MARIA IZABEL DA SILVA MATTOS

**EFEITOS SISTÊMICOS DE ANTIINFLAMATÓRIOS ESTEROIDAIIS TÓPICOS:
MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO AGUDA E AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS
HEMATOLÓGICOS, IMUNOLÓGICOS E ENDÓCRINOS**

SÃO PAULO

2009

MARIA IZABEL DA SILVA MATTOS

**EFEITOS SISTÊMICOS DE ANTIINFLAMATÓRIOS ESTEROIDAIIS TÓPICOS:
MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO AGUDA E AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS
HEMATOLÓGICOS, IMUNOLÓGICOS E ENDÓCRINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Frederico Azevedo da Costa-Pinto

São Paulo

2009

10

Nº CLASSIFICAÇÃO
T. 2232
FMVZ
Nº TOMBO
029369

SMP 2042

cusm8

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2232
FMVZ

Mattos, Maria Izabel da Silva

Efeitos sistêmicos de antiinflamatórios esteroidais tópicos: modulação da inflamação aguda e avaliação de parâmetros hematológicos, imunológicos e endócrinos / Maria Izabel da Silva Mattos. -- 2009.

101 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Azevedo da Costa-Pinto.

1. Hidrocortisona. 2. Betametasona. 3. Triancinolona. 4. Efeitos sistêmicos.
I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado: "Avaliação dos efeitos hematológicos, imunológicos e endócrinos decorrentes do tratamento com corticosteróides tópicos em ratos", protocolado sob o nº1515/2008, utilizando 150 (cento e cinquenta) ratos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Frederico Azevedo da Costa Pinto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 11/02/09.

(We certify that the Research "Evaluation of hematological, immune, and endocrine effects the administration of topical corticosteroids to rats", protocol number 1515/2008, utilizing 150 (one hundred fifty) rats, under the responsibility Prof. Dr. Frederico Azevedo da Costa Pinto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 02/11/09).

São Paulo, 12 de fevereiro de 2009

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MATTOS; Maria Izabel da Silva

Título: Efeitos sistêmicos de antiinflamatórios esteroidais tópicos: modulação da inflamação aguda e avaliação de parâmetros hematológicos, imunológicos e endócrinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data 26/2/10

Banca Examinadora

Prof. Dr. FREDERICO LUNO Instituição FMVZ
Assinatura [assinatura] Julgamento APROVADO

Prof. Dr. SABRINA EPIPHANIO Instituição UNIFESP
Assinatura [assinatura] Julgamento APROVADO

Prof. Dr. INÉRCIO LUIZ S. S. S. S. Instituição F.M.V.Z. U.S.P.
Assinatura [assinatura] Julgamento APROVADO

Aos meus pais, Antonio e Wilma, por não medirem esforços para me garantir uma formação profissional e com isso, ter conseguido chegar até aqui...

Ao meu marido Leandro, pelo apoio diário e compreensão; por ficado ao meu lado nos piores momentos e continuar me incentivando para que eu realizasse esse sonho...

Aos meus irmãos, Cristina e Marco, pela força sempre presente; meu cunhado Eduardo e minha cunhada Fabiane, pelo carinho e atenção...

Ao meu filho, Enzo, por ter chegado em um momento tão importante e por ser a razão da minha vida...

OBRIGADA À TODOS.... EU AMO VOCÊS !!!!!!!

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Patologia (VPT), Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ).

Ao meu orientador, Fred, por ter acreditado em mim e no trabalho; por toda a ajuda e paciência.

A Andréia: grande amiga que me ajudou muito no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos do departamento: Beatriz, Fernando, Esther, Ana e Fabi, pela convivência e grande ajuda.

Aos meus colaboradores: Viviane, Alison, Domenica, Beatriz, Fernando e Andréia; sem essa grande ajuda, esse trabalho não seria possível.

Aos funcionários do biotério, Cláudia, Herculano, Idalina, Rosiris, Nelson e Luís; aos funcionários do laboratório de Farmacologia; Priscila, Ricardo e Magali; e aos funcionários do laboratório de Histologia, Luciano e Cláudio, agradeço todo o auxílio e dedicação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento desta pesquisa.

RESUMO

MATTOS, M. I. S. **Efeitos sistêmicos de antiinflamatórios esteroidais tópicos: modulação da inflamação aguda e avaliação de parâmetros hematológicos, imunológicos e endócrinos.** [Systems effects of topic esteroidals anti-inflammatory drugs: modulation of acute inflammation and evaluation of haematologicals, immunologicals and endocrinologicals]. 2010. 101 F. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Os glicocorticóides são muito utilizados na clínica veterinária por serem potentes inibidores da resposta inflamatória. São encontrados em muitas preparações tópicas, sozinhos ou combinados com outros medicamentos e estão presentes, principalmente, em produtos destinados ao uso otológico. Mesmo quando aplicados topicamente, sabe-se que existe certo grau de absorção. Com a disponibilidade de novos glicocorticóides sintéticos mais potentes, vem sendo sugerido recentemente, a ocorrência de hiperadrenocorticismismo iatrogênico em pequenos animais. Com a finalidade de se testar a hipótese que a utilização de preparações otológicas contendo glicocorticóides podem ocorrer em efeitos sistêmicos, o presente estudo avaliou três antiinflamatórios esteroidais comumente utilizados no tratamento de otite em cães e gatos, quais sejam a hidrocortisona, a betametasona e a triancinolona. Para tanto, ratos foram tratados topicamente, via auricular, a cada 12 horas, durante 7, 14 e 21 dias, com os fármacos descritos acima. Utilizamos o edema de pata induzido pela injeção de carragenina como forma de avaliar a existência de níveis efetivos de antiinflamatórios circulantes. Ainda, foram avaliados vários parâmetros tais como variação de peso corpóreo, peso relativo de baço e adrenais, hemograma completo, índice de proliferação de linfócitos e fagocitose e burst oxidativo realizados por neutrófilos circulantes. Além disso, foi avaliado o nível de corticosterona plasmática nos animais tratados com glicocorticóides tópicos. O tratamento tópico com antiinflamatórios esteroidais levou a redução no volume de edema inflamatório, mais evidente com a triancinolona. De forma geral, houve queda no ganho, ou mesmo perda de peso corpóreo durante o tratamento tópico com os antiinflamatórios esteroidais empregados. Em alguns casos, essa redução de peso corpóreo foi acompanhada de diminuição do peso relativo do baço e adrenais, particularmente com a betametasona. A principal alteração observada no hemograma foi leucopenia, mais evidente com a triancinolona. Houve redução dos níveis plasmáticos de corticosterona, mais duradoura com a betametasona. Os tratamentos tópicos causaram discreta redução na intensidade e percentual de fagocitose realizada por neutrófilos circulantes, bem como na produção de espécies reativas de oxigênio. O estudo aponta que glicocorticóides tópicos comumente empregados na terapêutica veterinária podem ser absorvidos, na dependência da molécula empregada e de seu tempo de utilização, causando alterações sistêmicas relevantes já após 7 dias de tratamento. Sugerimos uma maior cautela e acompanhamento veterinário dos pacientes nos casos que haja necessidade de emprego de tais medicamentos por períodos prolongados.

Palavras-chave: Hidrocortisona, Betametasona, Triancinolona, Efeitos sistêmicos.

ABSTRACT

MATTOS, M. I. S. **Systems effects of topic esteroidals anti-inflammatory drugs: modulation of acute inflammation and evaluation of haematologics, immunologicals and endocrinologicals.** [Efeitos sistêmicos de antiinflamatórios esteroidais tópicos: modulação da inflamação aguda e avaliação de parâmetros hematológicos, imunológicos e endócrinos]. 2010. 101 F. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Glucocorticoids are commonly employed in veterinary practice because they are potent inhibitors of the inflammatory response. They are present in many topical formulations, alone or combined with other active compounds, particularly in otic ointments. Even when applied topically, certain degree of absorption is known to occur. Following the availability of novel, more potent synthetic steroidal anti-inflammatory drugs, cases of iatrogenic hyperadrenocorticism have been suggested. Aiming on testing the hypothesis that glucocorticoid-containing otic ointments may lead to systemic effects, we employed three different synthetic glucocorticoids widely used for the treatment of otitis in small animals (hydrocortisone, betamethasone, and triamcinolone) our study Rats were treated topically on their ears, every 12 hours, for 7, 14, or 21 days with the drugs described above. We first employed carrageenan-induced paw edema in order to evaluate the presence of effective levels of circulating anti-inflammatory drugs. We also evaluated several parameters such as change in body weight, relative weight of spleen and adrenal glands, complete hemogram, proliferation index of lymphocytes, and phagocytosis and oxidative burst performed by circulating neutrophils. Moreover, we assessed the plasmatic levels of corticosterone in rats treated topically with anti-inflammatory steroids. Topical treatment led to a reduction on the volume of the inflammatory edema induced by carrageenan, more evident following triamcinolone. Altogether, rats treated with these molecules ceased to gain, or lost weight on the course of the experiment. In some cases, such reduction was accompanied by a decrease on the relative weight of the spleen and adrenal glands, particularly after betamethasone. The most commonly observed change in the hemogram was leucopenia, evident following triamcinolone. We found reduced levels of circulating corticosterone, more persistent after betamethasone. Topically applied glucocorticoids caused a discrete reduction in the intensity and percentage of phagocytosis by circulating neutrophils, and a reduction on the oxidative burst performed by these cells. This study shows that topical steroidal anti-inflammatory drugs, so commonly employed in veterinary practice, can be absorbed, depending on the molecule and duration of treatment, leading to systemic effects, which are already relevant after 7 days. Based on our findings, we suggest caution and a close follow-up by a qualified veterinarian whenever a long-term therapy based on these molecules and route of administration is required.

Key words: Hydrocortisone, Betamethasone, Triamcinolone, System effects.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	análise de variância
ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
CRH	hormônio liberador de corticotrofina
B	betametasona
SNC	sistema nervoso central
HHa	eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
H	hidrocortisona
Na	sódio
HCA	hiperadrenocorticismo
PDH	hiperadrenocorticismo pituitário dependente
DNA	ácido desoxirribonucleico
RNA	ácido ribonucleico
PMN	polimorfonuclear
NK	<i>natural killer</i>
APC	célula apresentadora de antígeno
DC	célula dendrítica
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
MHC	complexo de histocompatibilidade
ERO	espécie reativa de oxigênio
DCFH	diclorofluoresceína diacetato
PMA	miristato-acetato de forbol
NaCl	cloreto de sódio
PBS	salina tamponada com fosfatos
SFB	soro fetal bovino
IL	interleucina

EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
Ig	imunoglobulina
IP	intra-peritoneal
LPS	lipopolissacarídeo de parede bacteriana
RPM	rotações por minuto
V	veículo
T	triancinolona

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Secreção de glicocorticóides pela glândula adrenal.....	21
Figura 2 – Delineamento experimental. a. grupo da dexametasona; b. grupos do glicocorticóides tópicos.....	46
Figura 3 – Avaliação do edema de pata, induzido pela administração subcutânea no coxim plantar do membro posterior esquerdo de carragenina em ratos; grupo controle de imunossupressão. * $p<0,001$ (pós teste de Bonferroni).....	47
Figura 4 - Avaliação do edema de pata, induzido pela administração subcutânea no coxim plantar do membro posterior esquerdo de carragenina em ratos, tratamento tópico de 7 dias. $p<0,0001$ (ANOVA de duas vias). * $p<0,01$, BxV, TxV** $p<0,05$, BxV, TxV *** $p<0,001$, TxV(Bonferroni pós teste).....	48
Figura 5 - Avaliação do edema de pata, induzido pela administração subcutânea no coxim plantar do membro posterior esquerdo de carragenina em ratos, tratamento de 14 dias.....	49
Figura 6 - Avaliação do edema de pata, induzido pela administração subcutânea no coxim plantar do membro posterior esquerdo de carragenina em ratos, tratamento de 21 dias. ** $p<0,05$, HxV, TxV.....	50
Figura 7 - Avaliação dos pesos dos animais do grupo controle no início e ao término dos tratamentos. * $p<0,0001$ (teste “t” não pareado).....	51
Figura 8 - Avaliação dos pesos dos animais dos grupos tratados com veículo, hidrocortisona, betametasona e triancinolona durante 7, 14 e 21 dias. * $p<0,05$, BxV, TxV ** $p<0,001$, BxV *** $p<0,01$, TxV.....	52
Figura 9 - Avaliação do peso relativo do baço dos animais do grupo da dexametasona. $p<0,0001$	53
Figura 10 - Avaliação do peso relativo do baço nos grupos dos animais tratados topicamente com veículo, hidrocortisona, betametasona e triancinolona durante 7, 14 e 21 dias. * $p<0,01$, ** $p<0,05$, BxV e *** $p<0,001$, TxV.....	54
Figura 11 - Peso relativo das adrenais nos grupos dos animais do controle positivo. $p<0,0001$	55
Figura 12 - Peso relativo das adrenais dos animais do grupo de tratamento tópico. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, BxV e *** $p<0,001$, BxV.....	56
Figura 13 - Dosagem da corticosterona dos diferentes glicocorticóides tópicos.* $p<0,05$ e ** $p<0,01$	63
Figura 14 - Avaliação da atividade dos neutrófilos. a. Intensidade de fagocitose: * $p<0,001$, BxV, TxV; b. Porcentagem de fagocitose: * $p<0,05$, BxV; c. <i>Burst</i> induzido: * $p<0,05$ (pós teste de Bonferroni).....	67

Figura 15 - Proliferação de linfócitos T e B dos grupos dos tratamentos tópicos, 21 dias. a. ConA; * $p<0,05$. b. LPS; ** $p<0,05$	70
Figura 16 - Fígado. a. Veículo. b. Dexametasona. Aumento 10x.....	72
Figura 17 - Baço. a. Salina. b. Dexametasona. Aumento 10x.....	73
Figura 18 - Esterno. a. Salina. b. Dexametasona. Aumento 4x.....	74
Figura 19 - Adrenal. a. Veículo. b. Betametasona tratamento de 14 dias. Aumento 4x.....	76
Figura 20 - Adrenal. Betametasona tratamento de 21 dias. Aumento 4x.....	77
Figura 21 - Adrenal. a. Veículo. b. Betametasona tratamento de 14 dias. Aumento 4x.....	78
Figura 22 - Fígado. c e d. Betametasona tratamento de 21 dias. Aumento 4x e 20x.....	79
Figura 23 - Fígado. a. Veículo (aumento 10x). b. Triancinolona tratamento de 7 dias. Aumento 4x.....	80
Figura 24 - Fígado. c. Triancinolona tratamento de 14 dias. d. Triancinolona tratamento de 21 dias. Aumento 4x.....	81
Figura 25 - Baço. a. Veículo. b. Triancinolona tratamento de 7 dias. Aumento 4x.....	82
Figura 26 - Esterno. a. Veículo. b. Triancinolona tratamento de 21 dias. Aumento 4x.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Potência antiinflamatória, de retenção de sódio e afinidade por receptor glicocorticóide dos diversos corticosteróides, comparada com a hidrocortisona como padrão.....	23
Tabela 2 – Hemograma dos animais do grupo da dexametasona.....	57
Tabela 3 – Contagem de células dos animais do grupo da dexametasona. * $p = 0,0047$ e ** $p < 0,0001$	58
Tabela 4 – Hemograma do animais tratados com corticóides durante 7, 14 e 21 dias. $p < 0,05$	60
Tabela 5 – Contagem diferencial de células dos animais tratados com corticóides em 7, 14 e 21 dias.....	62
Tabela 6 – Avaliação da atividade dos neutrófilos sanguíneos por citometria de fluxo nos animais do grupo da dexametasona.....	64
Tabela 7 – Avaliação da atividade dos neutrófilos sanguíneos por citometria de fluxo nos animais tratados com diferentes glicocorticóides tópicos.....	66
Tabela 8 – Índice de proliferação de linfócitos T e B do grupo da dexametasona.....	68
Tabela 9 – Índice de proliferação de linfócitos T e B dos grupos tratados com diferentes glicocorticóides tópicos.....	70

