411 após a reposição hormonal simultânea e nos últimos 15 dias com estrógeno houve uma
2412 melhora nesses íons a níveis normais ao final do tratamento.

2413 Outro parâmetro para avaliar a homeostasia do tecido ósseo, são os marcadores de
2414 formação e reabsorção. Para avaliar o estado de formação óssea, foi realizado a
2415 dosagem de fosfatase alcalina óssea (FAO) e calcitonina. A FAO é uma enzima
2416 produzida somente pelos osteoblastos e essencial para mineralização (SARAIVA,
2417 LAZARETTI-CASTRO, 2002). Já a osteocalcina é um peptídeo secretado pelos
2418 osteoblastos maduros, condrócitos hipertrofiados e odontoblastos. Apesar de ser
2419 primariamente depositada na matriz óssea recém-formada, uma pequena fração entra em
2420 circulação, caracterizando esta proteína como marcador da atividade osteoblástica. Esse
2421 trabalho demonstrou que os grupos que receberam corticoterapia houve um aumento da
2422 FAO a partir do 15 dia de tratamento e uma diminuição da osteocalcina. Enquanto que o
2423 grupo que recebeu reposição de estrógeno houve uma recuperação da taxa de formação
2424 óssea ao final do experimento. Resultados semelhantes foram encontrados por Saraiva;
2425 Castro; Richard, (2002), que revelaram que os estrógeno é capaz de reduzir a reabsorção
2426 óssea de maneira dose dependente, principalmente por estimular a atividade
2427 osteoblástica.

2428 Para confirmar o estado de equilíbrio do tecido ósseo, foi realizada a dosagem da
2429 fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP) e C- telopeptídeo. A TRAP é uma enzima

2430 liberada pelos osteoclastos, mas também é derivada de eritrócitos e o C-telopeptídeo é
2431 um produto da degradação do colágeno. São considerados atualmente como os mais
2432 sensíveis marcadores de reabsorção óssea (KLEIN, 2015). Nesse trabalho verificou-se
2433 que os animais que receberam apenas a corticoterapia exibiram um aumento
2434 significativo nos níveis de TRAT e CTx, enquanto que os que receberam o estrógeno
2435 apresentaram uma melhora nesses níveis ao final do experimento. Isso comprova o
2436 papel protetor do estrógeno, em inibir a reabsorção óssea. Delmas et al. (2000)
2437 avaliaram quatro marcadores de reabsorção óssea (TRAT, fosfatase alcalina óssea, CTx
2438 urinário e sérico) em 569 mulheres osteoporóticas e osteoporóticas tratadas por 2 anos
2439 com estrógeno. A taxa de redução de todos os marcadores correlacionou-se
2440 negativamente com o ganho de massa óssea, sendo os CTx os que apresentaram
2441 melhores correlações. Mostraram ainda que o estrógeno foi eficaz em diminuir o nível
2442 desses marcadores, demonstrando assim que esse hormônio consegue atuar inibindo a
2443 reabsorção, o que foi também verificado no presente trabalho.

2444 Confirmando o resultado dos marcadores ósseos temos as citocinas. Os trabalhos
2445 evidenciam que a IL-1 e 6 consigam estimular a formação óssea por atuar nos
2446 receptores osteoblásticos, enquanto que o TNF- α atua a nível osteoclástico e consiga
2447 inibir a reabsorção óssea (SERRA, ROGANOVICH, RIZZO, 2012). O que poderia
2448 explicar o aumento na marcação de TNF- α para grupo que recebeu a corticoterapia
2449 mostrando que o corticoide aumenta os níveis de reabsorção e com isso ocasiona um
2450 desequilíbrio no tecido ósseo. O que não acontece no grupo que recebeu a reposição
2451 pelo estrógeno, possivelmente pela capacidade de inibir a reabsorção óssea prevenindo a
2452 liberação desses fatores de crescimento. O que foi mostrado nesse trabalho, pela não
2453 alteração da IL-6 e TNF nos grupos IV e V. Confirmando esses achados, Girassole et al.

