



**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 cápsula 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

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

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

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

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

Sabe-se que a maioria dos fármacos tem seus efeitos terapêuticos explicados através da ligação a receptores específicos. A administração concomitante de fármacos e medicamentos fitoterápicos pode alterar os níveis de resposta a esses receptores, provocando a ampliação ou redução do efeito farmacológico esperado, devido ao sinergismo ou antagonismo, respectivamente (IZZIO; ERNST, 2001). Porém, não há estudos quanto aos 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

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Glicocorticoídes

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

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

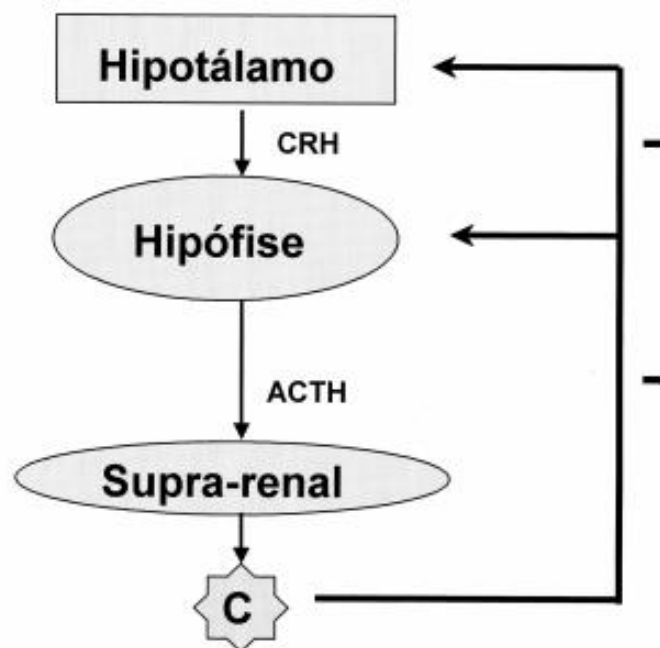


Figura 1. Representação esquemática da regulação da secreção de cortisol, com as alças de “feed-back” em nível de hipófise e de hipotálamo (DAMIANI, et al., 2001).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.1.1 Mecanismo de ação do fármaco glicocorticoide

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

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

O modo pelo qual o glicocorticoide atinge seu receptor parece ser devido à difusão passiva através da membrana celular lipídica, não necessitando de transporte específico. A ligação do glicocorticoide 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. Após a translocação para o núcleo, o complexo receptor-glicocorticoide atua na regulação de genes relacionados às citocinas e à apoptose celular por dois mecanismos: 1) ligação a locais específicos no DNA do núcleo, chamados elementos reguladores dos glicocorticoides; e 2) interação com outros fatores de transcrição, como o fator kB, um importante regulador dos genes das citocinas. Isso resulta na expressão alterada de genes específicos e na transcrição de mRNA específicos. As proteínas resultantes induzem a resposta aos glicocorticoides, que pode ser inibidora ou estimuladora, dependendo do gene específico e do tecido afetado (CHARMANDARI; KINO; CHROUSOS, 2004; SERRA; ROGANOVICH; RIZZO, 2012).

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

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

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

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

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

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

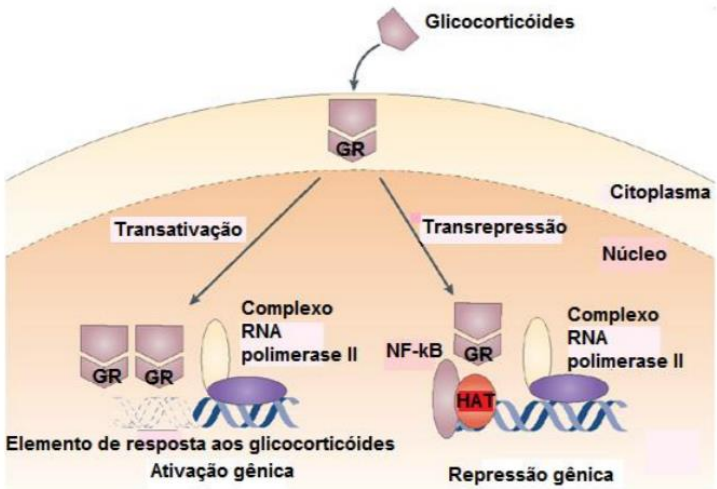


Figura 2: Mecanismo de ação dos glicocorticóides. (ERRANTE et al., 2014)

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

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

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

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

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

A razão pela qual os GC produzem tantos e tão variados efeitos decorre das numerosas ações metabólicas que esse grupo de drogas produz. No metabolismo de hidratos de carbono, os GC antagonizam várias ações periféricas da insulina, tendo potencial diabetogênico: aumentam a resistência à insulina diminuindo a utilização periférica de glicose e promove a 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 mineralocorticoide. 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 mineralocorticoide. Tais aspectos devem ser lembrados quando diante de
329 pacientes que têm dificuldades de lidar com volume, como é o caso de

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

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

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

2.1.3 Efeitos colaterais da corticoterapia

Ao lado de esperados benefícios, há risco de potenciais efeitos adversos, nas quais o mesmo mecanismo de ação dos GC é responsável pela cura e também pelos efeitos colaterais que surgem no decorrer da corticoterapia (FÉLIX, 2006). Existe uma imensa lista de efeitos indesejáveis decorrentes da corticoterapia, em geral relacionados ao tempo de tratamento e uso de GC de ação prolongada. 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).

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

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

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

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

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

2.2 Efeito da corticoterapia sobre os rins

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.3 Efeitos da corticoterapia sobre o tecido ósseo

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

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

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

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

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

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

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

2.4 Efeitos da corticoterapia sobre o fígado

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

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

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

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

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

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

2.5 Estrógeno

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

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

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

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

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

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

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

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

2.6 Indicadores bioquímicos

- **Fígado**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- **Rim**

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

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

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

- **Osso**

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

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

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

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

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

2.7. Resposta inflamatória, imunomodulação e apoptose

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3. REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, A.; IRVING, A. J.; HARVEY, J. Emerging roles for the novel estrogen-sensing receptor GPER1 in the CNS. **Neuropharm.** n. 113, p. 652-660, 2017.
- BARACHO, N. C. V.; PAULA, A. M.; FRANZINI – JÚNIOR, R.; SILVA, R. M. B.; APPOLARI, B.; IRULEGUI, R. S. C. Avaliação da eficácia de administração de dexametasona ou metilprednisolona para produzir osteoporose em ratas. **Rev. Bras. Ciênc. Saúde**, v. 1, p. 1-7, 2011.
- BAVARESCO, L.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A.M.O. Glicocorticóides: Usos clássicos e emprego no tratamento do câncer. **Infarma**, v.17, p.58-60, n.7/9, 2005.
- BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. K. H. **Bioquímica Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 716 p.
- BAZSÓ, A.; SZAPPANOS, A.; PATÓCS, A. B.; GYULA POÓR, A. D.; SHOENFELD, Y.; EMESE, K. The importance of glucocorticoid receptors in systemic lúpus erythaematosus. A systematic review. **Autoimm. Ver.** v.14, p. 349–351, 2015.
- BEHL, C. Estrogen can protect neurons: modes of action. **J. Steroid Biochem. Biol.** v.83, p.195-197, 2003.
- BOLANOWSKI, M.; HALUPCZOK, J.; JAWIARCZYK – PRZBYLOWSKA, A. Pituitary disorders and osteoporosis. **Int. J. Endocrinol.** v. 1, p. 1-7, 2015.
- BOZZINI, C.; CHMPING, G.; ALIPPIN, R. M.; BOZZINI, C. E. Efficacy of dexamethasone on mandibular bone biomechanics in rats during the growth phase as assessed by bending test and peripheral quantitative computerized tomography. **Acta Odontol. Latinoam.** v. 26, n. 1, p. 83-88, 2015.
- BUTTGEREIT F.; SAAG K. G.; CUTOLO, M.; DA SILVA, J. A.; BIJLSMA, J. W. The molecular basis for the effectiveness, toxicity and resistance to glucocorticoids: focus on the treatment of rheumatoid arthritis. **Scand J. 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 con-trol 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.; ASSEMAN, 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 diagnostico 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

Ação estrogênica no tecido renal e hepático após corticoterapia prolongada

Hilda Michelly Paiva dos Santos¹; Álvaro Aguiar Coelho Teixeira¹; Valéria Wanderley
Teixeira^{1 *}

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia
Animal, Recife, Brasil

*Autor para correspondência: UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois
Irmãos-Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389
E-mail: valeria.wanderley@ufrpe.br (WANDERLEY-TEIXEIRA V.)

RESUMO

Os glicocorticoides são drogas amplamente usadas em função de seu amplo efeito no tratamento de doenças reumáticas e inflamatórias. Contudo, seu uso é muitas vezes limitado por numerosas reações adversas. O presente artigo teve por objetivo analisar a associação de estrógeno na corticoterapia prolongada sobre parâmetros histopatológicos, bioquímicos e imunohistoquímicos no fígado e rins em ratas. 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. A análise histopatológica revelou no fígado das ratas do grupo II alterações estruturais 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. 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 tanto no fígado quanto nos rins. O índice de apoptose mostrou-se inalterado no fígado das ratas. Os rins das ratas do grupo III mostrou maior marcação para o teste de túnel. Com isso conclui-se que o estrógeno atua de forma protetora e reparadora contra os danos hepáticos e renais decorrentes da corticoterapia por período prolongado.