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Fisiologia e Regulação neuroendócrina.....	19
2.2 Farmacologia dos Glicocorticóides.....	22
2.3 Noções Básicas de Imunologia.....	25
2.4 Glicocorticóides e Imunossupressão.....	29
2.5 Anormalidades da Secreção Adrenocortical.....	30
2.6 O Processo Inflamatório.....	32
3 OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo Geral.....	36
3.2 Objetivos Específicos.....	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 Animais	37
4.2 Fármacos, Reagentes e Soluções.....	37
4.3 Indução da Resposta Inflamatória Aguda.....	39
4.4 Quantificação dos Níveis de Corticosterona Sérica.....	40
4.5 Citômetro de Fluxo.....	41
4.6 Avaliação da Atividade Proliferativa de Linfócitos.....	43
4.7 Hemograma Completo.....	44
4.8 Histopatológico.....	44
4.9 Análise Estatística.....	44
5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	45
6 RESULTADOS.....	47

6.1 AVALIAÇÃO DO EDEMA DE PATA.....	47
6.1.1 Edema de Pata no Grupo da Dexametasona.....	47
6.1.2 Edema de Pata nos Grupos Tratados com Veículo, Hidrocortisona, Betametasona e Triancinolona durante 7 dias.....	48
6.1.3 Edema de Pata nos Grupos Tratados com Veículo, Hidrocortisona, Betametasona e Triancinolona durante 14 dias.....	49
6.1.4 Edema de pata nos Grupos Tratados com Veículo, Hidrocortisona, Betametasona e Triancinolona durante 21 dias.....	50
6.2 AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS.....	51
6.2.1 Variação do Peso dos Animais do Grupo da Dexametasona.....	51
6.2.2 Variação do Peso dos Animais dos Grupos dos Tratamentos Tópicos com Veículo, Hidrocortisona, Betametasona e Triancinolona durante 7, 14 e 21 dias.....	52
6.3 AVALIAÇÃO DO PESO RELATIVO DO BAÇO.....	53
6.3.1 Peso Relativo do Baço dos Animais do Grupo da Dexametasona.....	53
6.3.2 Peso Relativo do Baço dos Animais dos Grupos dos Tratamentos Tópicos com Veículo, Hidrocortisona, Betametasona e Triancinolona durante 7, 14 e 21 dias.....	54
6.4 AVALIAÇÃO DO PESO RELATIVO DAS ADRENAIS.....	55
6.4.1 Peso Relativo das Adrenais dos Animais do Grupo da Dexametasona.....	55
6.4.2 Peso Relativo das Adrenais dos Animais dos Grupos dos Tratamentos Tópicos com Veículo, Hidrocortisona, Betametasona e Triancinolona durante 7, 14 e 21 dias.....	56
6.5 AVALIAÇÃO DO HEMOGRAMA COMPLETO.....	57
6.5.1 Hemograma dos Animais do Grupo de Dexametasona.....	57

6.5.2 Contagem Diferencial de Células dos Animais do Grupo da Dexametasona.....	58
6.5.3 Hemograma dos Animais Tratados com Glicocorticóides Tópicos durante 7, 14	
6.5.4 Contagem Diferencial de Células dos Animais Tratados com Glicocorticóides Tópicos durante 7, 14 e 21 dias.....	61
6.6 DOSAGEM DE CORTICOSTERONA.....	63
6.6.1 Dosagem de Corticosterona nos Animais dos Grupos dos Tratamentos Tópicos com veículo, Hidrocortisona, Betametasona e Triancinolona durante 7, 14 e 21 dias.....	63
6.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DOS NEUTRÓFILOS SANGUÍNEOS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	64
6.7.1 Avaliação da Atividade dos Neutrófilos nos Animais o Grupo da Dexametasona.....	64
6.7.2 Avaliação da Atividade dos Neutrófilos nos Animais Tratados com Glicocorticóides tópicos durante 7, 14 e 21 dias.....	65
6.8 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS T E B.....	68
6.8.1 Índice de Proliferação de Linfócitos B e T nos Animais do Grupo da Dexametasona.....	68
6.8.2 Índice de proliferação de Linfócitos B e T nos Animais Tratados com Glicocorticóides Tópicos durante 7, 14 e 21 dias.....	69
6.9 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	71
6.9.1 Grupo da Dexametasona.....	71
6.9.2 Grupos Tratados com Glicocorticóides Tópicos durante 7, 14 e 21 dias.....	75
7 DISCUSSÃO.....	84
8 CONCLUSÃO.....	91
9 REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO

O emprego de glicocorticóides começou em meados de 1949, quando seres humanos com artrite reumatóide, tratados com cortisona, apresentaram acentuada melhora. Nos anos que se seguiram, os glicocorticóides tornaram-se medicamentos bastante usados e receitados na medicina veterinária. Foram apresentadas extraordinárias melhoras induzidas por corticosteróides em uma ampla gama de doenças, especialmente naquelas com inflamação grave ou lesões imunologicamente mediadas (CHASTAIN, 1992).

A informação científica sobre a terapia com glicocorticóides na maioria das espécies domésticas é escassa, particularmente com relação às dosagens e intervalos de dosagem ótimos, efeitos colaterais físicos e endócrinos e eficácia das aplicações clínicas. Portanto, os protocolos terapêuticos são frequentemente o produto da experiência clínica, senso comum e informação da medicina humana (FERGUSON; HOENIG, 2003).

Uma grande proporção do uso de glicocorticóides na clínica veterinária é destinada a combater a inflamação ou a alergia (FERGUSON; HOENIG, 2003). Segundo Janeway-Jr e Travers (1997), os corticóides são potentes inibidores das respostas inflamatórias, bem conhecidos por seus efeitos benéficos quando utilizados em pomadas ou injeções locais. São encontrados em muitas preparações tópicas para a pele, sozinhos ou combinados com antifúngicos e antibióticos, sendo muito indicado nos distúrbios dermatológicos dos animais domésticos; tratamento de alergias, doenças auto-imunes e dermatites, dentre outras.

Glicocorticóides administrados por via tópica são usados no tratamento de doenças dermatológicas no homem e em outras espécies, determinando uma melhora na inflamação cutânea. Embora o uso do esteróide tópico tenha como objetivo efeitos locais, a absorção e consequentemente seus efeitos sistêmicos foram observados (CHASTAIN, 1992).

Considerando os propósitos terapêuticos, há uma incidência crescente de casos de hiperadrenocorticismismo iatrogênico devido ao aparecimento de glicocorticóides novos e mais potentes, especialmente as formas injetáveis de absorção lenta. As vias de administração oral, parenteral, oftálmica e tópica tem sido apontadas como promotoras mais comuns da supressão adrenocortical (CHASTAIN, 1986; ROMATOWSKI, 1990; NELSON; COUTO, 1994).

Neste trabalho, avaliamos os glicocorticóides tópicos mais comumente utilizados em medicamentos destinados ao uso otológico na clínica de pequenos animais e estudamos seus principais efeitos sistêmicos, ao longo de 7, 14 e 21 dias de uso contínuo, de acordo com as instruções dos fabricantes e também como é prescrito por médicos veterinários.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fisiologia e Regulação Neuroendócrina

As glândulas adrenais são um par de órgãos endócrinos que possuem em córtex e medula, que diferem quanto à função, desenvolvimento e estrutura (MAITRA; ABBAS, 2005). A medula adrenal está funcionalmente relacionada com o sistema nervoso simpático; secreta os hormônios epinefrina e norepinefrina (GYTON; HALL, 2002).

O córtex adrenal sintetiza uma variedade de esteróides a partir do colesterol e os libera na circulação; esses esteróides com efeitos no metabolismo intermediário são denominados 'glicocorticóides' e são produzidos principalmente nas camadas da adrenal denominadas zonas fasciculada e reticular; os esteróides com atividade primariamente de retenção de sal são denominados de mineralocorticóides e são sintetizados na zona glomerulosa (FERGUSON; HOENIG, 2003).

Os corticóides são sintetizados quando necessário, não sendo estocados nas células adrenais; o principal estímulo para a sua secreção é o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), produzido por células basófilas da adeno-hipófise; a secreção de ACTH é regulada parcialmente pelo hormônio liberador de corticotrofina (CRH), de origem hipotalâmica e parcialmente pelas concentrações sanguíneas de glicocorticóides, que por sua vez é controlada pelos níveis de glicocorticóides, por estímulos do SNC e, em menor extensão, pelos níveis de ACTH, ilustrado na figura 1 (JERICÓ, 1999).

O ACTH aumenta a atividade da colesterol esterase, a enzima que catalisa a etapa da limitação da velocidade da síntese de hormônios esteróides (colesterol → pregnolona); estimula também a hipertrofia e a hiperplasia das glândulas supra-renais (FITZGERALD, 2006; RAMALHO, 2006).

A regulação da liberação do ACTH é mediada pelos níveis circulantes dos glicocorticóides, os quais exercem uma influência retroalimentadora negativa. A liberação de corticotropina e a elevação subsequente dos glicocorticóides circulantes são afetados pelo estresse emocional e físico (BANKS, 1992); níveis séricos elevados de glicocorticóides e suas ações inibem a produção hipotalâmica do hormônio de liberação da corticotrofina que diminui a

corticotrofina e consequentemente, a do cortisol; estresse físico, emocional e químico, como dor, trauma, hipóxia, hipoglicemia aguda, exposição ao frio, cirurgia, depressão, estimulam secreção de ACTH e cortisol (RAMALHO, 2006).

Os hormônios hipotalâmicos e hipofisários são peptídeos que exercem seus efeitos através de sua ligação a receptores-alvo da membrana celular com alta afinidade e especificidade (FITZGERALD, 2006). Os corticosteróides, assim como outros hormônios esteróides, interagem com proteínas receptoras intranucleares, específicas, de modo a regular a expressão dos genes responsivos aos corticosteróides, alterando os níveis e a deposição das proteínas sintetizadas pelos tecidos-alvo. Por causa da sua lipossolubilidade, os corticosteróides são capazes de atravessar a membrana plasmática e se ligar aos seus receptores, localizados no interior do núcleo, distribuídos em células de todos os tecidos, modificando sua expressão gênica (ANDRADE; JERICÓ, 2002).

A maior utilidade clínica do ACTH consiste em testar a integridade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal para identificar pacientes com insuficiência adrenal que necessitam de suplementação de corticosteróide em situação de estresse (DÓREA, 2006).

Fonte: www.inec-usp.org.

Figura 1: Secreção de glicocorticóides pela glândula adrenal

2.2 Farmacologia dos Glicocorticóides

Os corticosteróides são geralmente classificados de acordo com sua potência relativa na retenção de sódio, efeitos sobre o metabolismo de carboidratos (deposição hepática de glicogênio e gliconeogênese) e efeitos antiinflamatórios, como mostra a tabela 1. Com base nessas potências diferenciadas, os corticóides são tradicionalmente divididos em glicocorticóides e mineralocorticóides e, de acordo com a duração de seus efeitos, em ação curta, intermediária e longa. Os principais representantes naturais dos glicocorticóides são a hidrocortisona (cortisol) e a corticosterona, e dos mineralocorticóides a aldosterona. Os glicocorticóides são importantes agentes antiinflamatórios e imunossupressores, exercendo profundos efeitos sobre quase todos os sistemas orgânicos (ANDRADE; JERICÓ, 2002).

Os mineralocorticóides receberam esse nome por sua propriedade de afetar especialmente os eletrólitos (“minerais”) dos líquidos extracelulares – o sódio e o potássio, em particular. Os glicocorticóides receberam seu nome por exercerem efeitos importantes sobre o metabolismo de carboidratos que aumentam a glicemia. Além disso, exercem efeitos adicionais sobre o metabolismo das proteínas e das gorduras, que são tão importantes para o funcionamento do corpo quanto seus efeitos sobre o metabolismo de carboidratos (GUYTON; HALL, 2002). A liberação da insulina pelo cortisol pode ser responsável pelo aumento da deposição de lipídeos, já que promove a lipogênese e o aumento de tecido adiposo (BANKS, 1992).

Tabela 1: Potência antiinflamatória, de retenção de sódio e afinidade por receptor glicocorticóide dos diversos corticosteróides, comparada com a hidrocortisona como padrão

Corticosteróide	Potência antiinflamatória (glicocorticóide)	Potência de retenção de Na⁺ (mineralocorticóide)	Afinidade por receptor glicocorticóide
Ação curta (12h)			
Hidrocortisona	1	1	1
Cortisona	0,8	0,8	0,01
Fludrocortisona	10	125	-
Ação intermediária (12 a 36h)			
Prednisona	4	0,8	0,05
Prednisolona	5	0,8	2,2
Metilprednisolona	5	0,5	11,9
Triancinolona	5	0	1,9
Ação longa (36 a 72h)			
Betametasona	25	0	5,4
Dexametasona	25	0	7,1
Flumetasona	30	0	-

Fonte: adaptado de ANDRADE; JERICÓ, 2002

Segundo Gyton e Hall (2002), outros esteróides com atividades glicocorticóides ou mineralocorticóides, ou ambas as atividades, são normalmente secretados em pequenas quantidades pelo córtex adrenal:

- Mineralocorticóides:

- Aldosterona (muito potente, responsável por cerca de 90 % de toda a atividade mineralocorticóide);
- Desoxicorticosterona (1/30 da potência da aldosterona; secretada em quantidade muito pequena);
- Corticosterona (ligeira atividade mineralocorticóide);
- Cortisol (atividade mineralocorticóide muito leve; secretado em grande quantidade).

- Glicocorticóides:

- Cortisol (muito potente, responsável por cerca de 95 % de toda a atividade glicocorticóide);
- Corticosterona (fornece cerca de 4 % da atividade glicocorticóide; menos potente do que o cortisol);

As propriedades antiinflamatórias dos glicocorticóides são funções significantes. Esses hormônios estabilizam as membranas lisossômicas, diminuem a síntese de colágeno, aumentam a degradação de colágeno e inibem a proliferação de fibroblastos (BANKS, 1992).

Os glicocorticóides, após serem sintetizados pelo córtex adrenal, são secretados rapidamente e levados pela circulação aos diferentes órgãos-alvo (aqueles que possuem receptores específicos), onde exercerão suas ações. Por serem compostos lipofílicos, eles se distribuem livremente nos espaços extra e intracelulares, após atravessarem a membrana da célula. A parcela ligada à albumina e a porção livre no sangue são mais vulneráveis à biotransformação hepática; o fígado reduz a dupla ligação e os grupos cetônicos importantes da moléculas dos esteróides, inativando-os. Quando metabolizados ou conjugados com ácido glicurônico, os corticóides tornam-se mais polares e hidrossolúveis, dificultando sua ligação com proteínas plasmáticas, sendo mais facilmente eliminadas pelo rim (DÓREA, 2006).

Os corticóides atravessam as membranas celulares provavelmente por difusão; o receptor se localiza dentro da célula e assim, hormônio e receptor ligados formam um complexo no citoplasma; segue-se modificação conformacional da molécula do receptor, ocasionando alta afinidade de ligação com o DNA; esse complexo penetra no núcleo da célula e parte do

receptor liga-se com uma porção específica do genoma, regulando a transcrição de RNA (MACEDO; OLIVEIRA, 2006).