2454 (2000) demonstraram um efeito do estrógeno em reduzir os níveis de IL-6 basais, após
2455 estímulo com IL-1 e TNF- α em células estromais da medula óssea em camundongos.

2456 Análises evidenciam a capacidade de algumas citocinas e hormônios, como o
2457 estrógeno de atuar nos receptores RANK/OPG que estão presentes no tecido ósseo e
2458 assim conseguir inibir a apoptose dos osteoclastos (STEEVE et al., 2004). Justificando
2459 assim a não alteração dos níveis de apoptose e ainda explicar o poder de recuperação
2460 desse hormônio em minimizar os danos da corticoterapia.

2461

2462 **4. CONCLUSÃO**

2463

2464 Concluiu-se que o estrógeno atuou como uma alternativa eficiente na prevenção e
2465 reparação dos danos colaterais decorrentes da corticoterapia no tecido ósseo pela análise
2466 histopatológica, bioquímica e imunohistoquímica.

2467

2468 **5. REFERÊNCIAS**

2469

2470 ADAM, J. E. Quantitative computed tomography. **Eur. J Radiol.**, v. 71, p. 415-424,
2471 2009.

2472 AMADEI, S.U. V. A. S. SILVEIRA, A. C. PEREIRA, Y. R. CARVALHO, R. F.
2473 ROCHA. A influencia da deficiência estrogênica no processo de remodelação e
2474 reparação óssea. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v. 42, p. 5-12, 2006.

2475 AMORIM, A.G.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais da relação entre exercício físico,
2476 estresse oxidativo e magnésio. **Revista de Nutrição.** v. 21, n. 5, p. 563-575, 2008.

2477 BARACHO, N. C. V.; PAULA, A. M.; FRANZINI – JÚNIOR, R.; SILVA, R. M. B.;
2478 APPOLARI, B.; IRULEGUI, R. S. C. Avaliação da eficácia de administração de

2479 dexametasona ou metilprednisolona para produzir osteoporose em ratas. **Rev. Bras.**
2480 **Ciênc. Saúde**, v. 1, p. 1-7, 2011.

2481 BEDANI, R.; ROSSI, E. A. O consumo de cálcio e a osteoporose. **Ciênc. Biol. Saúde.**
2482 v. 26, p. 3-14, 2005.

2483 BLAND, R. Steroid hormone receptor expression and action in bone. **Clin. Sci.** v. 98, p.
2484 217-240, 2000.

2485 COMPSTON, J. E. Sex steroids and bone. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 1, p. 419-
2486 47, 2001.

2487 DAMIANI, D.; KUPERMAN, H.; DICHTCHEKENIAN, V.; MANNA, T. D.;
2488 SETIAN, D. Repercussions of corticotherapy: the cost–benefit ratio. **Pediatrics.** v. 1, p.
2489 71-82, 2001.

2490 DEJEAN, C.; RICHARD, D. Mechanisms of action of glucocorticoids. **Rev Med**
2491 **Interne.** V. 34, n. 5, p. 264-268, 2013.

2492 DELMAS, P. D.; HARDY, P.; GARNERO, P.; DAIN, M. P. Monitoring individual
2493 response to hormone replacement therapy with bone markers. **Bone.** v. 26, n. 1, p.553-
2494 560, 2000.

2495 ERRANTE, P. R.; MENEZES-RODRIGUES, F. S.; TAVARES, J. G. P.; REIS, M. C.
2496 M.; ICIMOTO, M. Y.; FERRAZ, R. R. N.; CARICATI-NETO, A. Mecanismos de ação
2497 e resistência ao uso de glicocorticoides. **Rev. Pesq. Inov. Farm.** n. 6, v. 2, p. 01-11,
2498 2014.

2499 FALONI, A. P. S.; CERRI, P. S. Mecanismos celulares e moleculares do estrógeno na
2500 reabsorção óssea. **Rev. de Odontologia da UNESP.** v. 36, n.2, p. 181-88, 2007.