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

ABSTRACT

Glucocorticoids are drugs widely used because of their wide effect in the treatment of rheumatic and inflammatory diseases. However, its use is often limited by numerous adverse reactions. The present article aimed to analyze the association of estrogen in prolonged corticosteroid therapy on histopathological, biochemical and immunohistochemical parameters in the liver and kidneys in rats. For this, 35 albino rats, 90 days old, were 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. Corticosteroids were induced by injections of 2 mg / mL Decadron® intramuscularly. Histopathological analysis revealed in the liver of the rats of group II structural alterations characterized by the presence of multifocal nodules in the hepatic parenchyma, diffuse cellular vacuolization and congestion of sinusoids. The kidney showed no histopathological changes, but showed a decrease in the glomerular area, Bowman's capsule area, glomerular volume and Bowman's capsule volume by morphometric analysis. At the end of the treatment (45th day) the biochemical parameters evaluated were only increased in the rats of group II with the exception of HDL that remained reduced throughout the experimental period. The markers for IL-6 and TNF- α were more intense in the rats of group II in both the liver and the kidneys. The rate of apoptosis was unchanged in the liver of the rats. The kidneys of the rats of group III showed greater marking for the tunnel test. With this, it is concluded that estrogen acts in a protective and reparative way against the hepatic and renal damages resulting from corticosteroid therapy for a prolonged period.

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

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais e grupos experimentais

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

Grupo I – ratas que receberam placebo (CONTROLE);

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

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

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

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

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

2.2. Corticoterapia

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

2.3. Tratamento com estrógeno

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

2.4. Administração de Alendronato de Sódio

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

2.5 *Análise Bioquímica*

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

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

2.6. *Análise histopatológica*

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

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

2.5. *Morfometria Renal*

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

2.6 *Imunohistoquímica (IL6 e TNF- α)*

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

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

2.7. Índice apoptótico

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

2.8. Análise estatística

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

3. RESULTADOS

3.1. Histopatologia

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

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

3.2. Morfometria renal

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

3.2. Análise bioquímica

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

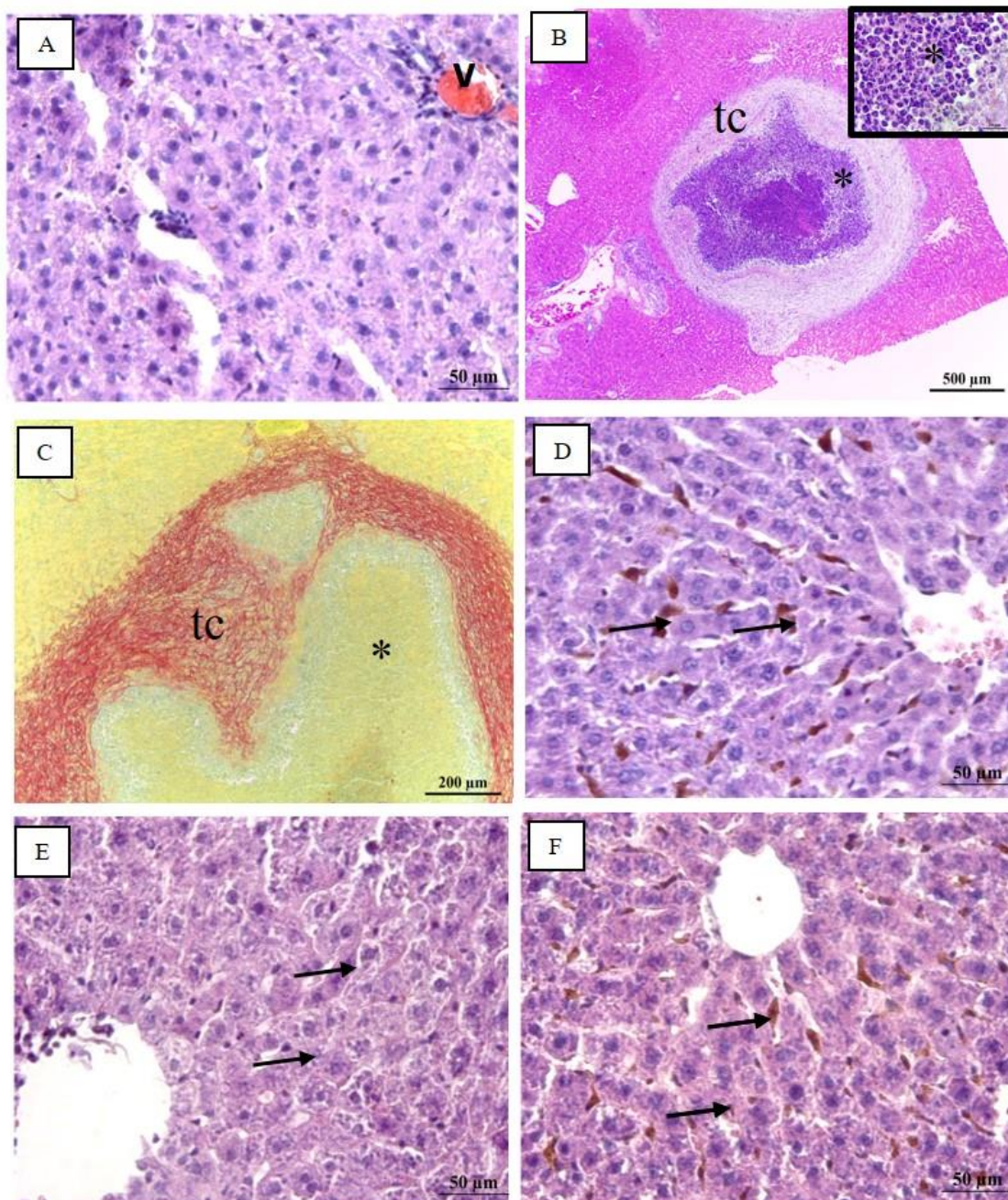
3.3. Imunohistoquímica - IL6 e TNF- α

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

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

3.4. Índice apoptótico

O índice apoptótico no fígado das ratas dos grupos experimentais não apresentou diferenças significativas (Figura 7). A marcação para a apoptose renal mostrou que as ratas do grupo III apresentaram aumento significativo, quando comparado aos outros 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

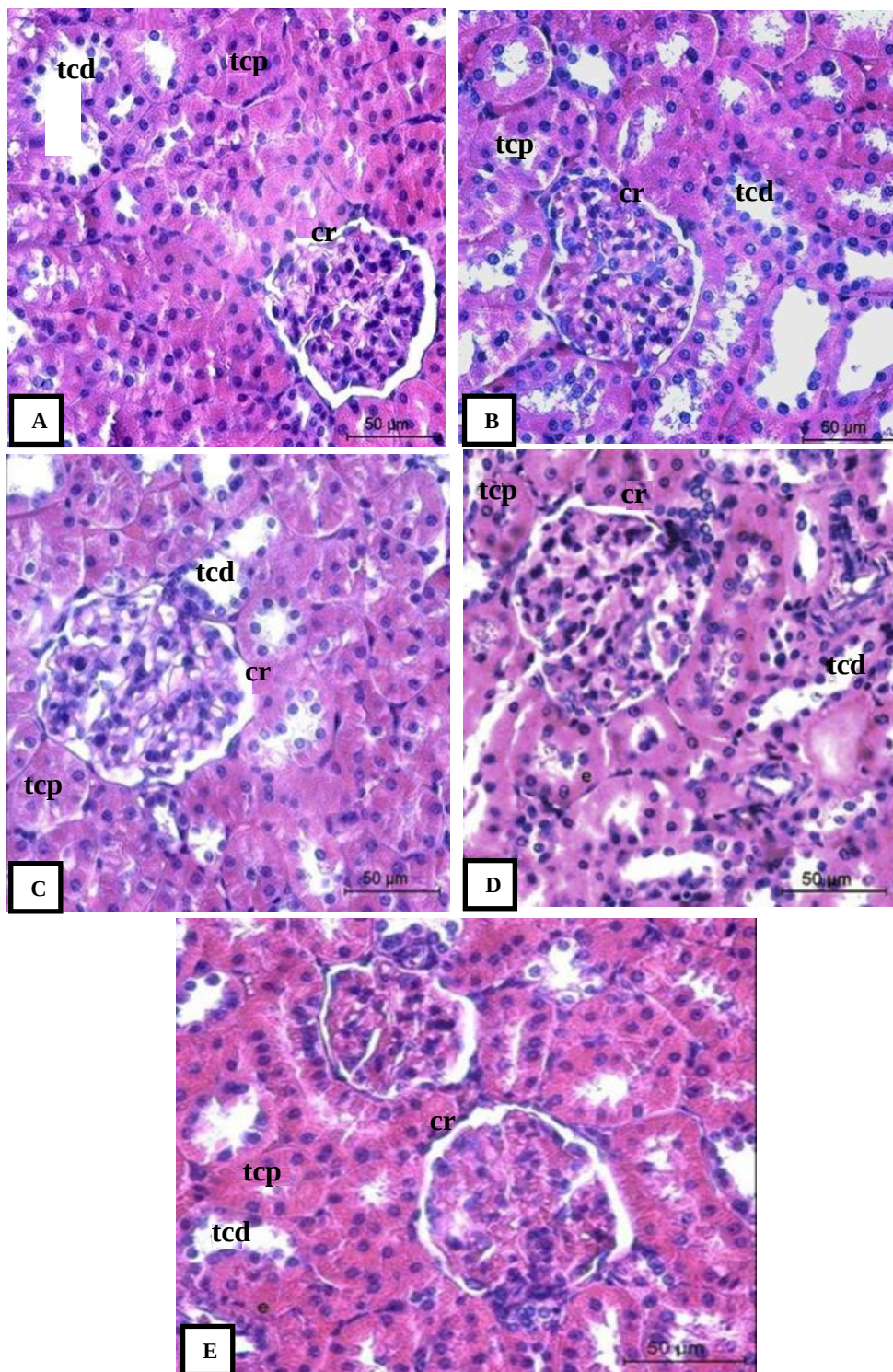


Figura 2: Rim das ratas dos grupos experimentais. A – controle; B – induzidos à corticoterapia sem tratamento; C – induzidos à corticoterapia + alendronato de sódio simultâneo; D - induzidos à corticoterapia + estrógeno simultâneo; E - induzidos à corticoterapia + estrógeno últimos 15 dias. tcd – túbulo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