Segundo Jericó (1999), a estrutura dos esteróides determinam a sua atividade; todos os hormônios do córtex adrenal possuem uma estrutura básica, o ciclopentanoperidrofenantreno; a atividade glicocorticóide é conferida por um composto de 21 carbonos (uma hidroxila em C-11, uma cetona em C-20 e em C-3; e uma dupla ligação entre C-4 e C-5); a adição de uma dupla ligação entre o primeiro e o segundo carbonos e a metilação de C-6 e C-16, podem modificar a potência antiinflamatória, neste caso, aumentando-a, dos glicocorticóides.

O principal corticosteróide circulante, na maioria da espécie, é a hidrocortisona (cortisol); nos roedores, porém, segundo Handa et al., (1994), a corticosterona é encontrada em quantidade bem superior que o cortisol; este normalmente, é secretado em baixa taxa de manutenção, com aumento nas quantidades disponíveis durante o estresse (WEBSTER, 2005).

A estrutura básica da hidrocortisona é a mesma de todos os esteróides e que, quando alterados, destroem sua atividade glicocorticóide. Alterações nas moléculas de hidrocortisona e cortisona deram origem aos compostos glicocorticóides atuais (análogos sintéticos), potentes antiinflamatórios e com baixa capacidade de retenção de sódio (MACEDO; OLIVEIRA, 2006).

Segundo Chrousos (2006), depois da utilização da hidrocortisona, observou-se que a triancinolona e a fluocinolona (os derivados acetônida dos esteróides fluorados), exibem uma nítida vantagem no tratamento tópico; a betametasona pode chegar a ser 300 vezes mais potente que a hidrocortisona quando adicionada à uma cadeia de valerato, explicando assim, seus efeitos quando empregada terapêuticamente nesta formulação química.

2.3 Noções de Imunologia

Em alguns sentidos o sistema imunitário pode ser comparado a um estado totalitário em que os estrangeiros são expelidos e os cidadãos que se comportam são tolerados, e aqueles que se “desviam” são eliminados (TIZARD, 1985).

A imunidade pode ser arbitrariamente dividida em respostas imunes inatas e adaptativas. As respostas imunes inatas são altamente baseadas na atividade de células fagocitárias, como os macrófagos e neutrófilos, que combatem uma grande variedade de agentes. Além disso, existe uma resposta imune chamada de adaptativa, que seria uma resposta específica, baseada por exemplo, na produção de anticorpos a um agente infeccioso específico, e esta confere imunidade protetora contra reinfecções pelo mesmo agente infectante.

Segundo Janeway-Jr e Travers (1997), tanto a imunidade inata como as respostas adaptativas dependem da atividade das células brancas do sangue, os leucócitos. No que se refere à imunidade inata, esta é amplamente mediada pelos granulócitos, assim chamados porque contém grânulos citoplasmáticos evidentes, e por macrófagos. Por sua vez, as respostas adaptativas são mediadas por linfócitos, que proporcionam a imunidade duradoura.

Há três tipos de granulócitos: os neutrófilos, os eosinófilos e os basófilos. Os neutrófilos são células fagocitárias, produtores de espécies reativas de oxigênio; os eosinófilos são importantes na defesa contra parasitas e os basófilos atuam na proteção de superfícies mucosas e liberam histamina nas reações alérgicas.

Há dois tipos de principais de linfócitos: as células B que, quando ativadas, diferenciam-se em plasmócitos, capazes de secretar anticorpos; e linfócitos T, das quais se reconhecem duas classes principais: uma inclui as células T citotóxicas, que matam as células infectadas por vírus ou com outras alterações perceptíveis em sua membrana plasmática e a outra as células T auxiliares, com função ativadora sobre linfócitos B e macrófagos.

Na imunidade inata, temos os neutrófilos polimorfonucleares (PMN), macrófagos e células *natural-killer* (NK). Os basófilos, eosinófilos e os neutrófilos estão nesse grupo de PMN que, são do que células fagocíticas de vida curta, que contém lisossomos ricos em enzimas para facilitar a destruição de microorganismos.

Os macrófagos são fagócitos derivados dos monócitos do sangue, que migram para diferentes tecidos onde sofrem diferenciação. Dependendo do órgão onde estão localizados recebem diferentes nomes como células de Kupffer no fígado, macrófagos alveolares no pulmão, macrófagos esplênicos na polpa branca do baço e células microgliais no sistema nervoso central. As suas principais funções são a remoção de bactérias e parasitas do corpo e participar na interface entre a resposta imune inata e a adaptativa através da digestão parcial

dos microorganismos e apresentação de seus antígenos para os linfócitos T, sendo também classificados como células apresentadoras de antígeno (APC) (TIZARD, 1985).

As células dendríticas (DC) são células também derivadas de precursores hematopoiéticos como os monócitos, mas ficam da forma imatura nos tecidos; o contato direto dos patógenos com estas, levam à sua maturação e o aumento da sua capacidade de apresentação de antígeno para os linfócitos T. As DC maduras podem ativar linfócitos T *helper naive* para linfócitos T *helper* efetores (Th1 ou Th2). As células Th1 ou células T inflamatória tem a função de ativar macrófago, induzindo a neutralização e expulsão do fagócito; as células Th2 ou células T auxiliares destroem as células infectadas e ativando os macrófagos, mas atuam principalmente na eliminação de agentes extracelulares ativando os linfócitos B e gerando a secreção de imunoglobulinas específicas (COICO; SUNSHINE; BENJAMINI, 2003).

As células NK são grandes linfócitos granulares que podem induzir a morte de células infectadas; esta pode ocorrer quando a célula alvo apresenta diminuição ou ausência da expressão do complexo de histocompatibilidade (MHC) classe I, que é expresso na superfície de todas as células nucleadas normais. MHC de classe I pode exibir fragmentos de proteínas virais na superfície da célula, reconhecidos por linfócitos T auxiliares; MHC de classe II exibe peptídeos derivados de antígenos ingeridos por macrófagos ou internalizados pelas células B, reconhecidos por linfócitos T inflamatórios (PARHAM, 2001).

A imunidade adaptativa pode ser predominantemente humoral ou celular; a resposta humoral é mediada principalmente pelos linfócitos B e anticorpos circulantes; já a celular é mediada por linfócitos T, que de acordo com as moléculas específicas expressas em sua superfície são divididos em dois subtipos: linfócitos T helper (Th) ou T CD4⁺ e linfócitos T citotóxicos CD8⁺.

Os linfócitos T helper, quando ativados, produzem muitas citocinas que aumentam as atividades de outras células do sistema imune, para torná-la mais efetivas; dependendo do tipo de antígeno, ocorre a estimulação do linfócito T naive para um outro tipo de célula efetora Th1, quando se trata de antígenos virais ou bactérias intracelulares, ou Th2, para antígenos de bactérias extracelulares, parasitas e toxinas.

Os linfócitos T citotóxicos reconhecem células infectadas por vírus ou bactéria ou células mutantes, produzem perforinas e granzimas que levam esta célula alvo a apoptose.

Assim, os linfócitos Th1 vão produzir citocinas inflamatórias, como IFN- γ , que atuam sobre macrófagos aumentando sua atividade bactericida, ou seja, a ativação de linfócitos Th1 contribui para melhorar a resposta imune celular. Já os linfócitos Th2 produzem outras citocinas, como a IL-4 que ativa os linfócitos B a produzirem mais anticorpos melhorando, então, a resposta imune humoral.

Os órgãos linfóides podem ser divididos em centrais (medula e timo), onde são gerados os linfócitos e periféricos (baço e linfonodos), onde se iniciam as respostas adaptativas.

Linfócitos B e T surgem na medula óssea; os linfócitos B se diferenciam ali mesmo e os linfócitos T migram para o timo para amadurecer; depois da fase de maturação, os dois linfócitos entram na corrente sanguínea e migram para órgãos linfóides periféricos

Para Janeway-Jr e Travers (1997), os linfonodos são estruturas linfóides altamente organizadas, atuando como sítios de convergência de um extenso sistema de vasos (vasos linfáticos) que coletam o fluido extracelular dos tecidos (linfa), fazendo-os retornar para o sangue. Nos linfonodos, os linfócitos B se localizam em folículos, com as células T mais difusamente distribuídas em torno das áreas paracorticais. Alguns dos folículos de células B contêm áreas centrais, denominadas centros germinativos, onde os linfócitos B se encontram sob intensa proliferação após seu encontro com o antígeno.

O baço está envolvido por uma cápsula de tecido conjuntivo, que emite septos (trabéculas) para o interior do órgão. Estes septos não delimitam lóbulos completos no órgão, mas formam o arcabouço (estroma) do órgão. O parênquima do baço é dividido estrutural e fisiologicamente em duas regiões: a polpa branca e a polpa vermelha. A polpa branca se refere aos pontos branco que encontramos no corte histológico do baço. Esses pontos são os corpúsculos de Malpighi. Este corpúsculo é que dá a função de órgão linfóide ao baço. Ele representa o sítio de maturação dos linfócitos. Há o centro germinativo que é o local onde existem linfoblastos e pro-linfócitos B em diferenciação. Já na periferia existem linfócitos maduros prontos a realizar alguma resposta imune, que podem sair para o sangue. O corpúsculo recebe no centro uma arteríola, chamada arteríola da polpa branca. Ao redor dela encontramos a bainha periarterial, que é o local onde estão os linfócitos T em processo de

maturação e desenvolvimento. A polpa vermelha é o restante do órgão, que tem a coloração bem vermelha, devido a alta concentração de hemácias no órgão.

A principal função dos órgãos linfóides secundários é permitir a interação dos linfócitos com os antígenos carregados pela linfa e pelo sangue e células do sistema imunológico, que vão iniciar as respostas imunes adaptativas.

2.4 Glicocorticóides e Imunossupressão

Em altas doses, os corticosteróides são imunossupressores. Os efeitos antiinflamatórios e imunológicos dos corticosteróides estão intimamente relacionados, ambos resultantes da inibição das funções dos leucócitos e macrófagos (WEBSTER, 2005).

Glicocorticóides estabilizam as células da membrana endotelial e inibem a produção de fatores de quimiotaxia locais, consequentemente diminuindo a infiltração de neutrófilos, monócitos e linfócitos (GREGORY, 2000).

Corticosteróides ministrados sistemicamente podem ter efeitos tóxicos para os linfócitos, especialmente para os timócitos corticais imaturos. Inibem também a atividade inflamatória dos macrófagos e de outras células fagocitárias, reduzindo ainda mais a resposta imune aos patógenos (JANEWAY-JR; TRAVERS, 1997).

Glicocorticóides redistribuem monócitos e linfócitos da circulação periférica para vasos linfáticos e medula óssea; a redistribuição afeta primariamente as células T, sua ativação e citotoxicidade são também reduzidos (GREGORY, 2000); porém seus efeitos imunológicos resultam provavelmente mais da sua capacidade de modificar as funções celulares do que de sua citotoxicidade direta (LAKE et al., 2006).

O modo de ação do glicocorticóide é pleiotrópico, diminuindo a quimiotaxia de neutrófilos, a atividade dos macrófagos, a produção de citocinas, por linfócitos T e a passagem de imunocomplexos através da membrana basal celular (HAGIWARA, 2000).

Os corticosteróides inibem ainda a síntese de citocinas, como a IL-2 e o interferon gama, a secreção de IL-1 pelos macrófagos e a expressão de moléculas de HLA de classe II e de moléculas de adesão pelas células endoteliais (CRUZ; CARVALHO, 2006).

Os efeitos inibitórios dos corticosteróides são mediados pela inibição da liberação e resposta das citocinas incluindo: 1) inibição da liberação de interleucina-1 e do fator de necrose tumoral por macrófagos ativados; 2) inibição da liberação de interleucina-2 por linfócitos; 3) inibição da ação da interleucina-2 nos linfócitos T e 4) inibição dos efeitos do interferon nos macrófagos (WEBSTER, 2005).

Além disso, o tratamento prolongado com esteróides provoca o enfraquecimento ósseo e dos tecidos conjuntivos e atrofia das glândulas supra-renais, devido à inibição da liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) pela hipófise (JANEWAY-JR; TRAVERS, 1997).

2.5 Anormalidades da Secreção Adrenocortical

Os principais problemas clínicos associados com o córtex adrenal são a hiper ou hipo produção dos esteróides adrenais (NORMAN; LITWACK, 1997).

A hipersecreção do córtex adrenal provoca uma doença chamada de “Síndrome de Cushing” atribuída na maioria das vezes que ocorre quantidades anormais de cortisol secretadas, embora a secreção excessiva de androgênios também possa causar efeitos importantes (GYTON, 2002).

As fontes de hipercortisolismo classificados como síndrome endógena são:

- doença primária da pituitária-hipotálamo, associado com a hipersecreção de ACTH;
- hipersecreção de cortisol por um adenoma adrenal, carcinoma ou hiperplasia nodular;
- secreção de ACTH por uma neoplasia não-endócrina.

Para Maitra e Abbas (2005), muitas condições produzem um aumento dos níveis de glicocorticóides. Na prática clínica, a causa mais comum da síndrome de Cushing é a administração exagerada de glicocorticóides. Hipercortisolismo iatrogênico é comum em

qualquer idade, especialmente em cães medicados com glicocorticóides de longa duração em razão de prurido crônico (MEDLEAU; HNILICA, 2003).

Segundo Macedo e Oliveira (2006), os glicocorticóides sofrem alterações na sua produção diária (provavelmente por estímulos hipotalâmicos) conhecidas como flutuações do ritmo circadiano; os níveis mais elevados se verificam de manhã e decrescem ao longo do dia; o ritmo circadiano é ditado pela hipófise, que produz maiores quantidades de ACTH a partir das 23 horas, estimulando as supra-renais a liberarem mais cortisol pela manhã. Segundo Simonneaux e Ribelayga (2003), em roedores, o pico de corticosterona é no início da noite. Pacientes com síndrome de Cushing possuem níveis altos e constantes dos glicocorticóides, indicando uma produção fora do controle fisiológico.

Reações adversas devido à terapia com glicocorticóide podem aparecer depois de cada tratamento ou uso prolongado. Insuficiência adrenal aguda pode ser resultado de uma interrupção abrupta num tratamento prolongado (BOOTHE; MEALEY, 2001).

Os glicocorticóides, em quantidades suprafisiológicas, provocam redução da massa muscular e fraqueza, bem como adelgaçamento da pele (CHROUSOS, 2006).

A alteração na morfologia da glândula adrenal depende da causa de hipercortisolismo. As adrenais podem ter uma das seguintes anormalidades: atrofia cortical, hiperplasia difusa, hiperplasia nodular ou nodular. A hiperplasia difusa é encontrada em 60-70% dos casos de Síndrome de Cushing (MAITRA; ABBAS, 2005).

Segundo Rockwell, Monroe e Tromblee (2005), o ACTH exógeno aumenta sua concentração no sangue e pode representar um único mecanismo patogênico para necrose adrenal em alguns cães.

O HAC é um distúrbio multisistêmico; o grau em que cada sistema se envolve varia consideravelmente; em alguns pacientes, podem predominar sinais referíveis a um sistema; outros apresentam vários sistemas envolvidos em grau comparável; frequentemente predominam sinais relacionados ao trato urinário ou à pele (TILLY; SMITH-R, 2003).

O hiperadrenocorticismismo (HAC) é diagnosticado com mais frequência em cães; nos gatos é raro (MULLER; KIRK; SCOTT, 1985; WATSON; HERITAGE, 1998; TILLY; SMITH-JR, 2003).

Segundo Dunn (2001), o hiperadrenocorticismo hipófise dependente responde por 80% dos cães e pela maioria dos gatos com hiperadreno de ocorrência natural. A secreção de ACTH excessiva resulta na hiperplasia adrenocortical bilateral e aumento da secreção de cortisol.

Hiperadrenocorticismo pituitário-dependente (PDH) é uma desordem endócrina espontânea comum em cães, demonstrando muitas semelhanças com a doença de Cushing em humanos (KEMPPAINEN; PETERSON, 1994).