2501 GIRASOLE, G.;JILKA, R.L.;PASSERI, G.;BOSWELL, S.; BODER, G.; WILLIAMS,
2502 D. C.; MANOLAGAS, S. C.17b-estradiol inhibits interleukin-6 production by bone
2503 marrow stromal cells and osteoblasts in vitro: a potential mechanism for antiosteoporotic
2504 effect of estrogens. **J Clin Invest.** v. 89, n. 1, p.883 – 891, 2000.

2505 IM, G.; QURESHI, S. A.; KENNEY, J.; RUBASH, H. E.; SHANBHAG, A. S.
2506 Osteoblast proliferation and maturation by biophosphonates. **Biomaterials.** v. 25, p.
2507 4105-4115, 2004. .

2508 KAMANGA-SOLLO, E.; THORNTON, K. J.; WHITE, M. E.; DAYTON, W. Role of
2509 G protein-coupled estrogen receptor-1 in estradiol 17 β -induced alterations in protein
2510 synthesis and protein degradation rates in fused bovine satellite cell cultures. **Domest.**
2511 **Animal Endocrinol.** n. 58, p. 90-96, 2017.

2512 KLEIN, G. L. The effect of glucocorticoids on bone and muscle. **Osteoporosis and**
2513 **Sarcopenia.** V. 1, p. 39-45, 2015.

2514 KNOCH, F.; JAQUIERY, C.; KOWALSKYA, M.; SCHAEREN, S.; ALABRE, C.;
2515 MARTIN, I.; RUBASH, H. E.; SHANBHAG, A. S. Effects of bisphosphonates on
2516 proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells.
2517 **Biomaterials**, n. 26, p. 6941-6949, 2005.

2518 LANZILLOTTI, H. S.; LANZILLOTTI, R. S.; TROTTE, A. S. D.; DIAS, A. S.;
2519 BORNAND, B.; COSTA, E. A. M. M.. Osteoporose em mulheres na pós-menopausa,
2520 cálcio dietético e outros fatores de riscos. **Rev. Assoc. Méd. Bras. Univers. de São**
2521 **Paulo**, v.1 n.1, p.182-191, 2003

2522 LEEM, K.; PARK, S. K.; LEE, D. H.; KIM, H. Lovastatin increases longitudinal bone
2523 growth and bone morphogenetic protein-2 levels in the growth plate of Sprague –
2524 Dawley rats. **Eur. J. Pediatr.** v. 161, p. 406-407, 2002.

2525 LERNER, U. H. Osteoclast formation and resorption. **Matrix Biol.**, v. 19, p. 107- 120,
2526 2000.

2527 LONGUI, C. A. Glucocorticoid therapy: minimizing side effects. **J. Pediatr.** v. 83, p.
2528 163-171, 2007.

2529 LONGUI, C. A.; SANTOS, M. C.; FORMIGA C. B.; OLIVEIRA, D. V.; ROCHA M.
2530 N.; FARIA C. D. Antiproliferative and apoptotic potencies of glucocorticoids:
2531 nonconcordance with their anti-inflammatory and immunosuppressive properties. **Arq.**
2532 **Bras. Endocrinol. Metabol.** n. 49, n.1, p. 378-383, 2005.

2533 MONTILLA, R. das N. G.; MARUCCI, M. de F. N. Relação cálcio/proteína da dieta de
2534 mulheres climatéricas. **Rev. Assoc. Méd. Bras. Univers. de São Paulo**, v.1 n.1,p.52-54,
2535 out./nov. 2004.