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

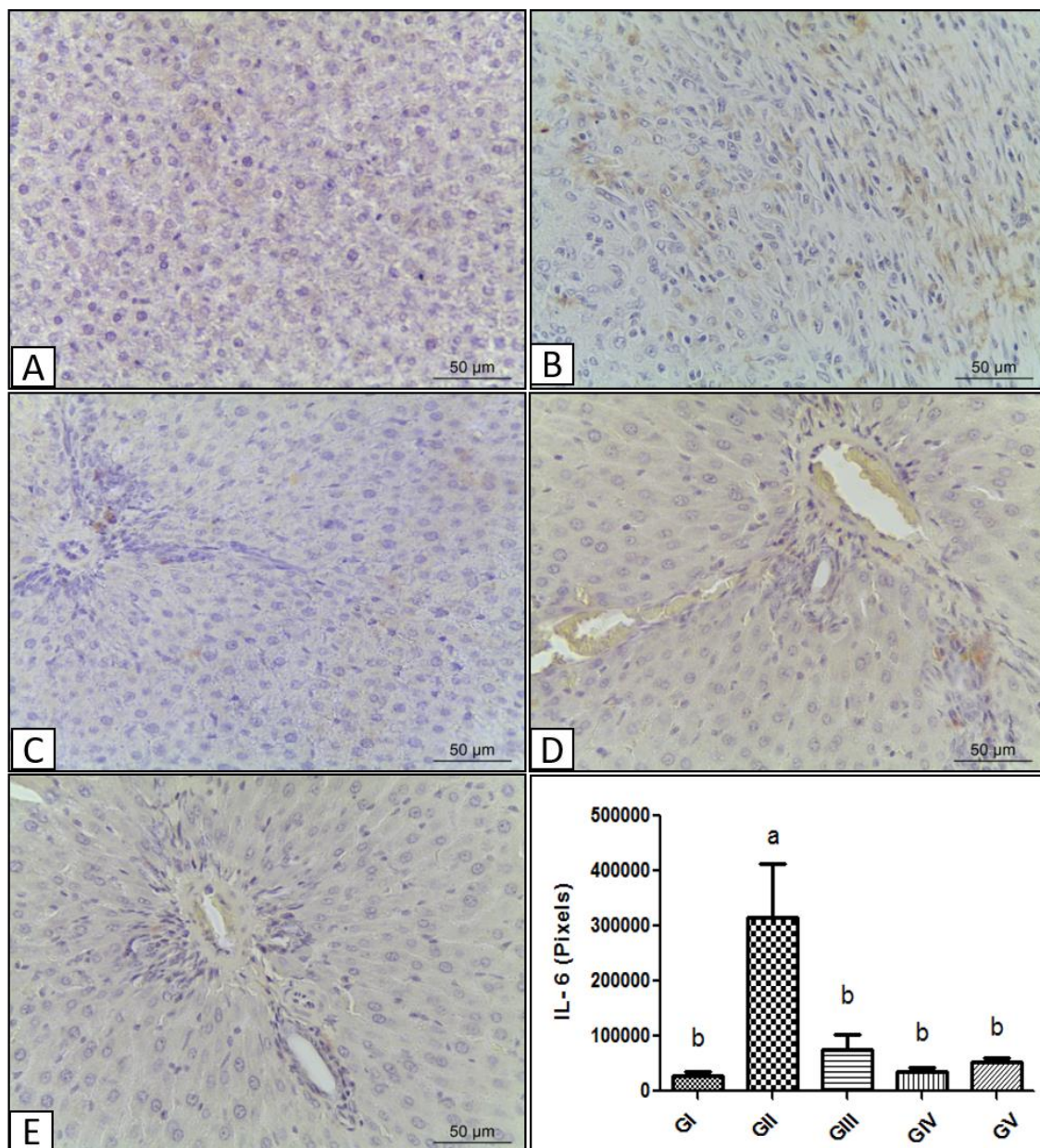


Figura 3: Imunohistoquímica e quantificação do IL-6 no fígado. A: GI – controle; B: GII– induzidos à corticoterapia sem tratamento; C: GIII– induzidos à corticoterapia + alendronato de sódio simultâneo; D: GIV- induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno simultâneo; E: GV - induzidos à corticoterapia + 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 ($p < 0,05$).

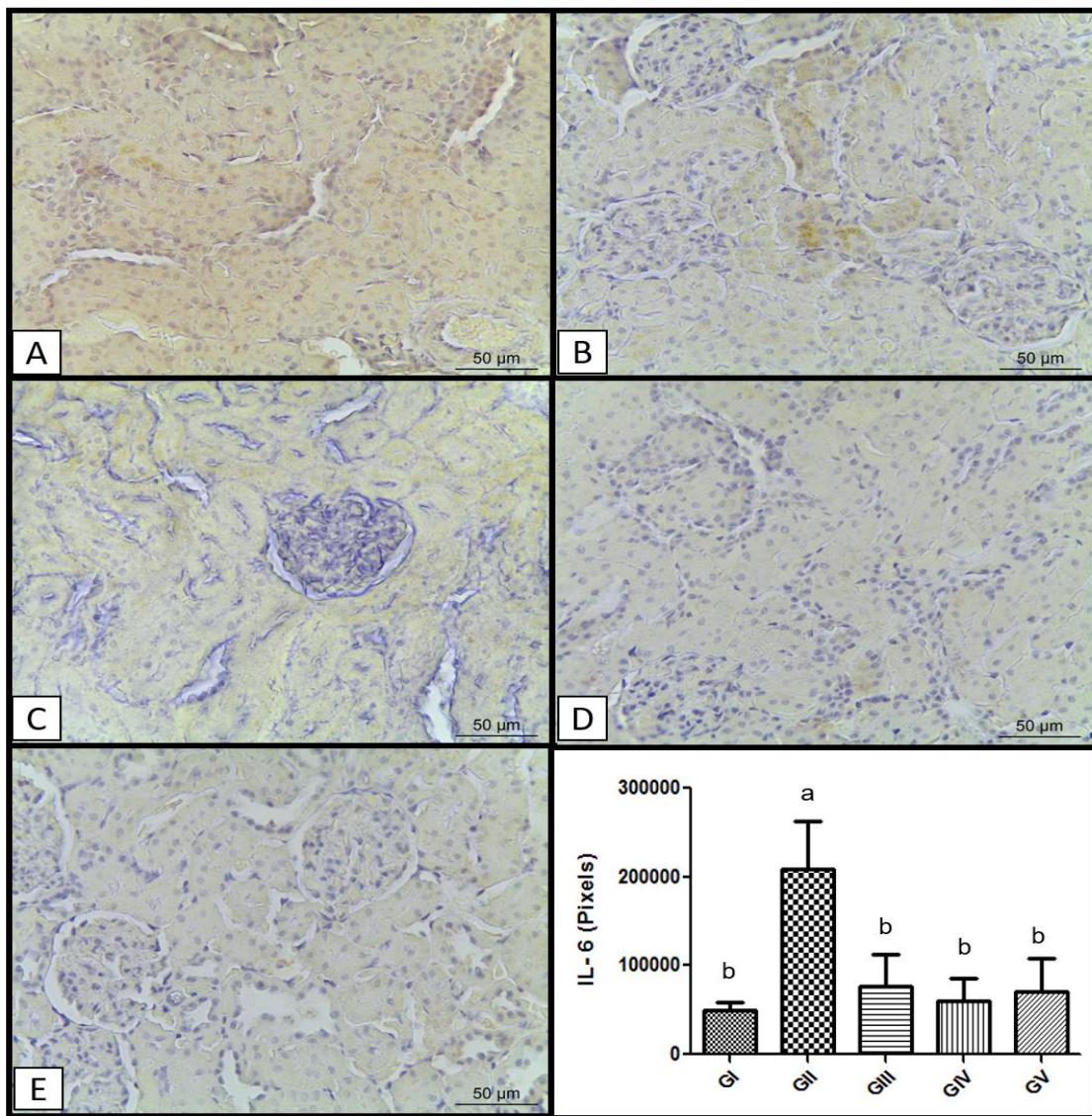


Figura 4: Imunohistoquímica e quantificação do IL-6 no rim. A: GI – controle; B: GII– induzidos à corticoterapia sem tratamento; C: GIII– induzidos à corticoterapia + alendronato de sódio simultâneo; D: GIV- induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno simultâneo; E: GV - induzidos à corticoterapia + 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 ($p < 0,05$).