Como em humanos com doença de Cushing, PDH em cães é caracterizado pelo hipercortisolismo induzido pelo ACTH e diminuição da sensibilidade da inibição do feedback de glicocorticóide (REJNBERK; VANWEES, 1988; BOSJE et al., 2002; LAMBERTS, 2002; REIMOND et al., 2003).

Os Poodles, os Dachshunds, os Boston Terriers, os Boxers e os Beagles encontram-se em um risco notadamente aumentado; nenhuma predisposição aparente em gatos (MULLER; KIRK; SCOTT, 1985; MEDLEAU; HNILICA, 2003; TILLY; JR, 2003).

2.6 O Processo Inflamatório

A inflamação é uma série complexa de alterações vasculares e teciduais que se desenvolvem em resposta à uma injúria (CHEVILLE, 1994).

Antes de 1956, Rindani sugeriu que a reação inflamatória poderia ser um processo auto-limitante e antecipando a presença de alguns fatores na área inflamada que seriam responsáveis pela reação e pela sua inibição (GARCIA LEME, 1989)

A inflamação pode ser considerada como parte do sistema imunológico, o chamado sistema imune inato, assim denominado por sua capacidade para desenvolver uma resposta inespecífica contra agressões e ou patógenos previamente e geneticamente definidos pelo organismo agredido, se contrapondo à imunidade adquirida, onde o organismo precisa entrar em contato com o agressor, identificá-lo como estranho e potencialmente nocivo e só então produzir uma resposta.

Existem vários tipos de células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, linfócitos T e B, células dendríticas e endotélias, dentre outras) e cada uma destas células tem uma

diferente função, por isso, nem todas são recrutadas em todos os eventos inflamatórios; essas células se tornam ativas no foco da inflamação e produzem mediadores inflamatórios que modulam a resposta inflamatória (MAJNO; JORIS, 2004; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Celsus, um filósofo Romano, enunciou os quatro sinais da inflamação: o rubor, o tumor, o calor e a dor. Mais tarde, Rudolf Virchow, adicionou um quinto: a perda da função (CHEVILLE, 1994).

Um dos eventos da resposta inflamatória é o aumento da permeabilidade do endotélio do leito vascular, o que leva à saída das proteínas plasmáticas dos vasos sanguíneos para o interstício e, em seguida, são processados por células fagocitárias e drenados para o sistema linfático; em seguida, ocorrem eventos vasculares mediados principalmente pela histamina, aumentando a irrigação sanguínea (hiperemia ou rubor) e produção local de mediadores inflamatórios que promovem um aumento da permeabilidade vascular e quimiotaxia (processo de atração em direção a um gradiente de concentração de moléculas que, no caso da inflamação, recruta leucócitos para um sítio de lesão). Desta forma ocorre a fagocitose de elementos que estão no foco da lesão, produzindo mais mediadores químicos, dentre os quais estão as citocinas, quimiocinas, prostaglandinas e leucotrienos; moléculas de adesão são expressas na superfície das células endoteliais que revestem os vasos e estas, irão mediar a adesão e a diapedese dos monócitos circulantes e outras células inflamatórias para o local da inflamação (DUNLOP; MALBERT, 2004).

Todos esses fatores atuam em conjunto, levando aos eventos celulares e vasculares da inflamação. Ocorre inicialmente um aumento do calibre de vasos sanguíneos da microcirculação e conseqüentemente hiperemia e aumento da temperatura local; em seguida ocorre o extravasamento do líquido intravascular para o espaço intersticial, causando o edema; a dor é causada pela estimulação das terminações nervosas por algumas dessas substâncias liberadas durante o processo inflamatório, somada à hiperalgesia (aumento da sensibilidade dolorosa) promovida pelas prostaglandinas e pela bradicinina e, em parte, pelo edema (LYDYARD; GROSSI, 2003).

Como foi dito, vários tipos celulares estão envolvidos no desenvolvimento de um processo inflamatório. Os mastócitos, que podem estar relacionados às manifestações alérgicas, nas quais desgranulam após a ligação de imunoglobulinas E (IgE) e antígenos ativando seus receptores, podem também liberar histamina e serotonina em reações inflamatórias agudas.

Leucócitos polimorfonucleares, representados por neutrófilos, eosinófilos e basófilos, participam ativamente do processo inflamatório agudo; os monócitos, que, quando adentram o tecido inflamado transformam-se em macrófagos e estão relacionados com o processo inflamatório crônico e muito importante, pois fagocitam restos de tecidos mortos e agentes patogênicos; e as células do endotélio vascular que promovem a vasodilatação através da liberação de óxido nítrico (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Após a injúria, ocorre ativação do sistema complemento que estimula mais a produção de citocinas por monócitos e macrófagos, relevantes para a própria inflamação e reparação tecidual (HILL, 2000); as citocinas são pequenas proteínas responsáveis pela “comunicação” celular, sendo secretadas por todas as células e que se ligam a receptores específicos (MAJNO; JORIS, 2004; ABBAS, 2005;). O TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e a IL-1 (interleucina 1) são as principais citocinas que modulam a inflamação agindo no endotélio, leucócitos, fibroblastos e induzindo a resposta de fase aguda sistêmica juntamente com a IL-6 (interleucina 6) (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Os mediadores inflamatórios originados a partir da quebra enzimática do ácido araquidônico atuam nos eventos relacionados aos mecanismos vasculares e celulares da inflamação; os mediadores químicos de origem plasmática, dentre eles os componentes do sistema de coagulação e o sistema fibrinolítico, são capazes de regular o processo inflamatório e podendo ativar o sistema complemento, para eliminação dos organismos patogênicos. O sistema de citocinas também são importantes, pois favorecem a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular (CHURCH et al., 1989).

Assim, certos produtos polipeptídeos de linfócitos e monócitos ativados têm sido reconhecidos por muito tempo como envolvidos em respostas imunológicas celulares, como o recrutamento fagocitário e proliferação linfocitária; sendo assim, alguns desses produtos possuem efeitos adicionais que tem papel importante na resposta inflamatória (LE; VILCEK, 1987)

Os radicais livres de oxigênio são produzidos durante o metabolismo de células ou provenientes da ativação de fagócitos e são denominadas de ERO (espécies reativas de oxigênio) e, quando liberadas por fagócitos ativados, resultam de uma sequência de reações bioquímicas com alto consumo de oxigênio e conhecidas com *burst* oxidativo; esses radicais são produzidos principalmente por neutrófilos (MASSOCO, 2003).

Bass et al., (1983) descreveram um método de mensuração da produção de radicais livres por leucócitos polimorfonucleares utilizando a técnica de citometria de fluxo e o composto 2'-7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH); a fluorescência resultante da oxidação de DCFH provocada pelos radicais presentes no meio intracelular é relacionada de maneira linear ao *burst* oxidativo.

A ação antiinflamatória de certos fármacos podem ser classicamente demonstradas em estudo experimental, como o edema de pata induzido pela administração da carragenina no coxim plantar, por ter sido o que melhor permitiu a quantificação da observação experimental dos efeitos dos antiinflamatórios (BAZERQUE, 1979).

Fatores inflamatórios endógenos gerados no sítio da inflamação estimulam também o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e são capazes de aumentar a secreção de corticosteróides (GARCIA LEME, 1989). Tal mecanismo de regulação trabalha ativamente regulando a magnitude dos processos inflamatórios na forma de retroalimentação negativa. Todos os passos do processo inflamatório podem ser bloqueados ou retardados pelo uso de glicocorticóides.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos sistêmicos das aplicações otológicas, de três diferentes glicocorticóides de uso tópico, a hidrocortisona, a betametasona e a triancinolona em ratos adultos e jovens, em tratamentos realizados durante 7, 14 e 21 dias.

3.2 Objetivos Específicos

1. Avaliação dos efeitos dos glicocorticóides tópicos sobre uma resposta inflamatória aguda induzida pela carragenina em ratos por meio da avaliação do edema inflamatório no tecido celular subcutâneo do coxim plantar;
2. Avaliar os efeitos dos glicocorticóides tópicos sobre a variação de peso os animais;
3. Avaliar os efeitos dos glicocorticóides tópicos nos pesos relativos de baço e adrenais;
4. Avaliar os efeitos dos glicocorticóides tópicos no hemograma completo;
5. Avaliar os efeitos dos glicocorticóides tópicos nas dosagens de corticosterona;
6. Avaliar os efeitos dos glicocorticóides tópicos na atividade dos neutrófilos através da citometria de fluxo;
7. Avaliar os efeitos dos glicocorticóides tópicos sobre a atividade proliferativa de linfócitos T e B;
8. Avaliar os efeitos dos glicocorticóides tópicos sobre o histopatológico de órgãos linfóides e estérno.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-USP); a dosagem de cortisol plasmático foi realizado no laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal (VRA), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

4.1 Animais

Foram utilizados ratos machos adultos jovens, com aproximadamente 60 dias de idade, provenientes do biotério do Departamento da Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Os animais foram utilizados em conformidade com as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório da FMVZ-USP, protocolo nº 1515/2008. Durante todos os experimentos, os animais foram mantidos em caixas de plástico fosco com tampa, medindo 19,5 x 29,5 x 13 cm, contendo no máximo 5 animais por unidade. Estas ficaram alojadas em salas com temperatura e umidade aproximadamente constantes, temperatura entre 22-25 °C e umidade relativa de 65 a 70 %, através de aeração, exaustão e ventilação; iluminação mantida em um ciclo de noite/dia de 12h. Os animais foram alimentados com ração balanceada para roedores e água *ad libitum*. Todos os animais foram pesados antes do início do tratamento, mantidos nestas condições durante todo o tratamento; no dia da indução e medição do edema de pata, os animais foram transferidos para outro laboratório, sem condições controladas de temperatura, umidade ou iluminação e mantidos lá 24 horas até o início dos experimentos no laboratório, para onde foram transportados.

4.2 Fármacos, Reagentes e Soluções

- Acetato de dexametazona injetável (Azium ®);
- Veículo otológico a base de vaselina;

- Acetato de hidrocortisona – manipulada pela Fórmula Médica® (Farmácia de manipulação);
- Valerato de betametasona – manipulada pela Fórmula Médica® (Farmácia de manipulação);
- Acetonido de triancinolona – manipulada pela Fórmula Médica® (Farmácia de manipulação);
- Água Destilada;
- Ácido Fórmico (Merck®) – substância utilizada para descalcificação do esterno para histopatológico;
- Carragenina Kappa (Sigma®) – irritante utilizado para induzir resposta inflamatória;
- Lauril sulfato de sódio (Merck®) – substância constituinte da solução utilizada na plestimografia;
- Cloreto de sódio (Nuclear®) - substância constituinte da solução utilizada na plestimografia;
- Diacetato 2'7' Diclorofluoresceína (DCFH-DA/ Molecular Probes, Eugene, OR, USA) – empregado na citometria de fluxo; mantido congelado (-20 C) e protegido da luz, sendo dissolvido em PBS no momento de uso;
- EDTA (Sigma®, St Louis, MO, USA);
- Heparina (Liquemine® – Roche, São Paulo, SP, Brasil);
- Iodeto de Propídeo (PI) (Sigma®, St Louis, MO, USA) – utilizado na técnica de citometria de fluxo, responsável pela emissão de fluorescência vermelha captada pelo citômetro;
- PBS (Phosphate-buffered saline, pH=7,2 – 7,4) – Solução utilizada nas técnicas de burst oxidativo e fagocitose;
- PMA- Miristato-acetato de forbol –(Calbiochem®, San Diego, CA, USA)- utilizado como estímulo para desencadear o burst oxidativo de neutrófilos;
- Soluções de NaCl 0,2% e 1,6% - Soluções utilizadas com o objetivo de romper as hemácias presentes nas amostras analisadas no citômetro de fluxo;
- Kit de corticosterona Coat-a-Count (DPC®, Los Angeles, CA, USA) – Kit de radioimunoensaio para dosagem de corticosterona;

- Formol (Quimex®) – utilizado para fixação de fragmentos de tecidos;
- LPS – cepa 0127:B8 (Sigma®) – utilizado como mitógeno para linfócitos B;
- RPMI 1640 (GIBCO®) – meio de cultura celular;
- Azul de Tripan (GIBCO®) – corante utilizado para contagem de células e determinação de viabilidade celular;
- Corante de May-Grunwald modificado por Rosenfeld: foi adicionado 0,97g de Giemsa (Merck®), 0,53g de May-Grunwald (Merck®) em 1.000mL de Metanol (PA) (Synth®). Esta suspensão foi homogeneizada e armazenada em frasco âmbar durante 1 mês e filtrada toda vez antes de ser utilizada. A proporção de uso indicada para cada extensão de sangue foi de 1,5mL de corante durante 5 minutos, acrescidas da mesma proporção de água durante 10 minutos. As extensões foram lavadas sob jato de água corrente e seca ao ar.

4.3 Indução da Resposta Inflamatória Aguda

A resposta inflamatória foi induzida pela injeção de carragenina (Kappa) na concentração de 1% (diluída em solução de Ringer) no tecido subcutâneo do coxim plantar posterior esquerdo de cada rato (0,1ml de solução). A suspensão de carragenina era sempre preparada antes das injeções e não foi reutilizada em outro experimento; e esta era dissolvida por cerca de 5 minutos com o auxílio de um banho sonificador (Microsonic SX-20®) para se obter o máximo de dissolução da substância. Foram utilizadas seringas (0,5ml) descartáveis (Becton-Dickson – Ultra-Fine®) contendo agulhas finas (29 G ½” – 12,7mm x 0,33mm) para as injeções de carragenina, diminuindo eventuais agressões físicas ao tecido.

Foi utilizado um pletismógrafo digital (Plethysmometer – Ugo Basile®) para medir o volume do coxim plantar dos ratos; as medidas foram tiradas antes, 1, 2, 3, 4, 6 e 8 horas após a injeção da carragenina. Os resultados obtidos foram expressos em mililitros (ml).

4.4 Quantificação dos níveis de Corticosterona Plasmática

Foi realizada a coleta de sangue dos animais de todos os grupos por decapitação; esse sangue foi centrifugado sob refrigeração (2.000 rpm/15 minutos e temperatura ao redor de 1 °C) para a obtenção do soro. Estes foram armazenados em *eppendorfs* de polietileno em *freezer* a -20°C.

Para a coleta do sangue, os animais foram mantidos longe da sala de decapitação para evitar o estresse, podendo alterar o exame.

As amostras de soro foram retiradas do *freezer* e mantidas à temperatura ambiente para o descongelamento e analisadas. As dosagens para quantificação de corticosterona foram realizadas por radioimunoensaio em fase sólida, utilizando kits comerciais (Coat-a-Count - DPC®) específicos para a corticosterona em ratos.

Nesta técnica, há competição de corticosterona de ratos marcados com $[I^{125}]$ e do hormônio contido na amostra (soro), pelos sítios de anticorpos fixados à parede do tubo de ensaio (“fase sólida”). Foi pipetado dentro de cada tubo de ensaio um volume de 50 µl de cada amostra de soro dos animais controles e experimentais. Após a adição de 1 ml da corticosterona marcada com $[I^{125}]$, estes tubos foram incubados à temperatura ambiente durante 2 horas para atingirem um equilíbrio. A seguir, o conteúdo dos tubos foi desprezado por decantação procedendo-se à leitura da radioatividade remanescente (mantida durante 1 minuto) através de um Contador Automático de Radiação Gama (Packard®). Os resultados finais das contagens por minuto (cpm) foram expressos em ng/ml.

Para obtenção de uma curva padrão de corticosterona, foram utilizados calibradores-padrões (50 µl) com concentrações previamente conhecidas de corticosterona (0 – 20 – 50 – 100 – 200 – 500 – 1.000 – 2.000 ng/ml) no ensaio realizado.