- 2536 OH, S. M.; CHUNG, K. H. Estrogenic activities of *Ginkgo biloba* extracts. **Life Sci.**, v.
2537 74, n. 11, p. 1325-1335, 2008.
- 2538 PEREIRA, A. L. C.; BOLZANI, F. C. B.; STEFANI, M.; CHARLIN, R. Uso sistêmico
2539 de corticosteroids: revisão de literature. **Med. Cutan. Iber Lat Am.** v. 35, n. 1, p. 35-
2540 50, 2007.
- 2541 RHODUS, N. L.; CHENG, B.; BOWLES, W.; MYERS, S.; MILLER, L.; ONDREY, F.
2542 Proinflammatory cytokine levels in saliva before and after treatment of (erosive) oral
2543 lichen planus with dexamethasone. **Oral Dis.** v.12, n.2, p. 112-116, 2006.
- 2544 SARAIVA, G. L.; LAZARETTI-CASTRO, M. Biochemical markers of bone
2545 remodeling in clinical practice. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v. 46, n.1, p. 72-78,
2546 2002.
- 2547 SCHIMMER, B. P.; PARKER, K. L. Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical
2548 steroids and their synthetic analogs; inhibitors of the synthesis and action of adrenocortical
2549 hormones. **Therapeutics.** v. 11, p. 1587-1612, 2007.
- 2550 SEGURO, L. P.; ROSARIO, C.; SHOENFELD, Y. Long-term complication of past
2551 glucocorticoid use. **Autoimmun Ver.** n. 12, v. 5, p. 629–632, 2013.
- 2552 SERRA H. A., ROGANOVICH JM, RIZZO L. F. Glucocorticoides: paradigma
2553 medicina transnacional. De lo molecular al uso clínico. **Medicina (Buenos Aires).** v. 72,
2554 n. 1, p. 158-170, 2012.
- 2555 SOUZA, M. C.; ASSEMANY, F. S.; LIMA, A. T. C.; SOUZA, R. F. Glicocorticoides e
2556 osteoporose – Artigo de revisão. **Rev. Ciênc. Med. Biol.**, v. 9, supl. 1, p. 57-64, 2010.
- 2557 STEEVE, K. T.; MARC, P.; SANDRINE, T.; DOMINIQUE, H.; YANNIC, F. IL-6,
2558 RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. **Citokine**
2559 **Growth Factor Rev.** v. 15, p. 49-60, 2004.
- 2560 TANIZAWA, T.; YAMAGUCHI, A.; UCHIYAMA, Y.; MIYAURA, C.; IKEDA, T.;
2561 EJIRI, S.; NAGAI, Y.; YAMATO, H.; HURAYAMA, H.; SATO, M. T.;
2562 NAKAMURA, T. Reduction in bone formation and elevated bone resorption in
2563 ovariectomized rats with special reference to acute inflammation. **Bone.** v. 68, p. 43-53,
2564 2000.

- 2565 TRIVEDI, S.; KUMAR, A.; KUMAR, J. A.; SIDDIQUI, G.; SWARNKAR, V.;
2566 GUPTA, A.; KENDURKER, A. K.; DWIVEDI, J. R.; ROMERO, N. Chattopadhyay,
2567 Kaempferol has osteogenic effect in ovariectomized adult Sprague-Dawley rats, **Mol.**
2568 **Cell. Endocrinol.** v. 289, n.1, p. 85-93, 2008.
- 2569 TURNER, C. H.; ROBLING, A. Mechanical loading and bone formation. **Bonekey-**
2570 **Osteovision**, v. 1, n. 9, p. 15-23, 2004
- 2571 VAN RAALTE, D. H.; DIAMANT, M. Steroid diabetes: from mechanism to treatment?
2572 **Neth J Med.** v. 72, n.2, p. 62-72, 2014.
- 2573 WATTEL, A.; KAMEL, S.; MENTAVERRI, R. Ptent inhibitory effect of naturally
2574 occurring flavonoids quecetin and kaempferol on in vitro osteoclastic bone resorption.
2575 **Biochem. Pharmacol.**, v 65, n. 1, p. 35-42, 2003.
- 2576 YAMAGUCHI, M.; HAMAMOTO, R.; UCHIYAMA, S.; ISHIYAMA, R. Effects of
2577 flavonoid on calcium content in femoral tissue culture and parathyroid hormone-
2578 stimulated osteoclastogenesis in bone marrow culture in vitro. **Mol. Cell. Biochem.** v.
2579 303, p. 83-88, 2007..
- 2580 YAZBEK, M. A.; NETO, J. F. M. Osteoporosis and other metabolic bone diseases in
2581 older people. **Einstein.** V. 6 , N. 1, P. 74-78, 2008.