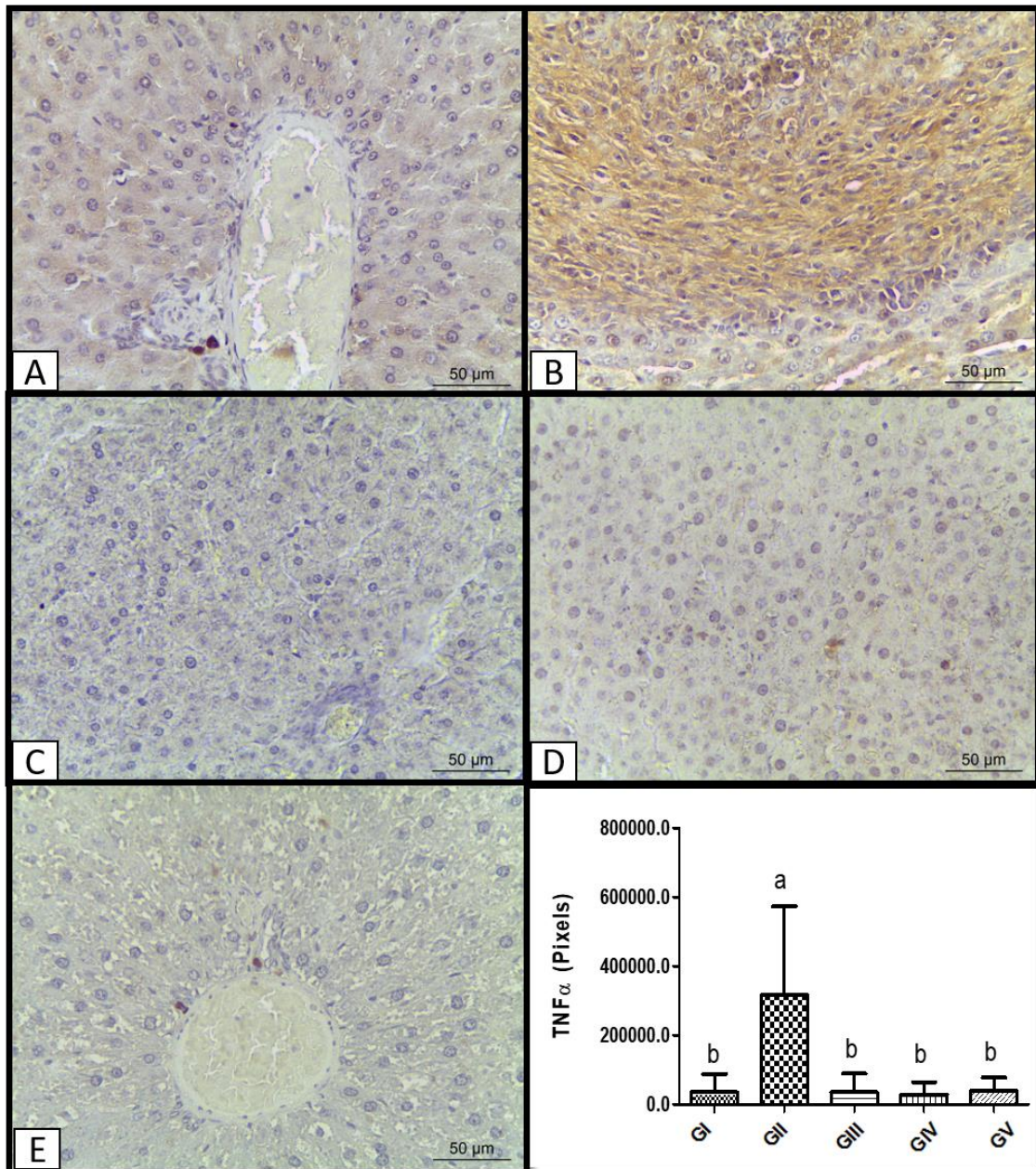


Figura 5: Imunohistoquímica e quantificação do TNF- α no fígado. A: GI – controle; B: GII– induzidos à corticoterapia sem tratamento; C: GIII– induzidos à corticoterapia + alendronato de sódio simultâneo; D: GIV- induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno simultâneo; E: GV - induzidos à corticoterapia + 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 ($p < 0,05$).

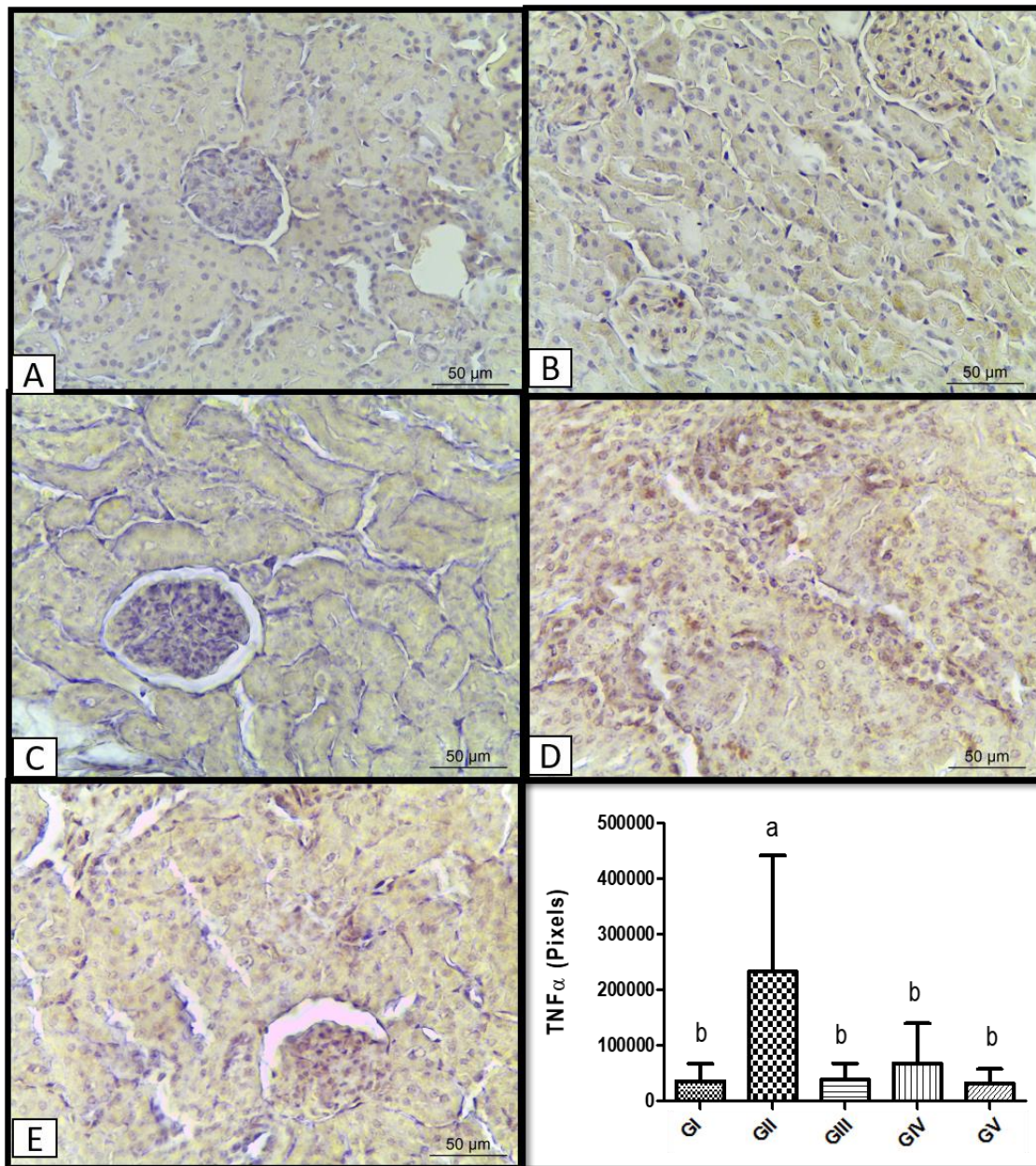


Figura 6: Imunohistoquímica e quantificação do TNF- α no rim. A: GI – controle; B: GII– induzidos à corticoterapia sem tratamento; C: GIII– induzidos à corticoterapia + alendronato de sódio simultâneo; D: GIV- induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno simultâneo; E: GV - induzidos à corticoterapia + 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 ($p < 0,05$).