Foram também utilizados soros controles (50 µl), adicionados de uma concentração de 200 ng/ml de corticosterona para a leitura no início, no meio e no fim do ensaio.

Os ensaios para dosagem de corticosterona foram realizados no Laboratório de dosagens Hormonais do departamento de Reprodução Animal (VRA), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

4.5 Citômetro de Fluxo

Foi utilizado um citômetro de fluxo (FACScalibur Becton Dickinson Immunocytometry Sistem, San Jose, CA, USA) conectado com um computador (Macintosh Apple, CA, USA). Foram analisados 10.000 eventos utilizando-se o software Cell Quest Pro (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA).

As subpopulações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades *FSC Forward Scatter* e *SSC – Side Scatter* do aparelho que avaliam o tamanho e a complexidade internas das mesmas. A fluorescência verde do DCFH foi mensurada a 530 ± 30 nm e a fluorescência do *S. aureus* marcado com o iodeto de propídeo mensurada a 585 ± 42 nm. A fluorescência verde emitida pelo DCFH foi usada para estimar o *burst* oxidativo das células analisadas em diferentes situações de estimulação. A fagocitose foi estimada pela intensidade média de fluorescência/célula emitida pelo PI. A porcentagem de fagocitose (neutrófilos que fagocitaram as bactérias) foi calculada através do número de neutrófilos fluorescentes divididos pelo número total destas células e multiplicado por 100. As fluorescências do PI e do DCFH foram analisadas utilizando-se compensação de fluorescência para corrigir alguma interferência de sinais emitidos pelo mesmo. As populações de neutrófilos foram analisadas pelo Cell Quest Pro®, excluindo-se os linfócitos e monócitos pela análise dos *gates*. Para todos os experimentos, o aparelho era calibrado com um tubo branco usado como controle de fluorescência basal da célula a ser analisada.

Para obtenção de neutrófilos sanguíneos, o sangue foi coletado logo após a decapitação dos animais, em *ependorfs* contendo 10 μ L de heparina sendo colocados em banho de gelo.

Para a avaliação do burst oxidativo e da fagocitose de neutrófilos por citometria de fluxo, as amostras foram preparadas de acordo com Hasui, Hirabayashi, Kobayashi (1985), descrito a seguir.

Após eutanásia, o sangue foi individualmente coletado e uma bateria de 5 tubos para cada animal foi montado, enumerados de “A” até “E”; cada tubo recebeu uma substância diferente; desta forma, todos os tubos receberam alíquotas que correspondem a 2×10^5 cel/100 μ L de sangue. Os tubos com as letras “B”, “D” e “E” receberam 200 μ L da solução de DCFH-DA 3 mM cada. Os tubos com letra “C” e “D” receberam 100 μ L da solução SAPI (100ng). Os

tubos de letra “E”, receberam 100 μ L de PMA (100ng). Todos os tubos foram completados com PBS 1x para ter o volume final de 1 100 μ L.

As soluções, reagentes e estímulos citados foram preparados conforme descritos por Alves (2005).

Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria sob refrigeração à 37°C por 30 minutos; depois, foram adicionados 2 ml de EDTA 3 mM nos tubos “C” e “D” para interromper a fagocitose, sendo os mesmos centrifugados em seguida à 1200 RPM por 10 minutos. Desprezado o sobrenadante, as células foram ressuspensas por agitação manual e realizando-se então, a lise hipotônica das amostras com soluções de NaCl a 0,2% e 1,6%. Primeiramente, foi colocado em cada tubo 2 ml de solução de NaCl 0,2%, imediatamente, colocou-se mais 2 ml de solução de NaCl 1,6% para tornar a solução isotônica novamente. Após centrifugação, foi realizada uma nova lise hipotônica. Após a segunda lise, os tubos foram centrifugados novamente e os sobrenadantes desprezados; as células resultantes foram ressuspensas em 200 μ L de PBS gelado.

Após obtenção das amostras, foi realizada leitura no citômetro de fluxo; os tubos “C” e “D” foram utilizados para avaliação de fagocitose, enquanto os tubos “B” e “E” foram utilizados na avaliação do *burst* oxidativo. Cada amostra passou pelo citômetro uma vez e em cada uma delas foram adquiridos 10.000 eventos (células). Os valores referentes ao *burst* oxidativo das amostras foram avaliados por meio de média geométrica da intensidade de fluorescência emitida pela população de neutrófilos. O valor da média geométrica foi fornecido pelo software sendo utilizado para indicar a intensidade de fluorescência das células. Com relação à atividade fagocítica, verificou-se a porcentagem de fagocitose, ou o número de neutrófilos que fagocitaram o *S. aureus* marcado com PI e que emitiram fluorescência vermelha, divididos pelo número total destas células multiplicadas por 100. Foi avaliado também a intensidade de fagocitose (quantidade de bactérias fagocitadas) por meio da média geométrica da intensidade de fluorescência emitida pelos neutrófilos.

4.6 Avaliação da Atividade Proliferativa de Linfócitos

Foi coletada uma parte do baço e macerado em 5 ml de RPMI-1640 estéril formando uma suspensão de células; esta suspensão foi centrifugada a 1200 rpm/8 minuto e ressuspensa em 4 ml de cloreto de amônio estéril para a lise das hemácias, sendo centrifugado novamente em seguida. Este procedimento foi repetido mais uma vez para a lise completa das hemácias. Após esta etapa as células foram ressuspensas em 5 ml de meio RPMI completo (10% SFB) estéril e cultivada em placas de 6 *wells* em estufa para cultura de células a 37°C e 5% CO₂ por duas horas. Esta etapa serve para que os monócitos fiquem aderidos às placas e apenas os linfócitos fiquem em suspensão.

Depois da incubação, o sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubos falcon de 15 ml e contado (1:20 em azul de tripan), sendo ajustado para alíquota de 1 ml com 1×10^7 células e incubado no escuro com 1 µl de solução de CFSE (solução mãe 5mM em DMSO). Após 20 minutos, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 5 ml de meio RPMI completo (10% SFB) estéril e contadas novamente (1:10 em azul de tripan). Ajustou-se o número de células para 2×10^6 células/ml e colocou-se 100 µl desta suspensão em placas de 96 *wells* de fundo em U, da seguinte maneira: 3 poços sem estímulo, 3 poços com 10 µL/poço de ConA para proliferação dos linfócitos T e 3 poços com 10 µl/poço de LPS (0,3 mg/ml) para proliferação dos linfócitos B. Depois de plaqueadas todas as amostras, as placas foram mantidas em estufa para cultura de células à 37° C e 5% CO₂ por quatro dias. Após este período, cada amostra em triplicata foi reunida em um mesmo tubo, centrifugada a 1200 rpm/8 minutos e ressuspensas em 200 µl de PBS para avaliação por citometria de fluxo.

O calculo da intensidade de proliferação dos linfócitos foi calculado da seguinte forma: a intensidade de fluorescência de CFSE é inversamente proporcional a proliferação celular; assim, a proliferação foi determinada por um índice de proliferação calculado pela divisão da intensidade de fluorescência de CFSE dos linfócitos não estimulados pela intensidade de fluorescência de CFSE dos linfócitos estimulados com os respectivos mitógenos.

4.7 Hemograma Completo

O hemograma foi constituído pelo eritrograma e pelo leucograma. Após decapitação dos animais, foi coletado sangue, transferido para um frasco com etilenodiamino-tetracético-dissódico (EDTA) a 10% e homogeneizado adequadamente. O hemograma foi realizado com o auxílio de um contador hematológico e de acordo com Birgel (1982). A contagem diferencial de leucócitos foi determinada por meio da contagem global destas células em extensão sanguínea coradas por May-Grunwald modificado por Rosenfeld.

4.8 Histopatológico

Após a eutanásia dos animais, foram coletadas amostras de baço, fígado, rim, cadeia de linfonodos mesentéricos, esterno, timo e adrenais; estas foram armazenadas em recipiente com formol à 10%. Após três dias, essas amostras foram cortadas e colocados em cassetes para histopatologia; o esterno foi colocado em recipiente com ácido fórmico, por aproximadamente 10 dias para descalcificação.

As amostras de tecidos foram incluídas na parafina, aparadas para corte histológico e depois coradas, em Hematoxilina e eosina.

4.9 Análise Estatística

Para análise dos dados foi utilizado o programa estatístico GraphPad InStat 3.01® e o programa GraphPad Prisma 5®. Para se verificar a homocedasticidade dos dados utilizou-se o teste de Bartlett. Para os dados paramétricos, foi utilizada a análise de variância ANOVA de duas vias seguida do pós teste de Bonferroni (para análise de um parâmetro em vários grupos) ou o Teste “t” não pareado (para análise de apenas dois grupos). Para dados não paramétricos, utilizou-se o Teste de Kruskal Wallis seguido do pós teste de Dunn’s. Foram considerados significativas as análises que apresentaram nível de significância $p < 0,05$.

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi composto por duas fases: (a) administração sistêmica de dexametasona e (b) grupos com veículo e glicocorticóides tópicos, ilustrados na figura 2.

Na primeira fase, os animais foram pesados; em seguida, foi injetado solução salina (IP, 0,15 ml) ou dexametazona (Aziun®; dose de 1 mg/Kg – 0,15 ml, IP) nos ratos (10 animais para cada grupo), duas vezes ao dia, durante 6 dias. Esse procedimento foi empregado como forma de se obter um controle positivo dos efeitos da administração sistêmica de um corticosteroide. No sétimo dia, os animais foram levados para o laboratório, onde seria realizado a leitura do edema, tratados e em seguida, mediu-se o volume da pata inicial no plestimógrafo (tempo 0); em seguida, aplicou-se a carragenina, recém preparada (0,1 ml), no subcutâneo plantar do membro posterior esquerdo de cada animal. Após uma hora, duas horas, três horas, quatro horas, seis horas e oito horas, foram feitas leituras no plestimógrafo. Após o término da leitura, os animais foram tratados normalmente. Os animais pernoveram neste mesmo laboratório. No dia seguinte, os animais foram tratados, pesados e levados à outro laboratório, onde foram feitos os outros procedimentos.

Os animais foram decapitados e em seguida, coletado sangue para hemograma completo, sorologia e citometria. Foram retiradas amostras de timo, fígado, rim, linfonodos mesentéricos, adrenais, baço e esterno. Amostra do baço foi separada também para a proliferação. As amostras de tecido foram acondicionadas em recipientes com formol.

Na segunda fase, outros animais foram separados em quatro grupos (com 10 animais cada, aproximadamente) para quatro tratamentos diferentes (veículo, hidrocortisona, betametasona e triancinolona) e este experimento foi realizado em durante 7, 14 e 21 dias.

Os animais foram pesados; em seguida tratados, topicamente no pavilhão aurícula com um veículo (à base de vaselina – 0,1 ml em cada conduto auditivo), hidrocortisona (10 mg/20 ml – dose de 0,1 ml em cada conduto auditivo), betametasona (122 mg/20 ml – 0,1 ml em cada conduto auditivo) ou triancinolona (1 mg/20 ml – 0,1 ml em cada conduto auditivo), duas vezes ao dia (cada 12 horas, aproximadamente), durante 7, 14 ou 21 dias. No último dia do tratamento, animais foram levados para o laboratório, onde seria realizado a leitura do volume do edema, tratados conforme um dos protocolos descritos acima e em seguida, mediu-se o volume da pata no plestimógrafo (tempo 0); em seguida, aplicou-se a carragenina, recém

preparada (0,1 ml), no subcutâneo plantar do membro posterior esquerdo de cada animal. Após uma hora, duas horas, três horas, quatro horas, seis horas e oito horas, foram feitas outras leituras no plestimógrafo. Após o término da leitura, os animais foram tratados normalmente. Os animais pernoveram neste mesmo laboratório. No dia seguinte, os animais foram tratados, pesados e levados à outro laboratório, onde foram feitos os outros procedimentos, descritos anteriormente.

Figura 2: Delineamento experimental. **a.** grupo da dexametasona; **b.** grupos dos glicocorticóides tópicos

6. RESULTADOS

6.1 Avaliação do Edema de Pata

6.1.1 Edema de Pata no Grupo da Dexametasona

Na análise do edema de pata, após tratamento com solução salina ou dexametasona injetável por um período de 7 dias, pôde-se verificar que ocorreram diferenças significantes tanto em relação ao fármaco utilizado quanto em relação ao tempo de evolução do edema ($p < 0,0001$; $F_{1,108} = 657.2$ e $F_{5,108} = 6.576$, respectivamente, ANOVA de duas vias). Foram observadas diferenças significantes também em todos os tempos durante a medição do edema ($p < 0,001$, pós teste de Bonferroni), mostrados na figura 3.

Figura 3: Avaliação do edema de pata, induzido pela administração subcutânea no coxim plantar do membro posterior esquerdo de carragenina em ratos; grupo controle de imunossupressão. * $p < 0,001$ (pós teste de Bonferroni)

6.1.2 Edema de Pata nos Grupos Tratados com Veículo, Hidrocortisona, Betametasona e Triancinolona durante 7 dias

Na análise do edema de pata após tratamento de 7 dias com os diferentes glicocorticóides e veículo, pôde-se verificar diferença significativa, tanto em relação ao tempo quanto em relação a evolução do edema ($p < 0,0001$; $F_{3,210} = 28,81$ e $F_{5,210} = 11,38$, ANOVA de duas vias). Nos tratamentos tópicos, foram observadas diferenças significantes, pelo pós teste de Bonferroni, da betametasona em relação ao veículo, nos tempos 1, 3 e 4 ($p < 0,01$); nos tempos 2 e 6 ($p < 0,05$) e no tempo 8 ($p < 0,001$); da triancinolona em relação ao veículo, nos tempos 1 e 4 ($p < 0,05$); nos tempos 2 e 8 ($p < 0,01$) e no tempo 3 ($p < 0,001$), como mostrados na figura 4.

Figura 4: Avaliação do edema de pata, induzido pela administração subcutânea no coxim plantar do membro posterior esquerdo de carragenina em ratos, tratamento tópico de 7 dias. $p < 0,0001$ (ANOVA de duas vias). * $p < 0,01$, BxV (1, 3 e 4 hs) e TxV(1 e 4 hs) ** $p < 0,05$, BxV (2 e 6 hs) e TxV (2 e 8 hs) *** $p < 0,001$, BxV (8 hs) TxV(3 hs) (Bonferroni pós teste)

6.1.3 Edema de Pata nos Grupos Tratados com Veículo, Hidrocortisona, Betametasona e Triancinolona durante 14 dias

Na análise do edema de pata após tratamento de 14 dias com os diferentes glicocorticóides e veículo, pôde-se verificar diferença significativa, tanto em relação aos tratamentos com os fármacos quanto ao tempo de evolução do edema ($p < 0,0003$; $F_{3,192} = 6.624$ e $p < 0,0001$; $F_{5,192} = 13,21$ respectivamente, ANOVA de duas vias), ilustrados na figura 5.

Figura 5: Avaliação do edema de pata, induzido pela administração subcutânea no coxim plantar do membro posterior esquerdo de carragenina em ratos, tratamento de 14 dias

6.1.4 Edema de Pata nos Grupos Tratados com Veículo, Hidrocortisona, Betametasona e Triancinolona durante 21 dias

Na análise do edema de pata após tratamento de 21 dias com os diferentes glicocorticóides e veículo, pôde-se verificar diferença significativa, tanto em relação aos tratamentos com os fármacos quanto ao tempo de evolução do edema ($p = 0,0491$; $F_{3,216} = 9.184$ e $p < 0,0001$; $F_{5,216} = 2.266$, respectivamente, ANOVA de duas vias). Nos tratamentos tópicos, foram observadas diferenças significantes pelo pós teste de Bonferroni, do veículo em relação à hidrocortisona, no tempo 3 ($p < 0,05$) e do veículo em relação à triancinolona, no tempo 6 ($p < 0,05$), mostrados na figura 6.

Figura 6: Avaliação do edema de pata, induzido pela administração subcutânea no coxim plantar do membro posterior esquerdo de carragenina em ratos, tratamento de 21 dias. ** $p < 0,05$, HxV e TxV

6.2 Avaliação da Variação do Peso dos Animais

6.2.1 Variação do peso dos Animais do Grupo da Dexametasona

Na análise da variação de peso dos animais, observou-se uma grande queda de pesos dos animais tratados com a dexametasona injetável, em um período de 7 dias de tratamento em relação ao grupo controle, tratados com a solução salina injetável ($p < 0,0001$; $t = 10.508$, teste “t” não pareado), ilustrados na figura 7.

Figura 7: Avaliação dos pesos dos animais do grupo controle no início e ao término dos tratamentos. * $p < 0,0001$ (teste “t” não pareado)

6.2.2 Variação do Peso dos Animais dos Grupos dos Tratamentos Tópicos com Veículo, Hidrocortisona, Betametasona e Triancinolona durante 7, 14 e 21

Na análise da variação de peso dos animais, observamos que tanto o fármaco empregado para os tratamentos quanto o seu tempo de utilização influenciaram esse parâmetro ($p < 0,0001$, $F_{3,103} = 24.79$ e $F_{2,103} = 45.79$ respectivamente, ANOVA de duas vias). Nos tratamentos tópicos, foram observadas diferenças significantes, no pós teste de Bonferroni, da hidrocortisona veículo em relação ao veículo, no tempo 7 ($p < 0,05$); da betametasona em relação ao veículo, no tempo 7 ($p < 0,05$), nos tempos 14 e 21 ($p < 0,001$); e da triancinolona em relação ao veículo, nos tempos 7 e 21 ($p < 0,01$) e no tempo 14 ($p < 0,05$), ilustrados na figura 8.

Figura 8: Avaliação dos pesos dos animais dos grupos tratados com veículo, hidrocortisona, betametasona e triancinolona durante 7, 14 e 21 dias. * $p < 0,05$ BxV, TxV; ** $p < 0,001$, BxV; *** $p < 0,01$, TxV

6.3 Avaliação do Peso Relativo de Baço

6.3.1 Peso relativo do baço dos Animais do Grupo da Dexametasona

Na análise do peso relativo do baço, observou-se uma diminuição significativa nos animais tratados com a dexametasona injetável em relação ao grupo controle, tratados com solução salina injetável ($p < 0,0001$; $t = 20.901$, teste “t” não pareado), ilustrados na figura 9.

Figura 9: Avaliação do peso relativo do baço dos animais do grupo controle positivo.

* $p < 0,0001$

6.3.2 Peso relativo do Baço dos Animais dos grupos dos Tratamentos Tópicos com Veículo, Hidrocortisona, Betametasona e Triancinolona durante 7, 14 e 21

Na análise do peso relativo do baço nos animais tratados com diferentes glicocorticóides e veículo observou-se, pelo Teste de Kruskal-Wallis, que obtiveram diferença significativa em todos os tempos dos tratamentos, 7, 14 e 21 dias ($p = 0,0049$ e $KW = 12.898$; $p = 0,0289$ e $KW = 9.030$; $p = 0,0003$ e $KW = 18.997$, respectivamente); pelo pós teste de Dunn's foi observado que, a betametasona causou uma diminuição significativa no tratamento de 7 dias, em relação ao veículo ($p < 0,01$) e a triancinolona em relação ao veículo também ($p < 0,05$); no tratamento de 21 dias, observou diferença da betametasona em relação ao veículo ($p < 0,01$), ilustrados na figura 10.

Figura 10: Avaliação do peso relativo do baço nos grupos dos animais tratados tópicamente com veículo, hidrocortisona, betametasona e triancinolona durante 7, 14 e 21 dias.
* $p < 0,01$, BxV; ** $p < 0,05$, TxV

6.4 Avaliação do Peso Relativo das Adrenais

6.4.1 Peso Relativo das Adrenais nos Animais do Grupo de Dexametasona

Na análise do peso relativo das adrenais, observou-se que uma diminuição significativa nos animais tratados com a dexametasona injetável em relação ao grupo controle, tratados com solução salina injetável ($p < 0,0001$; $t = 8.674$, Teste “t” não pareado), ilustrados na figura 11.

Figura 11: Peso relativo das adrenais nos grupos dos animais do controle positivo. * $p < 0,0001$

6.4.2 Peso Relativo das Adrenais nos Animais dos Grupos dos Tratamentos Tópicos com Veículo, Hidrocortisona, Betametasona e Triancinolona durante 7, 14 e 21 dias

Na análise do peso relativo das adrenais nos animais tratados com diferentes glicocorticóides e veículo observou-se, pelo Teste de Kruskal-Wallis, obtiveram diferença significativa em todos os tempos dos tratamentos, 7, 14 e 21 dias ($p= 0,0050$ e $KW= 12.835$; $p= 0,0092$ e $KW= 11.522$ e $p<0,0001$ e $KW= 25.854$, respectivamente). Pelo pós teste de Dunn's, foi observado que, no tratamento de 7 dias, a betametasona em relação ao veículo houve uma diferença significativa ($p<0,05$); no tratamento de 14 dias, a betametasona em relação ao veículo, observou-se uma diferença significativa ($p<0,05$) e no tratamento de 21 dias, a betametasona causou diferença significativa em relação ao veículo ($p< 0,001$), ilustradas na figura 12.

Figura 12: Peso relativo das adrenais dos animais do grupo de tratamento tópico. * $p<0,05$, BxV e ** $p<0,001$, BxV

6.5 Avaliação do Hemograma Completo

6.5.1 Hemograma dos Animais do Grupo da Dexametasona

Na análise do hemograma do grupo controle, pelo Teste “t” não pareado, observou-se um aumento do número dos eritrócitos ($p = 0,0111$; $t = 0,5746$) nos animais tratados com a dexametasona e uma diminuição no hematócrito ($p = 0,0082$ e $t = 3,013$); no número de plaquetas foi observado também uma diminuição significativa ($p < 0,0001$ e $t = 6,707$), ilustrados na tabela 2.

Tabela 2: Hemograma dos animais do grupo da dexametasona

	Salina (controle)	Dexametasona
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	$9,56 \pm 2,79$	$13,06 \pm 16,93$
Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	$6,58 \pm 0,44$	$7,79 \pm 1,12^*$
Hemoglobina (g/dl)	$14,27 \pm 0,60$	$16,08 \pm 2,37$
Hematócrito (%)	$34,47 \pm 1,63$	$40,92 \pm 5,83^{**}$
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	$484,87 \pm 67,65$	$307,2 \pm 44,55^{***}$

Média $\pm$ desvio padrão. N = 10 animais/grupo. * $p = 0,0111$, ** $p = 0,0082$ e *** $p < 0,0001$

6.5.2 Contagem Diferencial de Células dos Animais do Grupo da Dexametasona

Observou-se que, nos animais tratados com a dexametasona, pelo Teste “t” não pareado, ocorreu um aumento do números de eosinófilos e de neutrófilos ($p = 0,0047$ e $t = 3.290$ e $p < 0,0001$ e $t = 12.67$, respectivamente); uma diminuição no número de linfócitos e monócitos ($p < 0,0001$ e $t = 12.05$ e $t = 12.67$, respectivamente), ilustrados na tabela 3,

Tabela 3: Contagem diferencial de células dos animais do grupo da dexametasona

	Salina	Dexametasona
Eosinófilos (%)	1 ± 0	$2,4 \pm 1,26^*$
Neutrófilos (%)	$51,62 \pm 6,73$	$82,5 \pm 3,40^{**}$
Linfócitos (%)	$42,62 \pm 6,63$	$13 \pm 3,68^{**}$
Monócitos (%)	$3,5 \pm 0,92$	$1,4 \pm 0,69^{**}$
Bastonetes (%)	$1,25 \pm 0,70$	$0,7 \pm 0,82$

Média $\pm$ desvio padrão. N= 10 animais/grupo * $p = 0,0047$ e ** $p < 0,0001$

6.5.3 Hemograma dos Animais Tratados com Glicocorticóides Tópicos durante 7, 14 e 21 dias

Na análise do hemograma dos animais tratados com diferentes glicocorticóides tópicos, observou-se que, em relação ao número de leucócitos, o tempo de tratamento foi de grande relevância para os resultados ($p < 0,0001$; $F_{2,103} = 16.79$, ANOVA de duas vias); nos animais tratados com triancinolona, houve uma grande queda de leucócitos, em relação ao controle ($p < 0,05$; pós teste de Bonferroni), mas somente no tratamento de 7 dias, ilustrados na tabela 4.

Nos eritrócitos e a hemoglobina, não foram observadas diferença significativas; em relação ao hematócrito, observou-se apenas que o tempo de tratamento teve influência sobre os resultados, com $p < 0,0001$; $F_{2,103} = 20.33$ (ANOVA de duas vias); as plaquetas também mostraram que sofreram influência pelo tempo de tratamento, com $p < 0,0001$; $F_{2,103} = 13.22$ (ANOVA de duas vias), ilustrados na tabela 4.

Tabela 4: Hemograma dos animais tratados com glicocorticóides durante 7, 14 e 21 dias

	Tempo de tratamento	Veículo	Hidrocortisona	Betametasona	Triancinolona
LEUCÓCITOS ($10^3/\text{mm}^3$)	7	$7,68 \pm 2,07$	$7,45 \pm 2,78$	$6,38 \pm 3,31$	$4,8 \pm 1,13^*$
	14	$5,84 \pm 3,31$	$5,91 \pm 2,96$	$5,03 \pm 2,97$	$4,7 \pm 2,44$
	21	$3,57 \pm 1,00$	$3,7 \pm 1,81$	$3,47 \pm 1,03$	$3,51 \pm 0,48$
ERITRÓCITOS ($10^6/\text{mm}^3$)	7	$7,60 \pm 0,75$	$7,92 \pm 0,73$	$7,87 \pm 0,50$	$7,47 \pm 0,67$
	14	$7,90 \pm 0,77$	$8,15 \pm 0,66$	$8,14 \pm 0,67$	$8,23 \pm 0,72$
	21	$7,34 \pm 1,67$	$7,04 \pm 2,60$	$8,15 \pm 0,85$	$8,14 \pm 0,44$
HEMOGLOBINA (g/dl)	7	$14,15 \pm 1,56$	$14,67 \pm 1,53$	$14,61 \pm 0,82$	$13,85 \pm 1,21$
	14	$13,94 \pm 1,57$	$14,24 \pm 1,38$	$13,91 \pm 1,47$	$14,1 \pm 1,66$
	21	$13,01 \pm 2,89$	$12,31 \pm 4,38$	$14,24 \pm 1,27$	$13,88 \pm 0,54$
HEMATÓCRITO (%)	7	$45,15 \pm 5,79$	$46,73 \pm 4,69$	$47,29 \pm 1,65$	$44,94 \pm 2,60$
	14	$40,82 \pm 5,94$	$41,92 \pm 5,81$	$41,96 \pm 6,32$	$42,76 \pm 7,40$
	21	$35,71 \pm 8,15$	$34,1 \pm 12,71$	$39,16 \pm 3,92$	$38,48 \pm 1,77$
PLAQUETAS ($10^3/\text{mm}^3$)	7	$630,12 \pm 129$	$652,2 \pm 81,58$	$691,5 \pm 75,21$	$582 \pm 74,87$
	14	$514,33 \pm 92,11$	$550 \pm 104,67$	$515,66 \pm 110,56$	$514,55 \pm 120,07$
	21	$595,5 \pm 85,78$	$581,9 \pm 167,77$	$595,6 \pm 57,65$	$629 \pm 39,92$

Média $\pm$ desvio padrão. N=10 animais/grupo * $p < 0,05$, TxV

6.5.4 Contagem Diferencial de Células dos Animais Tratados com Glicocorticóides Tópicos durante 7, 14 e 21 dias

Na contagem de células, dos grupos tratados com os glicocorticóides, observou-se que os eosinófilos e os neutrófilos não tiveram nenhuma alteração significativa; para a contagem de linfócitos, o tempo do tratamento foi significativo, com $p < 0,0001$; $F_{2,103} = 45,77$ (ANOVA de duas vias) porém, sem grandes alterações na quantidade de células; os monócitos também obtiveram resultados significativos em relação ao tempo dos tratamentos, com $p < 0,0001$; $F_{2,103} = 40,72$ (ANOVA de duas vias) e os animais do grupo da betametasona obtiveram uma queda significativa, em relação ao veículo, com $p < 0,05$ (ANOVA de duas vias), no tratamento de 7 dias, ilustrados na tabela 5.

Tabela 5: Contagem diferencial de células dos animais tratados com corticóides em 7, 14 e 21 dias

	Tempo de				
	tratamento	Veículo	Hidrocortisona	Betametasona	Triancinolona
Eosinófilos (%)	7	1,77 ± 0,97	1,4 ± 0,84	1,55 ± 1,13	1,4 ± 0,84
	14	1 ± 0	1,25 ± 0,5	1,5 ± 0,57	1 ± 0
	21	1,4 ± 0,51	1,4 ± 0,51	1,1 ± 0,31	1,3 ± 0,48
Neutrófilos (%)	7	45,77 ± 10,84	47 ± 14,30	40,4 ± 19,23*	56,1 ± 21,32
	14	28 ± 13,07	19,5 ± 4,93	26,5 ± 4,79	29,5 ± 10,27
	21	21,8 ± 5,34	22,6 ± 2,71	22,3 ± 5,47	21,4 ± 2,59
Linfócitos (%)	7	49,44 ± 6,67	50,8 ± 13,23	50,3 ± 20,00	41,2 ± 18,64
	14	65,33 ± 13,31	74 ± 5,77	67,25 ± 7,45	64,25 ± 10,40
	21	70,2 ± 7,28	70,5 ± 4,19	71,4 ± 7,44	70,9 ± 6,82
Monócitos (%)	7	2,77 ± 0,97	2,1 ± 0,87	1,77 ± 1,09	1,9 ± 1,19
	14	3,66 ± 0,57	3,75 ± 0,95	3,5 ± 0,57	3,75 ± 0,5
	21	3,8 ± 0,78	3,2 ± 0,78	3,9 ± 0,87	3,5 ± 0,52
Bastonetes (%)	7	0,88 ± 0,60	0,6 ± 0,84	1,11 ± 1,05	0,9 ± 0,99
	14	1 ± 0	1,25 ± 0,5	1,5 ± 0,57	1 ± 0
	21	0,5 ± 1,08	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Média ± desvio padrão. N=10 animais/grupo * p<0,01, BxV

6.6 Dosagem de Corticosterona

6.6.1 Dosagem de Corticosterona nos Animais dos Grupos dos Tratamentos Tópicos com veículo, Hidrocortisona, Betametasona e Triancinolona durante 7, 14 e 21 dias

Na análise da dosagem de corticosterona dos animais tratados com diferentes glicocorticóides, observou-se uma diferença significativa na quantidade de corticosterona encontrada, no tratamento de 7 dias ($p = 0,0002$; $F_{3,60} = 7.904$, ANOVA de duas vias); neste mesmo tempo de tratamento, com o pós teste de Bonferroni, observamos algumas diferenças significantes também: da hidrocortisona em relação ao veículo ($p < 0,05$); da betametasona em relação ao veículo ($p < 0,05$) e também no tempo 21 ($p < 0,01$); da triancinolona em relação ao veículo ($p < 0,01$), ilustrados na figura 13.