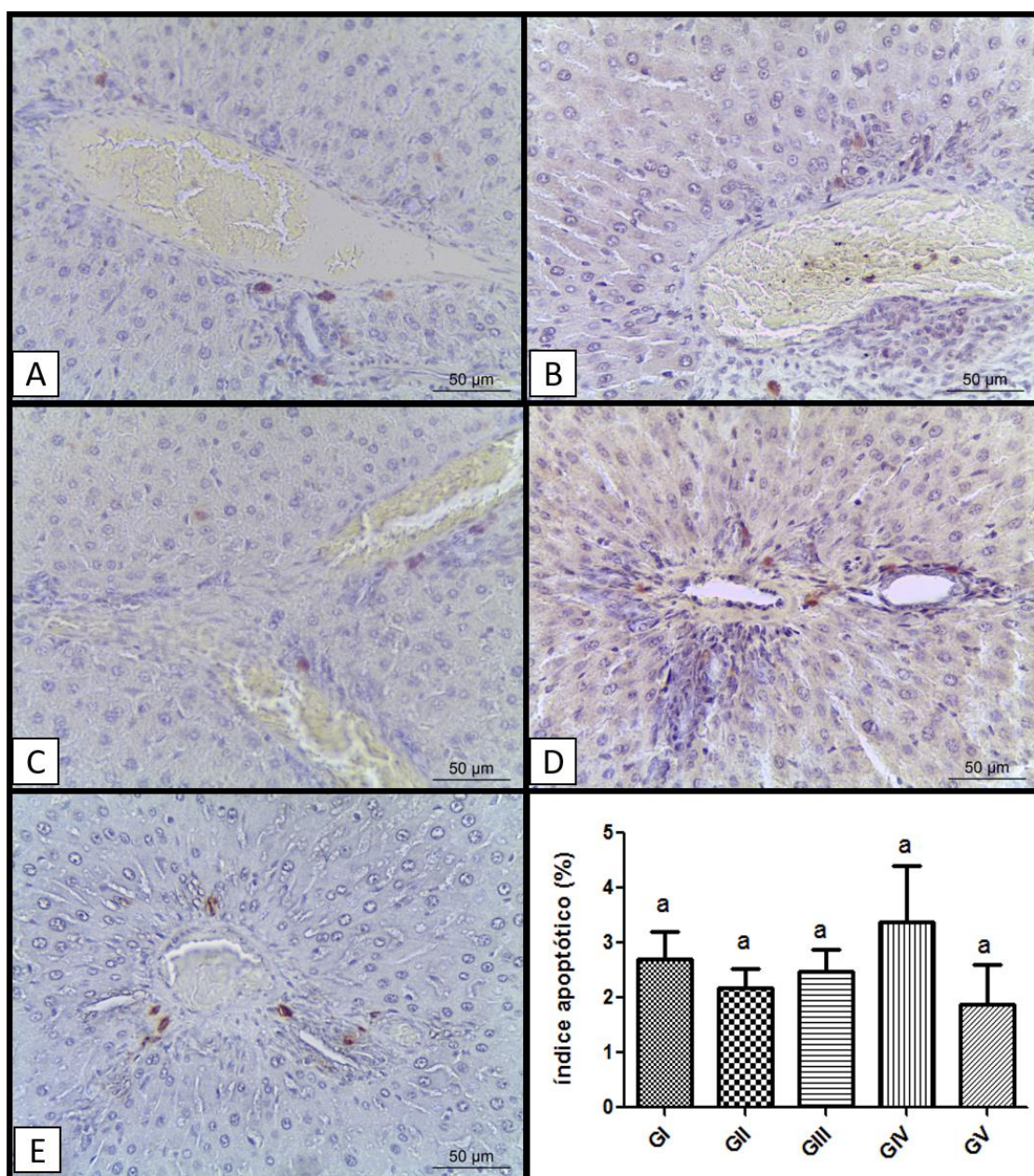
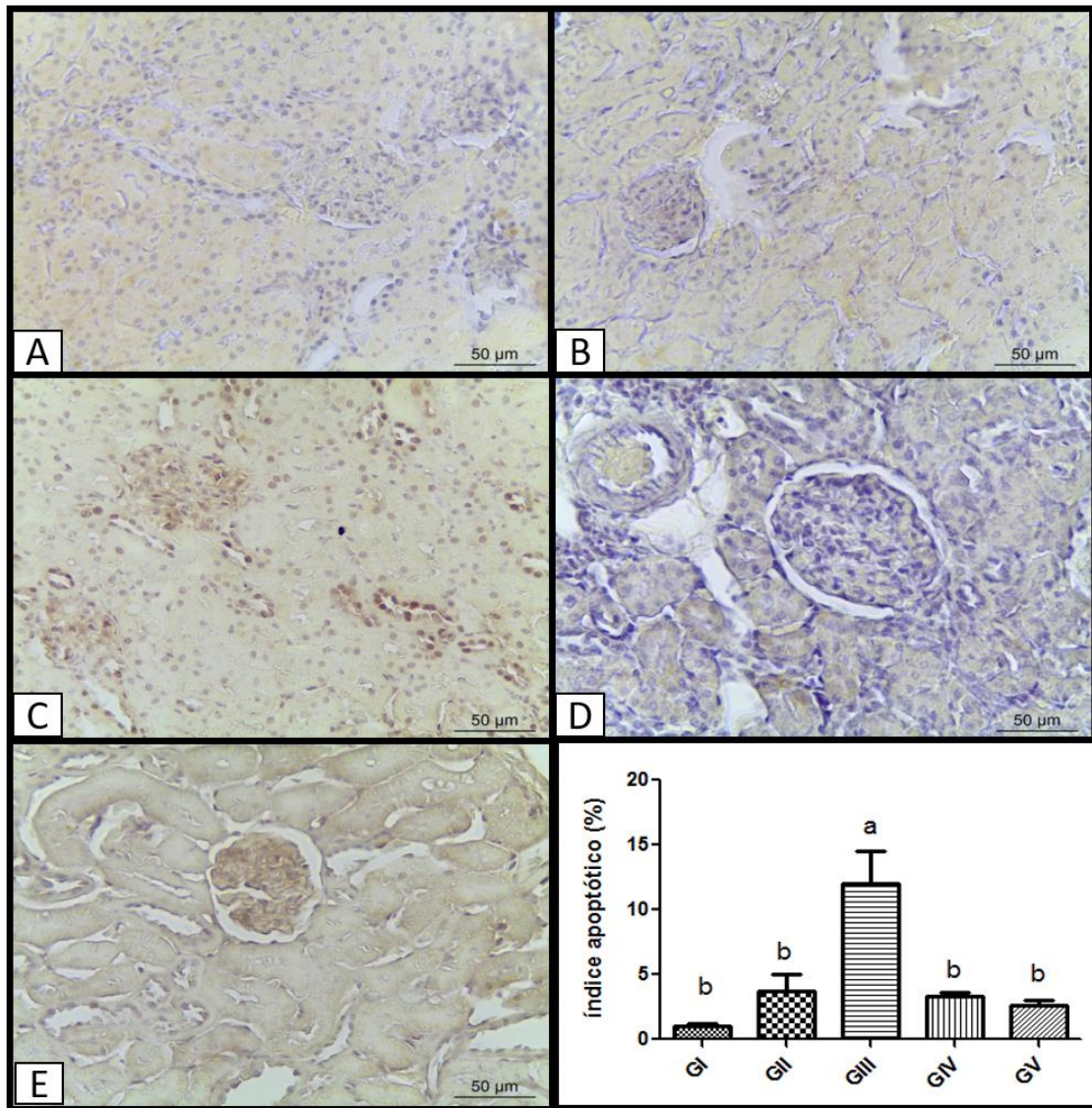


Figura 7: Índice apoptótico no fígado. A: GI – controle; B: GII– induzidos à corticoterapia sem tratamento; C: GIII– induzidos à corticoterapia + alendronato de sódio simultâneo; D: GIV- induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno simultâneo; E: GV - induzidos à corticoterapia + tratamento 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 ($p < 0,05$).



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 ($p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5. CONCLUSÃO

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

6. REFERÊNCIAS

- BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. K. H. **Bioquímica Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 716 p.
- BAZSÓ, A.; SZAPPANOS, A.; PATÓCS, A. B.; GYULA POÓR, A. D.; SHOENFELD, Y.; EMESE, K. The importance of glucocorticoid receptors in systemic lúpus erythaematosus. A systematic review. **Autoimm. Ver.** v.14, p. 349–351, 2015.
- BEHL, C. Estrogen can protect neurons: modes of action. **J. Steroid Biochem. Biol.** v.83, p.195-197, 2003.
- BRASIL, L. A.; GOMES, W. J.; SALOMÃO, R.; FONSECA, J. H. P.; BRANCO, J. N. R.; BUFFOLO, E. Uso de corticóide como inibidor da resposta inflamatória sistêmica induzida pela circulação extracorpórea. **Rev Bras Cir Cardiovasc.** n. 14, v. 3, p. 254-68, 2000.
- BRUNETTE, M. G.; LECLERC, M. Renal action of progesterone: effect on calcium reabsorption. **Mol Cell Endocrinol.** v. 30, n. 194, p. 183-90, 2002.
- TAYLOR, S. E.; MARTIN-HIRSCH, P.; MARTIN, F. Oestrogen receptor splice 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 use. **Autoimmun Ver**. n. 12, v. 5, p. 629–632, 2013.

1762 SERRA H. A., ROGANOVICH J. M., RIZZO L. F. Glucocorticoides: paradigma de
 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

CAPÍTULO III

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

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

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, Brasil

*Autor para correspondência: UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois Irmãos-Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389
E-mail: valeria.wanderley@ufrpe.br (WANDERLEY-TEIXEIRA V.)

RESUMO

O interesse pelo estrógeno e suas ações no organismo têm crescido muito, nos últimos anos, principalmente, como alternativa terapêutica durante a corticoterapia. O presente artigo teve por objetivo avaliar os efeitos da administração de estrógeno associado à corticoterapia por 45 dias analisando o fêmur de ratas, 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. A análise histopatológica revelou no fêmur das ratas do grupo II perda da microarquitetura óssea, notada pela diminuição da conectividade entre as trabéculas. Na análise histoquímica pelo Von Kossa observou-se marcação cálcio positiva próximos ao disco epifisário em todas as ratas dos grupos experimentais. Ao 15º dia as ratas do grupo II e V diferiram estatisticamente das demais ratas dos grupos experimentais em relação a todos os parâmetros avaliados, apresentando níveis séricos diminuídos de cálcio, magnésio e osteocalcina e elevação das taxas de fosfatase alcalina óssea, fosfatase ácida tartarato-resistente e C- telopeptídeo. Ao final do tratamento (45º dia) os parâmetros avaliados permanecem alterados apenas nas ratas do grupo II. As marcações para TNF- α foram mais intensas nas ratas do grupo II. A marcação para IL-6 e o índice de apoptose mostrou-se inalterado em todos os grupos. Assim, conclui-se que o estrógeno se mostrou eficaz em prevenir e reparar os danos ósseos provocados pela corticoterapia por período prolongado.

Palavras-chaves: corticoterapia, estrógeno, fêmur, bioquímica, imuhistoquímica, ratas.

ABSTRACT

The interest in estrogen and its actions in the body have grown a lot, in recent years, mainly, as a therapeutic alternative during steroid therapy. The objective of this study was to evaluate the effects of estrogen administration associated with corticosteroid therapy for 45 days by analyzing the femur of rats, in order to identify a treatment strategy with a lower collateral effect. For this, 35 albino rats, 90 days old, were 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. Corticosteroids were induced by injections of 2 mg / mL Decadron® intramuscularly. The histopathological analysis revealed in the femur of the rats of group II loss of the bone microarchitecture, noticed by the decrease of the connectivity between the trabeculae. In the histochemical analysis by Von Kossa, a positive calcium label was observed near the epiphyseal disk in all rats of the experimental groups. At day 15, the rats of group II and V differed statistically from the other rats of the experimental groups in relation to all parameters evaluated, with decreased serum levels of calcium, magnesium and osteocalcin and elevated levels of bone alkaline phosphatase, acid phosphatase tartrate- resistant and C-telopeptide. At the end of the treatment (45 days) the parameters evaluated remain altered only in the rats of group II. The TNF- α markers were more intense in the rats of group II. The labeling for IL-6 and the apoptosis index was unchanged in all groups. Thus, it has been concluded that estrogen has been shown to be effective in preventing and repairing bone damage caused by long-term corticosteroid therapy.

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

1. INTRODUÇÃO

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

Apesar do seu uso tão comum a corticoterapia vem apresentando alguns efeitos colaterais indesejáveis, em geral associadas ao tempo de tratamento e uso de GC de ação prolongada, como: 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 de cabeça de fêmur e úmero em ratos (SCHIMMER; PARKER 2007; VAN RAALTE; DIAMANT 2014).

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

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

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

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

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

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais e grupos experimentais

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

Grupo I – ratas que receberam placebo (CONTROLE);

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

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

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

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

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

2.2. Corticoterapia

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

2.3 Tratamento com estrógeno

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

2.4 Administração de Alendronato de Sódio

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

2.5 Análise Bioquímica

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

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

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

2.6 *Análise histopatológica*

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

2.7 *Imunohistoquímica (IL6 e TNF- α)*

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

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

2.8 Índice apoptótico

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

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

2.9. Análise estatística

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

3. RESULTADOS

3.1. Histopatologia e Histoquímica dos fêmures

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

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

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

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

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

3.2. Análise bioquímica

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

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

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

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

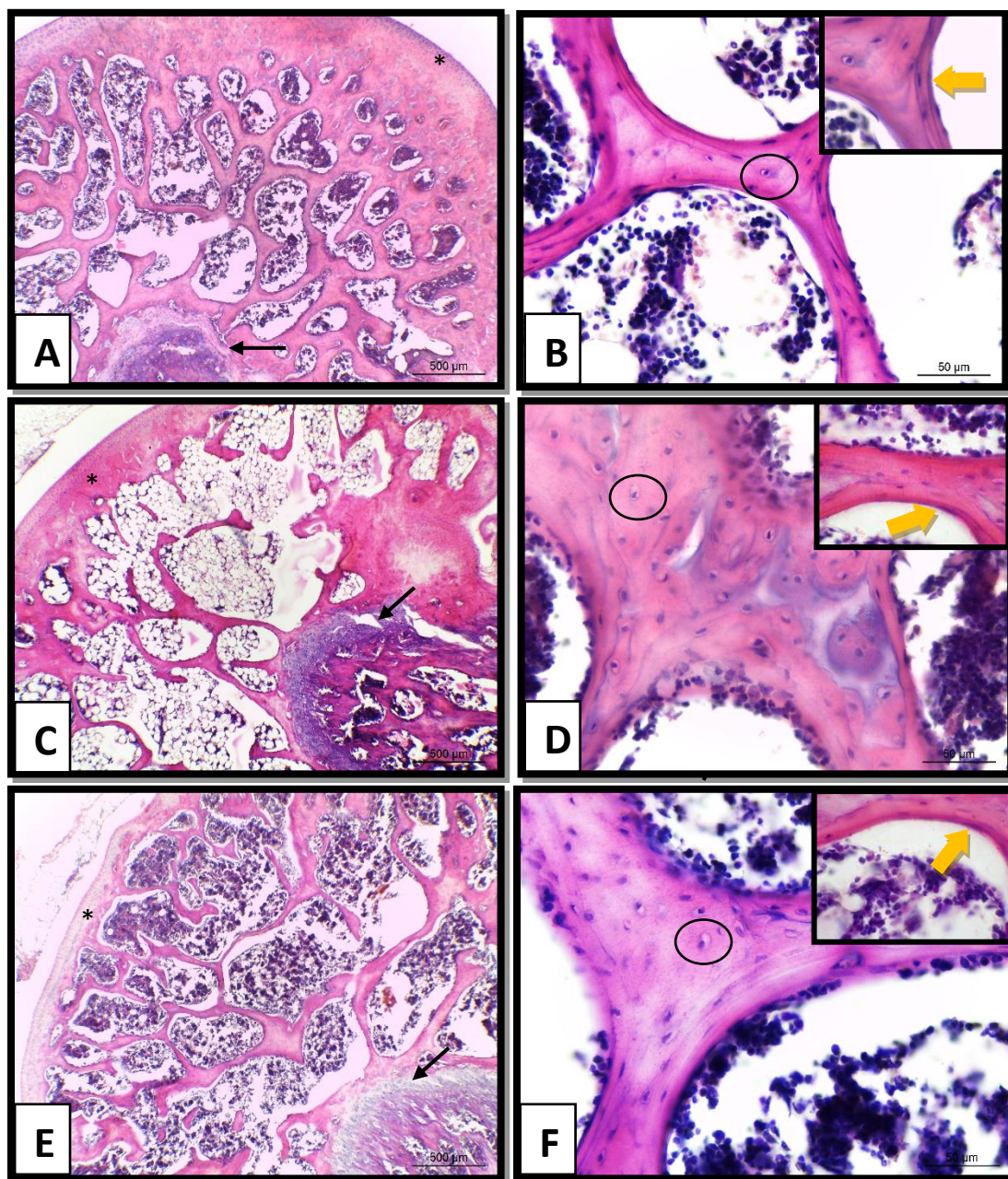


Figura 1: Fêmures dos animais dos grupos I, II e III. A, B – Grupo Controle (I). A – Observar arquitetura óssea preservada. B – Observar presença de osteoblastos (seta amarela) e osteócitos ativos (círculo). C e D – Grupo induzidos à corticoterapia sem tratamento. C - Observar perda de microarquitetura 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.