Figura 13 : Dosagem da corticosterona dos diferentes glicocorticóides tópicos. * $p < 0,05$, HxV, BxV e ** $p < 0,01$, BxV e TxV

6.7 Avaliação da Atividade dos Neutrófilos Sanguíneos por Citometria de Fluxo

6.7.1 Avaliação da Atividade dos Neutrófilos nos Animais do Grupo da Dexametasona

Na análise da atividade de neutrófilos sanguíneos nos animais tratados com solução salina ou dexametasona injetável, não foram observadas diferenças significativas, pelo Teste “t” não pareado, na intensidade de fagocitose ($p = 0,4865$; $t = 0,7106$), na porcentagem de fagocitose ($p = 0,4417$ e $t = 0,7867$), no *burst* basal, no *burst* induzido ou induzido PMA ($p = 0,8532$ e $t = 0,1877$; $p = 0,4664$ e $t = 0,7441$; $p = 0,5112$ e $t = 0,6702$, respectivamente), ilustrados na tabela 6.

Tabela 6: Avaliação da atividade dos neutrófilos sanguíneos por citometria de fluxo nos animais do grupo da dexametasona

	Salina	Dexametasona
Intensidade fagocitose	$28,58 \pm 2,95$	$27,53 \pm 3,58$
% fagocitose	$83,36 \pm 4,85$	$80,82 \pm 8,98$
Burst basal	$34,22 \pm 9,77$	$33,34 \pm 11,01$
Burst induzido	$60,47 \pm 11,97$	$56,07 \pm 14,39$
Burst induzido PMA	$162,83 \pm 32,59$	$150,76 \pm 46,66$

Média $\pm$ desvio padrão. N = 10 animais/ grupo.

6.7.2 Avaliação da Atividade dos Neutrófilos nos Animais Tratados com Glicocorticóides Tópicos durante 7, 14 e 21 dias

Na análise da intensidade de fagocitose dos neutrófilos sanguíneos, o fármaco utilizado e o tempo de tratamento tiveram diferenças significantes ($p < 0,0001$, $F_{6,103} = 135.8$ e $F_{3,103} = 11.77$, respectivamente, ANOVA de duas vias). Nos tratamentos tópicos durante 7 dias, foram observadas diferenças significativas, pelo pós teste de Bonferroni, da betametasona e da triancinolona em relação ao veículo ($p < 0,001$), demonstrados na tabela 7 e ilustrados na figura 14. Na porcentagem de fagocitose dos neutrófilos, os fármacos e o tempo também tiveram diferenças significantes ($p < 0,0001$, $F_{3,103} = 10.40$ e $F_{2,103} = 164.6$, respectivamente, ANOVA de duas vias). Nos tratamentos tópicos, foram observadas diferenças significativas, pelo pós teste de Bonferroni, a betametasona em relação ao veículo, no tempo 21 ($p < 0,05$).

Em relação ao *burst* basal e *burst* induzido PMA, foram observados que o tempo do tratamento foi significativo ($p < 0,0001$; $F_{2,103} = 22.08$ e $F_{2,103} = 18.87$, respectivamente, ANOVA de duas vias). No *burst* induzido, foram observadas diferenças significativas, pelo pós teste de Bonferroni, da betametasona em relação ao veículo ($p < 0,05$) no tempo 7.

Tabela 7: Avaliação da atividade dos neutrófilos sanguíneos por citometria de fluxo nos animais tratados com diferentes glicocorticóides tópicos

		Veículo	Hidrocortisona	Betametasona	Triancinolona
Intensidade fagocitose	7	31,51 ± 3,98	30,29 ± 4,06	24,79 ± 3,53**	21,0 ± 1,21*
	14	17,81 ± 4,22	19,51 ± 3,63	16,25 ± 3,40	18,43 ± 3,66
	21	15,79 ± 3,48	16,21 ± 2,13	13,87 ± 1,81	15,40 ± 2,07
% fagocitose	7	87,34 ± 5,79	89,5 ± 2,28	80,62 ± 7,59	75,71 ± 6,88
	14	72,84 ± 8,33	77,19 ± 6,05	64,88 ± 8,46	70,37 ± 15,5
	21	44,89 ± 14,48	52,15 ± 14,55	32,30 ± 5,53**	48,50 ± 9,36
Burst basal	7	35,66 ± 10,25	36,75 ± 4,75	21,24 ± 10,72**	29,18 ± 5,35
	14	38,22 ± 8,34	45,55 ± 18,53	37,59 ± 11,29	48,53 ± 16,35
	21	61,10 ± 45,25	54,65 ± 12,09	62,69 ± 19,96	55,63 ± 17,10
Burst induzido	7	128,90 ± 72,60	95,78 ± 13,45	66,78 ± 20,53	67,33 ± 16,68
	14	98,14 ± 37,82	133,43 ± 84,27	107,09 ± 33,89**	121,67 ± 33,97
	21	98,63 ± 63,92	111,60 ± 66,21	86,72 ± 46,86	96,03 ± 48,56
Burst induzido PMA	7	65,90 ± 12,48	84,50 ± 24,70	90,18 ± 26,13	123,03 ± 34,80
	14	236,47 ± 173,34	211,8 ± 126,74	227,41 ± 156,99	212,35 ± 151,24
	21	408,11 ± 308,93	408,32 ± 341,97	342,78 ± 318,33	405,63 ± 354,94

Média ± desvio padrão. N= 10 animais/grupo * p<0,001, TxV ** p<0,05, BxV

Figura 14: Avaliação da atividade dos neutrófilos. **a.** Intensidade de fagocitose: * $p < 0,001$, BxV e TxV; **b.** Porcentagem de fagocitose: * $p < 0,05$, BxV; **c.** *Burst* induzido: * $p < 0,05$ (pós teste de Bonferroni)

6.8: Avaliação do Índice de Proliferação de Linfócitos B e T

6.8.1 Índice de Proliferação de Linfócitos B e T nos Animais do Grupo da Dexametasona

A tabela 8 mostra que, na análise do índice de proliferação de linfócitos T com ConA, nos animais tratados com salina e dexametasona injetável, o teste estatístico (Teste “t” não pareado) mostrou que não houve diferença significativa ($p = 0,8945$ e $t = 0,1369$); na proliferação de linfócitos B com PBS, também não foi observada diferença significativa ($p = 0,3845$ e $t = 0,9199$).

Tabela 8: Índice de proliferação de linfócitos T e B do grupo da dexametasona

	Salina	Dexametasona
ConA	$1,02 \pm 0,02$	$1,01 \pm 0,07$
PBS	$1,14 \pm 0,05$	$1,07 \pm 0,16$

Média $\pm$ Desvio padrão. N = 10 animais/ grupo

6.8.2 Índice de Proliferação de Linfócitos B e T nos Animais Tratados com Glicocorticóides Tópicos durante 7, 14 e 21 dias

A tabela 9 mostra que, na análise do índice de proliferação de linfócitos T com o ConA, no tratamento de 7 dias, Teste de Kruskal-Wallis, não foram observadas diferenças significativas ($p = 0,5430$ e $KW = 2.144$); em relação à proliferação de linfócitos B com o LPS, também não foram observadas diferenças significantes ($p = 0,4770$; $KW = 2.491$).

No tratamento de 14 dias, a proliferação de linfócitos T com ConA e linfócitos B com LPS, não apresentaram diferenças significantes ($p = 0,2776$, $KW = 3.855$ e $p = 0,3761$ e $KW = 3.102$, respectivamente).

No tratamento de 21 dias, na proliferação de linfócitos T com o ConA, houve diferença significativa ($p = 0,0044$; $KW = 13.13$), principalmente entre os grupos; na proliferação de linfócitos B com LPS, houve diferença significativa ($p = 0,0091$ e $KW = 11.55$), principalmente entre os grupos; a betametasona teve seu índice de proliferação diminuído em relação ao veículo ($p < 0,05$), ilustrados na figura 15.

Tabela 9: Índice de proliferação de linfócitos T e B dos grupos tratados com diferentes glicocorticóides tópicos

	Tempo	Veículo	Hidrocortisona	Betametasona	Triancinolona
ConA	7	1,03 ± 0,07	1,04 ± 0,04	0,99 ± 0,02	0,99 ± 0,09
	14	0,96 ± 0,09	0,98 ± 0,05	0,99 ± 0,17	0,91 ± 0,07
	21	1,25 ± 0,03	1,05 ± 1,12	1,11 ± 0,12	1,37 ± 0,13
LPS	7	1,11 ± 0,00	1,11 ± 0,00	1,09 ± 0,44	1,15 ± 0,21
	14	1,11 ± 0,11	1,18 ± 0,10	1,33 ± 0,44	1,15 ± 0,21
	21	1,21 ± 0,06	1,21 ± 0,05	1,10 ± 0,03*	1,16 ± 0,02

Média ± desvio padrão. N= 10 animais/grupo * p<0,05, BxV

Figura 15: Proliferação de linfócitos T e B dos grupos dos tratamentos tópicos, 21 dias. **a.** ConA; * p<0,05. **b.** LPS; ** p<0,05. V = veículo, H = hidrocortisona, B = betametasona e T = triancinolona

6.9 Análise Histopatológica

6.9.1 Grupo da Dexametasona

Nas amostras de tecidos dos animais tratados com solução salina injetável, nenhuma alteração foi observada: todos os tecidos mantiveram-se com seus padrões de estrutura e distribuição de células normais, ilustrados nas figuras 16, 17 e 18.

Nas amostras de tecidos dos animais tratados com dexametasona injetável, observou-se no fígado, marcada degeneração vacuolar macrofotográfica; no baço, rarefação de polpa branca e no esterno, desorganização arquitetônica da medula óssea e hipocelularidade, ilustrados na figura 16, 17 e 18.

Figura 16 - Fígado. **a.** Veículo. **b.** Dexametasona. Aumento 10x

Figura 17 - Baço. **a.** Salina. **b.** Dexametasona. Aumento 10x

Figura 18 - Esterno. **a.** Salina. **b.** Dexametasona. Aumento 4x

6.9.2 Grupos Tratados com Glicocorticóides Tópicos

Nas amostras de tecidos dos animais tratados com o veículo, durante 7, 14 e 21 dias, não foram observadas alterações histológicas tão marcantes quanto aquelas causadas pela administração sistêmica de dexametasona.

Nas amostras de tecidos dos animais tratados com a hidrocortisona, durante 7 e 21 dias, não foram observadas alterações histológicas significantes; nos animais tratados durante 14 dias, observou-se que nas adrenais apresentavam-se macroscopicamente reduzidas. A pouca padronização do plano de corte do tecido não permitiu análise morfométrica precisa.

Nas amostras de tecidos dos animais tratados com a betametasona, durante 7 dias, não foram observadas alterações; nos animais tratados durante 14 e 21 dias, em todas as lâminas, foram observadas uma vacuolização multifocal no fígado (sem preferência de zona) e atrofia moderada das adrenais, ilustrados nas figuras 19, 20, 21 e 22.

Nas amostras de tecidos dos animais tratados com triancinolona, durante 7 dias, a maioria das amostras de fígado apresentou degeneração vacuolar difusa, de moderada a severa e atrofia de polpa branca no baço; nos animais tratados durante 14 e 21 dias, foi encontrado uma vacuolização microgoticular no fígado, mais discreta e focal; apenas no esterno dos animais tratados durante 21 observou-se que, metade da amostra apresentava hipocelularidade, ilustrados nas figuras 23, 24, 25 e 26.

Figura 19 - Adrenal. **a.**Veículo. **b.** Betametasona tratamento de 14 dias. Aumento 4x

Figura 20 - Adrenal. Betametasona tratamento de 21 dias. Aumento 4x

Figura 21 - Fígado. **a.**Veículo. **b.** Betametasona tratamento de 14 dias. Aumento 4x

Figura 22 - Fígado. a e b. Betametasona tratamento de 21 dias (aumento 4x e 20x)

Figura 23 - Fígado. **a.** Veículo. **b.** Triancinolona tratamento de 7 dias. Aumento 10x

Figura 24 - Fígado. **a.** Triancinolona tratamento de 14 dias. **b.** Triancinolona tratamento de 21 dias. Aumento 4x

Figura 25 - Baço. **a.** Veículo. **b.** Triancinolona tratamento de 7 dias. Aumento 4x

Figura 26 - Esterno. **a.** Veículo. **b.** Triancinolona tratamento de 21 dias. Aumento 4x

7 DISCUSSÃO

Os glicocorticóides possuem efeitos disseminados, influenciando a função da maioria das células do organismo; as principais conseqüências metabólicas da secreção ou administração de glicocorticóides decorrem das suas ações diretas nas células alvo (FITZGERALD, 2006). Glicocorticóides são normalmente empregados como drogas antiinflamatórias potentes usadas no tratamento de uma variedade de desordens (OLIVRY; SOUSA, 2002; ABRAHAM, DEMERAJ; UNGEMACH, 2006).

A aplicação tópica de antiinflamatório esteróides é muito utilizada na prática médica e veterinária para tratamentos dos distúrbios da pele (AL-KHENAIZAN; ALVAN, 2008). Formulações farmacêuticas para aplicações tópicas são comuns na medicina veterinária por inúmeras razões, incluindo a facilidade de aplicação e por apresentarem caráter de tratamento não-invasivo (OLIVRY; SOUSA, 2001; AHLSTROM et al., 2009); além do baixo custo, glicocorticóides tópicos são ainda atrativos por serem utilizados diretamente no local da inflamação (NUTTALL et al., 2009).

Glicocorticóides tópicos são benéficos na maioria dos casos de otite externa, pois tem efeitos antipruriginosos e diminuem a secreção glandular, além do efeito antiinflamatório (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001; WOEHLÉ et al., 2005). Tal fato explica sua freqüente utilização terapêutica em enfermidades que acometem a orelha de animais de companhia.

O modelo da carragenina para estudo do processo inflamatório agudo foi introduzido por Winter et al., (1962). A carragenina causa uma reação inflamatória facilmente mensurável pelo plestímetro, após a injeção desta no coxim plantar de ratos, causa um edema que aumenta gradativamente até atingir um pico, entre 2-4 após a injeção (GARCIA LEME et al., 1973). Segundo Gallin et al., (1992), a inflamação é caracterizada, em sua forma aguda pelos sinais clássicos de dor, calor, rubor e perda de função; como este processo envolve eventos vasculares, como aumento de permeabilidade vascular e exsudação de fluidos para o meio extra-celular, o edema é considerado um dos pontos cardeais do processo inflamatório agudo (GALLIN et al., 1992).

No presente trabalho inicialmente observamos que, corroborando com a literatura corrente, o volume do edema de pata dos animais tratados com a dexametasona injetável, tratando-se, portanto, de tratamento sistêmico, foi significativamente reduzido nestes animais em relação

ao grupo que recebeu a solução salina. De forma interessante, ratos tratados topicamente com diferentes antiinflamatórios esteroidais também apresentaram redução do edema inflamatório induzido pela carragenina. Animais tratados durante 7 dias com a betametasona e a triancinolona, obtiveram valores menores de edema em relação aos animais tratados com o veículo; e ainda, a triancinolona obteve valores menores ainda em relação à betametasona; no tratamento de 14 e 21 dias. É importante salientar que o tratamento tópico com glicocorticóides foi realizado em região anatômica distante da área recebendo carragenina; assim, um potencial efeito tópico direto do tratamento no edema é descartado. Esses resultados concordam com a literatura de Scott, Miller e Griffin (2001), que descreveram que, a triancinolona e a dexametasona, utilizadas topicamente, são absorvidas e causam efeitos sistêmicos; e que a betametasona aplicada topicamente inibe a formação do edema (AHLUWALIA et al., 1992).