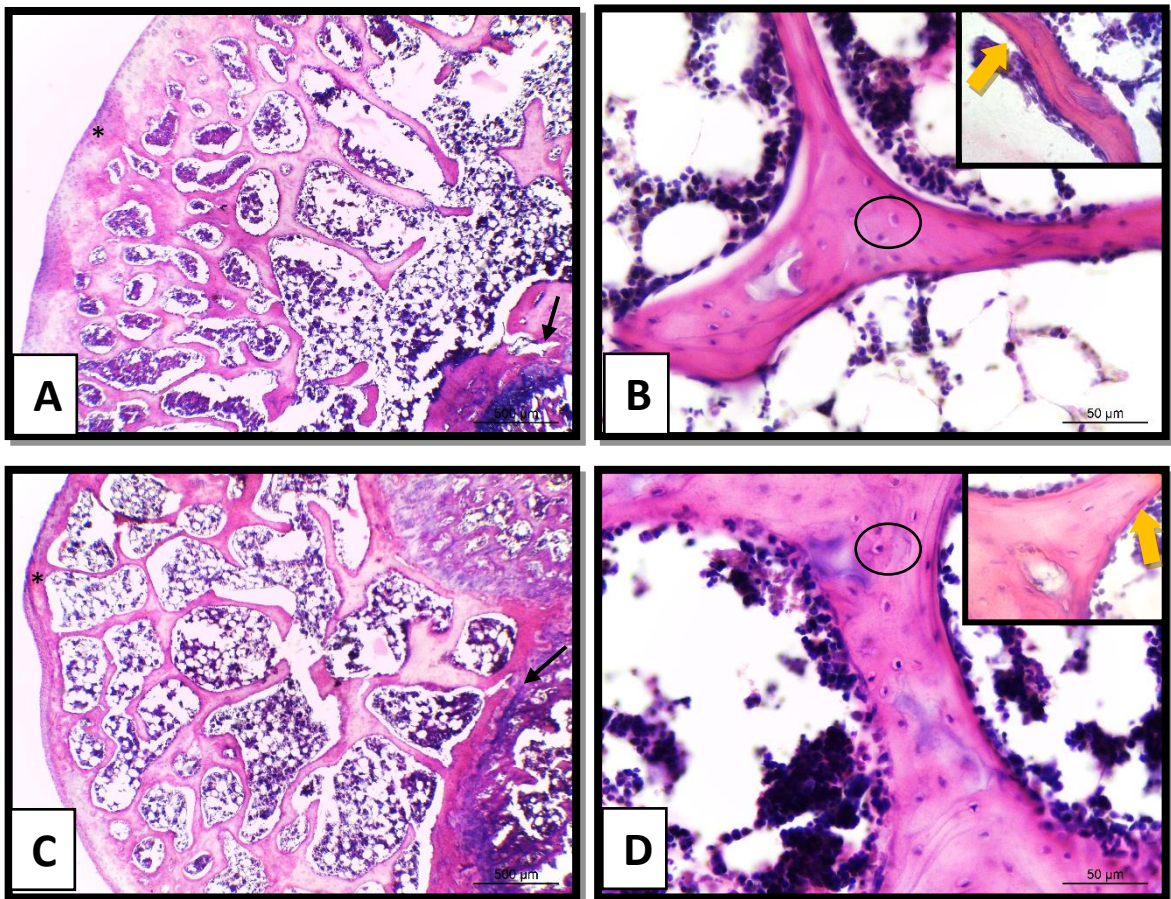


Figura 2: Fêmures dos animais dos grupos IV e V. A e B – induzidos à corticoterapia + estrógeno simultâneo. A - Observar perda da microarquitetura óssea. B – Observar osteoblastos (seta amarela), osteócitos ativos (círculo) e áreas de matriz alterada (ma). Coloração H.E. C e D – induzidos à corticoterapia + 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.

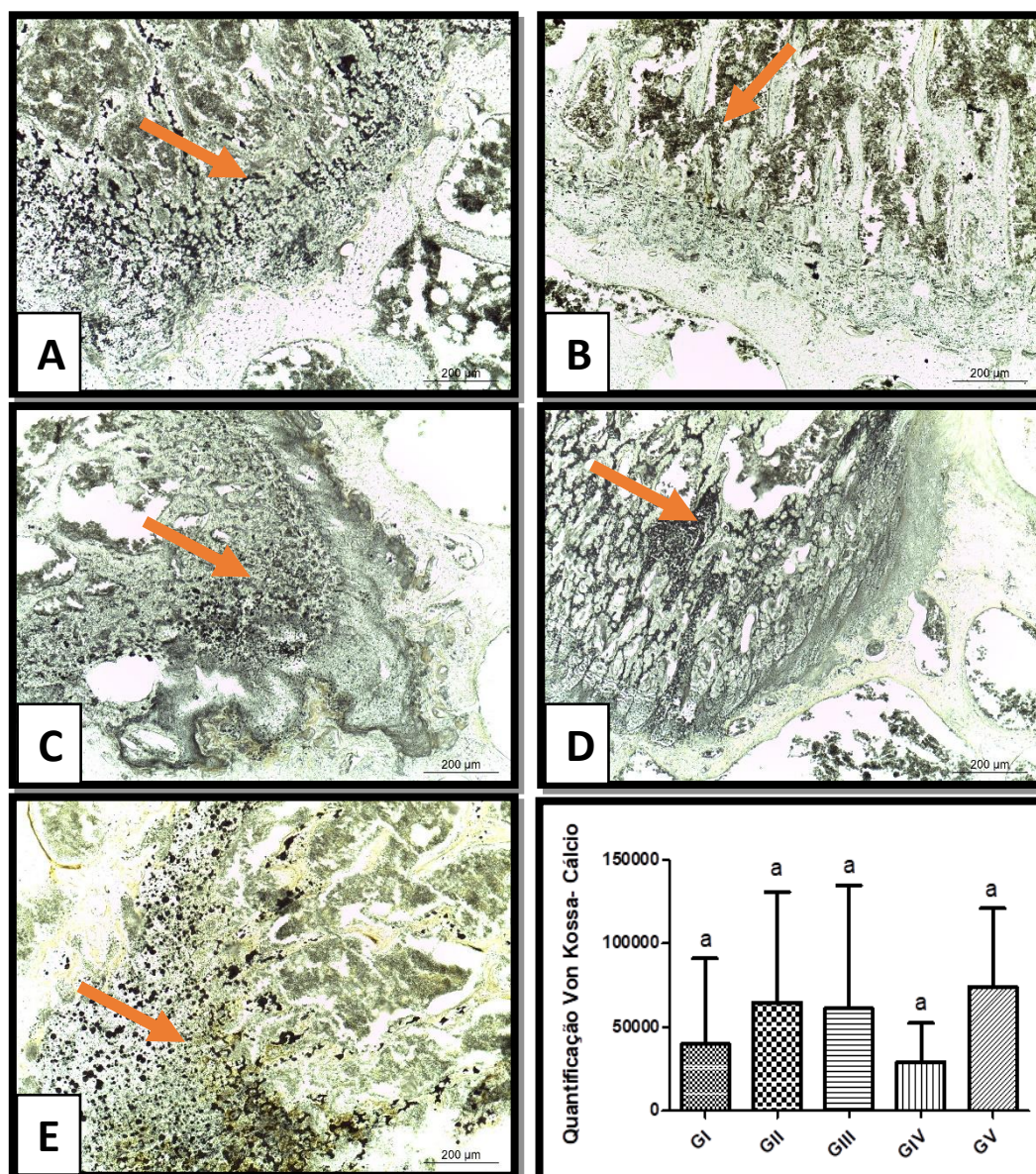


Figura 3: Detecção de Cálcio nos fêmures dos animais dos grupos experimentais. A – Grupo controle (I). Evidenciar grande depósito de cálcio junto ao centro de ossificação; B – Grupo induzidos à corticoterapia sem tratamento. C – induzidos à corticoterapia + alendronato de sódio simultâneo (Controle Positivo); 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.

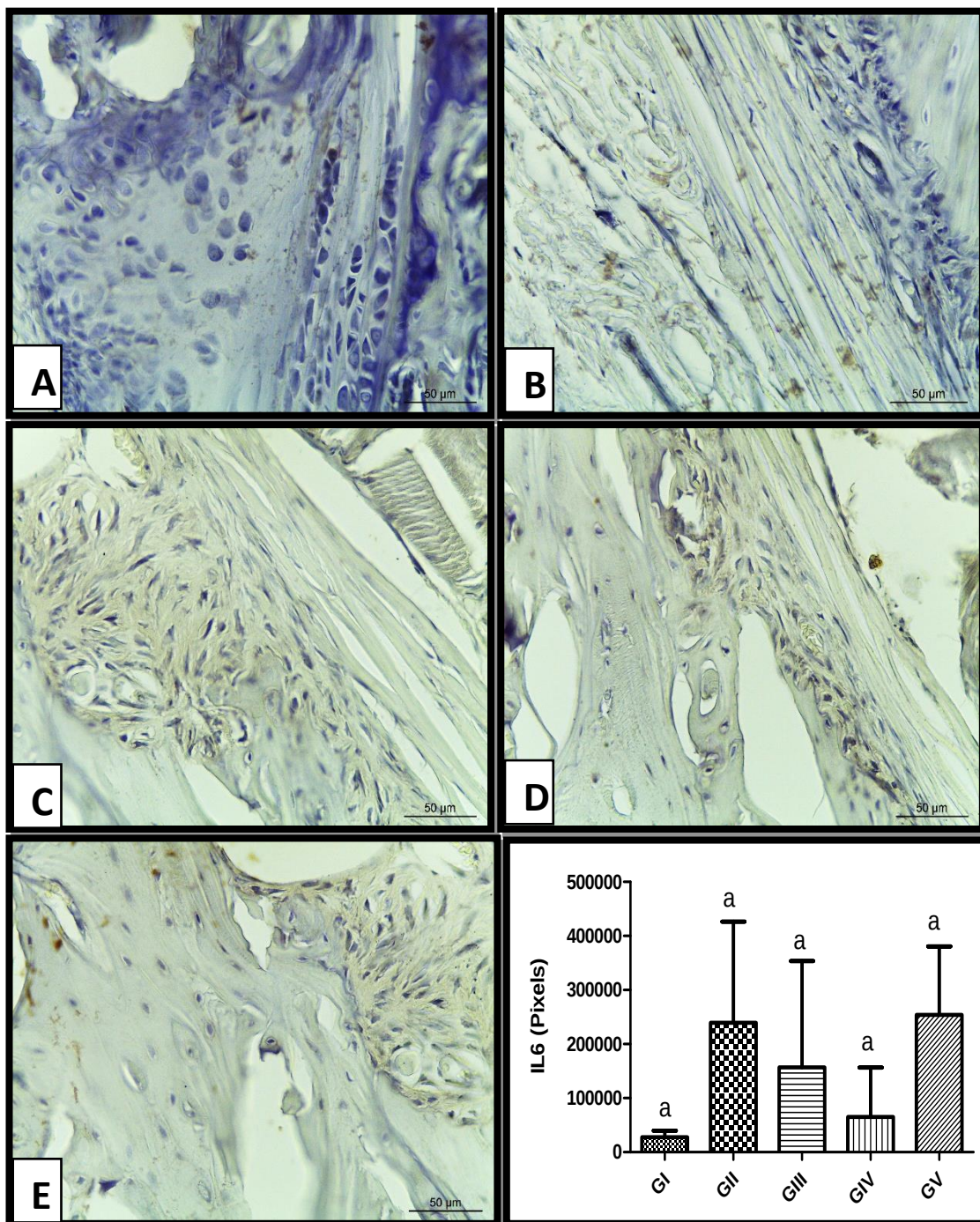


Figura 4: Imunohistoquímica e quantificação do IL-6 no fêmur. A: GI – controle; B: GII– induzidos à corticoterapia sem tratamento; C: GIII– induzidos à corticoterapia + alendronato de sódio simultâneo; D: GIV- induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno simultâneo; E: GV - induzidos à corticoterapia + 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 ($p < 0,05$).

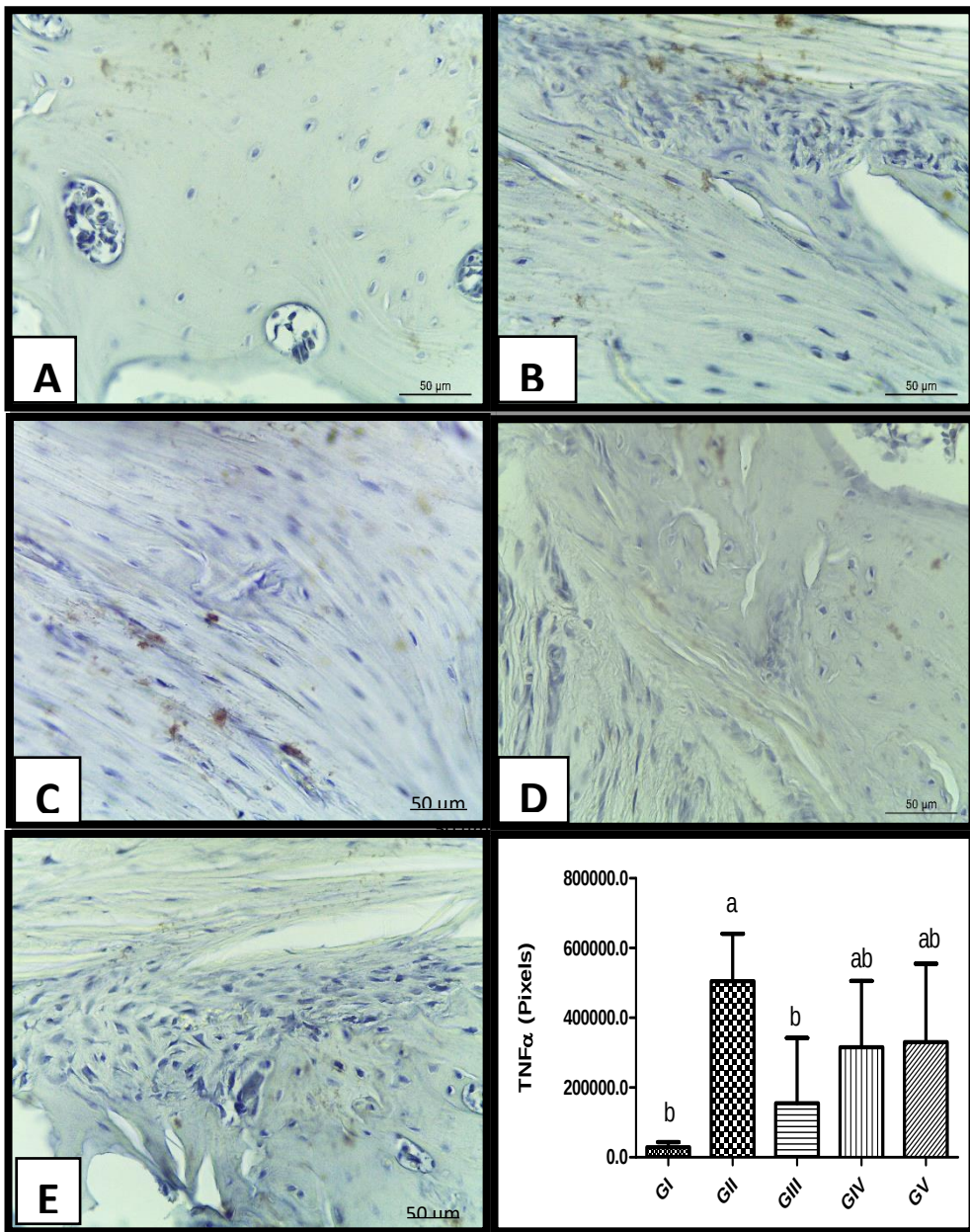


Figura 5: Imunohistoquímica e quantificação do TNF- α no fêmur. A: GI – controle; B: GII– induzidos à corticoterapia sem tratamento; C: GIII– induzidos à corticoterapia + alendronato de sódio simultâneo; D: GIV- induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno simultâneo; E: GV - induzidos à corticoterapia + 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 ($p < 0,05$).

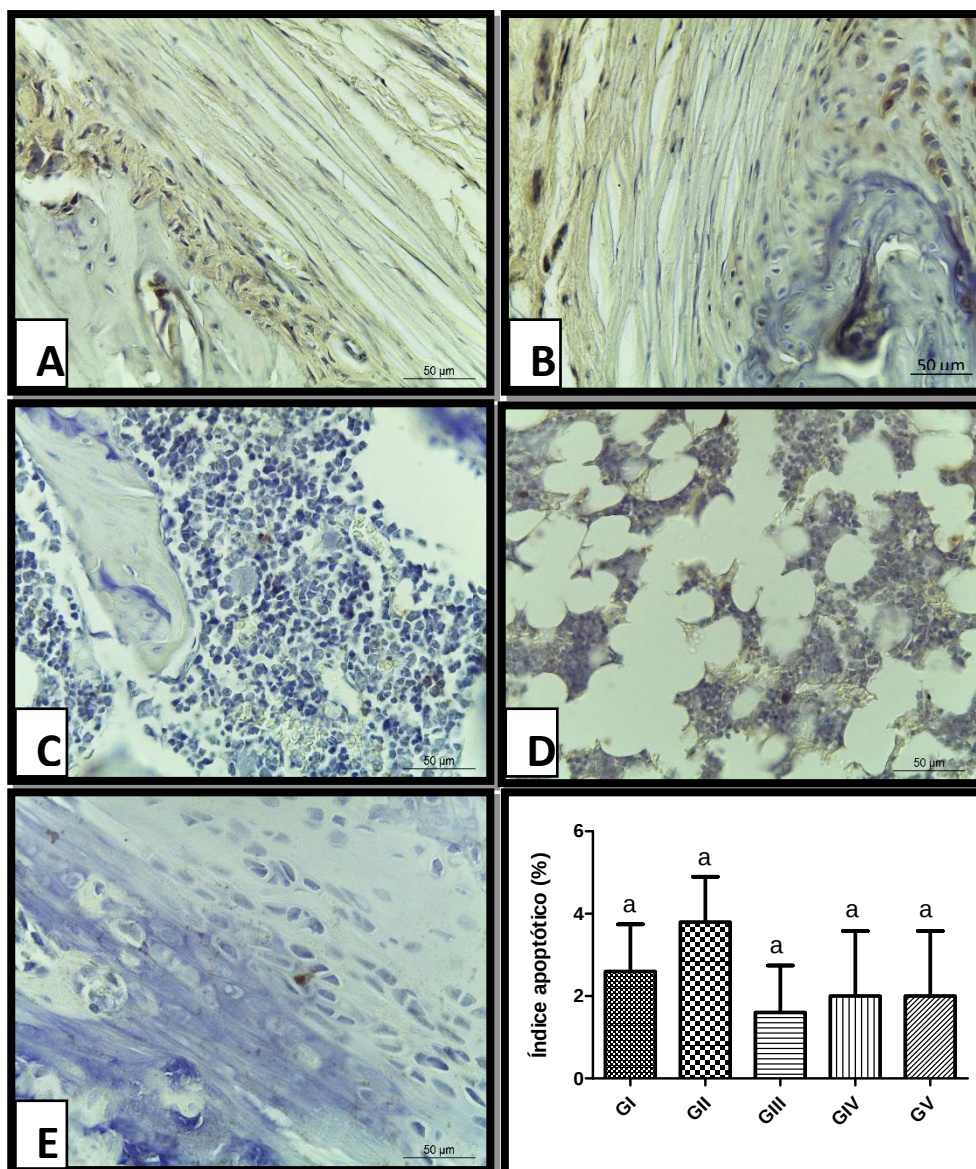


Figura 6: Índice apoptótico no fêmur. A: GI – controle; B: GII– induzidos à corticoterapia sem tratamento; C: GIII– induzidos à corticoterapia + alendronato de sódio simultâneo; D: GIV- induzidos à corticoterapia + tratamento com estrógeno simultâneo; E: GV - induzidos à corticoterapia + tratamento com 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 ($p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4. CONCLUSÃO

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

5. REFERÊNCIAS

- ADAM, J. E. Quantitative computed tomography. **Eur. J Radiol.**, v. 71, p. 415-424, 2009.
- AMADEI, S.U. V. A. S. SILVEIRA, A. C. PEREIRA, Y. R. CARVALHO, R. F. ROCHA. A influencia da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v. 42, p. 5-12, 2006.
- AMORIM, A.G.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais da relação entre exercício físico, estresse oxidativo e magnésio. **Revista de Nutrição.** v. 21, n. 5, p. 563-575, 2008.
- BARACHO, N. C. V.; PAULA, A. M.; FRANZINI – JÚNIOR, R.; SILVA, R. M. B.; 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.; SCHAEEREN, 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.; ASSEMAN, 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. **Cytokine**
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.