Observações clínicas e experimentais têm demonstrado que os corticosteróides exercem uma marcada atividade antiinflamatória (GARCIA LEME; SCHAPOVAL, 1975). Esses hormônios, por modificar as reações vasculares que ocorrem durante o processo inflamatório interferindo com as respostas vasculares aos mediadores químicos liberados e com a quantidade desta liberada durante este processo reduzem significativamente a permeabilidade vascular e, conseqüentemente, o volume do edema (GARCIA LEME; WITHELM, 1975). Em nosso caso, acreditamos que a redução observada no volume do edema tenha sido uma decorrência direta de níveis circulantes de antiinflamatórios exógenos aplicados topicamente nos ratos.

Lake et al., (2006), explicam detalhadamente os efeitos dos glicocorticóides na inflamação aguda. Os autores apontam que tais moléculas reduzem radicalmente as manifestações da inflamação porque agem na concentração, na distribuição e na função dos leucócitos periféricos; tem efeitos supressores sobre citocinas e outros mediadores lipídicos da inflamação; após a administração de um glicocorticóide de ação curta em dose única, a concentração de neutrófilos circulantes aumenta (maior influxo para o sangue à partir da medula óssea e migração diminuída para o exterior dos vasos sanguíneos), enquanto ocorre redução de linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos na circulação (recrutados, movimentando-se do leito vascular para o tecido linfóide); inibição das funções dos macrófagos teciduais e de outras células apresentadoras de antígenos. Todos esses mecanismos concorrem para o marcante efeito antiinflamatório e imunossupressor (em doses farmacológicas) dos glicocorticóides.

Os glicocorticóides aumentam os níveis séricos de glicose, estimulando a liberação de insulina e inibindo a captação de glicose pelas células musculares; a secreção aumentada de insulina estimula a lipogênese que pode inibir um pouco a lipólise (JERICÓ, 1999; CHROUSOS, 2006); essa pode ser uma explicação para a variação de peso dos animais, observados principalmente nos animais que foram tratados com dexametasona; nos tratamentos tópicos, observamos também uma queda dos pesos nos animais tratados com triancinolona (principalmente em 7 dias) e com a betametasona, nos tratamentos de 14 e 21 dias.

Para avaliarmos os efeitos imunotóxicos dos glicocorticóides em questão, analisamos o peso relativo do baço e sua respectiva histopatologia. Observamos que ocorreu uma diminuição no peso relativo do baço nos animais tratados com a dexametasona; no histopatológico observou-se uma redução de polpa branca neste órgão, mas sem resultados significantes no índice de proliferação de linfócitos. Como o baço é o maior órgão linfóide secundário que contém a maior quantidade de linfócitos B maduros, podemos sugerir que, houve uma certa alteração funcional na resposta imune humoral, mas que só poderia ser afirmada com testes imunológicos específicos.

Já nos animais tratados topicamente, a betametasona e a triancinolona também alterou o peso relativo do baço, principalmente, no tratamento de 7 dias; com 21 dias, os animais tratados com a betametasona ainda apresentaram uma diminuição do peso relativo do baço em relação à triancinolona e à hidrocortisona; no histopatológico, observamos que, apenas nos animais tratados com a triancinolona, durante 7 dias, apresentaram atrofia de polpa branca; em relação à proliferação de linfócitos, não foram observadas diferenças significantes, sugerindo que não houve alteração funcional do órgão com este tratamento.

Uma outra forma de se avaliar as possíveis alterações funcionais no sistema imune é pela análise da capacidade de proliferação dos linfócitos B e T aos mitógenos específicos, sendo esta avaliação um importante teste utilizado para o diagnóstico de diferentes imunodeficiências em humanos (BUCKLEY, 2004). Para a avaliação do linfócito B, pode-se utilizar como mitógeno um antígeno T – independente, como o LPS, lipopolissacarídeo derivado de uma bactéria gram-negativa (COICO; SUNSHINE; BENJAMINI, 2003); e para linfócito T, o ConA.

O índice de proliferação de linfócitos T apresentou-se diminuído nos tratamentos realizados com a betametasona e a hidrocortisona, durante 21 dias, sendo estes alterados em relação ao

grupo controle (veículo) e em relação à triancinolona; a proliferação de linfócitos B também apresentou diminuída nos animais tratados com a betametasona, no mesmo tempo de tratamento, e relação ao veículo e à hidrocortisona. Esses resultados sugerem que, a betametasona seria capaz de alterar a resposta imunológica, num período de tratamento de pelo menos 21 dias; segundo Rougier et al., (2005), alguns tratamentos tópicos para otite podem necessitar até mais tempo, de pelo menos 24 dias, discordando de Jacobson (2002) e Gotthelf (2004), onde afirmam que glicocorticóides tópicos são seguros; se alteram a resposta imunológica, em apenas um tratamento tópico, sugere-se então, que não são tão seguros.

Glicocorticóides administrados sistemicamente são conhecidos por induzir muitos efeitos colaterais; supressão do eixo hipófise-adrenal-hipotálamo tem sido bem documentado como uma das maiores complicações (MIKHAIL; SWEET; MELLINGER, 1973; DALLMAN et al, 1994); esse prejuízo é associado com a diminuição da produção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH); muitos estudos tem demonstrado que repetidas e altas doses nos tratamentos com glicocorticóides de curta ou longa duração tem efeitos adversos da vulnerabilidade da atividade do eixo HPA e da função adrenal, com conseqüente diminuição nos níveis de cortisol plasmático (ABRAHAM; DEMERAJ; UNGEMACH, 2006).

Nossos resultados relacionados à dosagem sérica de corticosterona, observamos que, a triancinolona, a betametasona e a hidrocortisona obtiveram valores diminuídos, em especial, a triancinolona, no tratamento de 7 dias, e a betametasona, no tratamento de 21 dias; sugere-se então, que mesmo com um tratamento tópico agudo ou subagudo, obtivemos uma certa alteração no eixo HHA e conseqüente diminuição de corticosterona plasmática, concordando com Buckingham e Hodges (1976), que observaram um determinado grau de depressão do eixo HPA somente com a betametasona administrada sistemicamente nos ratos em 24 horas e severa depressão do eixo com 30 dias de tratamento. Os valores que obtivemos em nossos experimentos concordam com Ghubash, Marsella e Kunkle (2004), relatam que os animais tratados com a betametasona tópica, durante 14 dias, não apresentam depressão do eixo HHA, sendo que as alterações que observamos com a betametasona ocorreram, principalmente, nos tratamentos de 21 dias; já Ginel, Ganido e Lucena (2007), discordam e afirmam o contrário; segundo esse autores, a supressão é causada por períodos de tratamento entre 2-8 semanas.

Diversos trabalhos na literatura, como Bekesi et al., (2004) e Archana e Namasivayam (1999), demonstram o efeito imunossupressor dos glicocorticóides sobre a atividade de neutrófilos,

tanto em humanos como em animais de laboratório; no nosso trabalho, observamos que houve uma queda na intensidade e na porcentagem de fagocitose nos animais tratados com a betametasona e a triancinolona; nota-se ainda que, a triancinolona obteve os menores valores nos dois parâmetros comparada com a betametasona no tratamento de 7 dias; já no tratamento de 14 e 21 dias, a betametasona que obteve os menores valores na porcentagem de fagocitose; no burst induzido, a betametasona e a triancinolona obtiveram também uma diminuição, durante o tratamento de 7 dias. Segundo Morgulis et al., (2004), a função de macrófagos e neutrófilos é regulada pela atividade do eixo HHA; este, regula a função dos fagócitos através de uma cascata de hormônios em resposta a uma variedade de estímulos, por exemplo o estresse, resultando um aumento da produção de esteróides pelas adrenais, sendo essa resposta, mediada pelo SNAS (STANKEVIVIVUS, 2004). Desta forma, uma explicação para essa diminuição da atividade dos neutrófilos poderia ser decorrente de uma ativação do eixo HHA, alterando a capacidade funcional de neutrófilos (SANDERS; KAVELAARS, 2007).

As alterações encontradas no hemograma dos animais tratados com a dexametasona injetável, como neutrofilia, linfopenia e leucocitose, também foram citados por Feldman e Nelson (1995). Nos animais tratados topicamente, a triancinolona foi a que causou as maiores diferenças já após apenas 7 dias de tratamento; em relação à contagem diferencial de células, os animais tratados com a betametasona foram os que obtiveram os menores valores de neutrófilos e monócitos; segundo Thomas et al (1999) e Nutall, Mueller, Emmanuel (2009), que afirmam que tratamentos tópicos com glicocorticóides, não alteram significativamente o hemograma, em nossos experimentos observamos que ocorreram diferenças significantes neste parâmetro, discordando então, desses autores. Para Chrousos (2006), todos os corticosteróides tópicos absorvíveis tem o potencial de suprimir o eixo HHA, citado anteriormente, apresentando apenas uma anormalidade nos exames laboratoriais, como observado em nossos experimentos.

Esteróides tópicos podem induzir a “Síndrome de Cushing” (AL-KHENAIZAN; ALWAN, 2008); Ferasin (2001) relatou um caso de um gato que apresentou um quadro de “Cushing” após um tratamento de quatro semanas com metilprednisolona; segundo este, 2 casos foram relatados de hiperadrenocorticismismo após tratamento prolongado com dexametasona ou acetato de triancinolona. No nosso trabalho, foi observado que a adrenal se encontrava com um tamanho macroscopicamente menor, em alguns tratamentos, com a betametasona e hidrocortisona e microscopicamente, com suas proporções diminuídas, zona cortical e medular, sugerindo que, um tratamento tópico, por um período máximo de 21 dias, não

desencadearia um distúrbio da adrenal; fato esse observado no peso relativo das adrenais, onde relatamos uma diminuição com os animais tratados com a betametasona. Segundo Tilley e Smith-Jr (2003), o hiperadrenocorticismismo é caracterizado por uma hiperplasia da adrenal; por outro lado, nos casos de Cushing iatrogênico, nota-se frequentemente uma redução do tamanho das adrenais, com predominância da diminuição de sua camada cortical. Tal fato se deve à supressão de secreção de ACTH por altos níveis circulantes de glicocorticóides exógenos. Assim, nos animais utilizados no nosso trabalho, observamos fato semelhante àquele descrito comumente para o Cushing iatrogênico, ou seja, tendência à redução de tamanho das adrenais, mais pronunciada nos ratos tratados com a betametasona por 21 dias.

Segundo Aniya e Griffin (2008), tratamentos com a dexametasona tópica podem causar alterações na função hepática; no nosso trabalho observamos que o fígado foi um dos órgãos mais afetados com os tratamentos, tanto com a dexametasona injetável, quanto aos tópicos; observou-se marcada degeneração vacuolar no histopatológico, principalmente com o uso da dexametasona e da triancinolona, concordando com esses autores; mas não podemos sugerir alteração da função, visto que não realizamos nenhum teste para este fim.

É importante relatarmos que, em um medicamento de uso otológico, o veículo é muito importante, pois sua absorção depende diretamente da sua composição; assim, um veículo à base de propilenoglicol tem altos níveis de absorção (ANIYA; GRIFFIN, 2008); fato de extrema importância para se tentar quantificar a quantidade de produto absorvido e consequentemente, seu efeito sistêmico. No nosso trabalho, utilizamos um veículo à base de glicerina porque a maioria dos medicamentos comerciais utilizados para tratamentos de otites em cães e gatos, tem essa mesma composição. Segundo Hadgraf et al., (1999), somente 10% do produto tópico é absorvido topicamente; isso pode ser discutido também levando em consideração de que seu uso é relacionado à uma condição de enfermidade; para Wilkinson (2001) a absorção de fármacos é maior em locais em que a pele se encontra em condições de inflamação; no nosso trabalho, utilizamos animais hígidos, influenciando nos resultados, pois a absorção tende à ser menor. Tal fato sugere que, caso fossem utilizados animais que apresentassem inflamação no local de aplicação da preparação otológica contendo glicocorticóides (otite) provavelmente veríamos mais sinais decorrentes de sua absorção.

Os tempos de tratamento selecionados para o presente trabalho foram baseados, principalmente, na recomendação dos fabricantes de antiinflamatórios de uso otológico, bem como na prática veterinária corrente, que preconiza frequentemente o seu uso por 14 dias.

(GHUBASH; MARSELLA; KUNKLE, 2004). Apesar de não haver relatos claros ou coerentes, tempos maiores que esses, incluindo três ou até quatro semanas consecutivas de uso de glicocorticóides tópicos não são incomuns no cotidiano clínico veterinário.

8 CONCLUSÃO

No trabalho descrito aqui, houve sinais evidentes e incontestáveis de absorção e distribuição de antiinflamatórios tópicos, cujos princípios ativos incluem a hidrocortisona, a betametasona e a triancinolona, aplicados no pavilhão auricular de ratos por um período de uma a três semanas. Os efeitos sistêmicos dos fármacos em questão incluíram diminuição do edema inflamatório pela carragenina, perda de peso corpóreo, diminuição relativa do peso do baço e adrenais, além de alterações no hemograma, atividade de neutrófilos, proliferação de linfócitos e secreção basal de corticosterona (endógena).

De nossos resultados, conclui-se que a absorção de medicamentos para uso tópico à base de glicocorticóides não é desprezível e pode causar efeitos sistêmicos consideráveis. Tomados em conjunto, a diminuição relativa de um órgão linfóide importante, associada com diminuição macroscópica das adrenais, com consequente supressão parcial da secreção endógena de glicocorticóides aponta para o desenvolvimento de uma Síndrome de Cushing de etiologia iatrogênica, o que não pode ser desprezado. Na dependência da potência relativa da molécula, grau de absorção, duração do tratamento, idade e porte do animal, sugerimos que suas decorrência sistêmicas sejam consideradas quando de sua utilização terapêutica.

Ainda, transpondo tais achados para a prática clínica veterinária, propomos que a conduta do médico veterinário empregando preparações tópicas de uso prolongado que contém antiinflamatórios esteroidais, extremamente comuns no cotidiano de dermatologia veterinária, deva incluir um acompanhamento cuidadoso, frequente e criterioso dos animais tratados, com a finalidade de se evitar precocemente alterações patológicas importantes decorrentes da terapêutica.

9 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K. Disease of immunity. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease**. 7. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, p.193-268, 2005.
- ABE, Y.; SERIYA, S.; YAMASHITA, T; SENDO, F. Vascular hypermeability induce by tumor necrosis factor and it's augmentacion by IL-1 and IFN-gama is inhibit by selective depletion of neutrophils with a monoclonal antibody. **Journal of Immunology**, v. 145, n. 9, p.2902-07, 1990.
- ABRAHAM, G.; DEMERAJ, F.; UNGEMACH, F. R. Comparison of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis susceptibility upon single-dose i.m. depot versus long-acting i.v. triamcinolone acetonide therapy: a direct pharmacokinetic correlation. **Journal of Endocrinology**, v. 191, p. 491-496, 2006.
- ABRAHAM, G.; GOTTSCHALK, J.; UNGEMACH, F. R. Evidence for ototopical glucocorticoid-induced decrease in hypothalamic-pituitary-adrenal axis response and liver function. **Endocrinology**, v. 146, n. 7, p.3163-3171, 2005.
- AHLSTROM, L.A.; CROSS, S. E.; MORTON, J. M.; MILLIS, P. C. The effects of surface preparation on the penetration of hydrocortisone through canine skin. **The Veterinary Journal**, v. 180, p. 48-54, 2009.
- AHLUWALIA, A.; PEERS, S. H.; FLOWER, R. J. Steroid inhibition of oedema formation in the rat skin. **British Journal of Pharmacology**, v. 106, p. 628-631, 1992.
- AL-KHENAIZAN, S; AL WAN, I. Topical steroid-induced cushing syndrome. **Annals Saudi Medicine**, v. 28, n. 4, p. 300-302, 2008.
- ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, p. 89-99, 2002.
- ANDRADE, S. F.; JERICÓ, M. M. Antiinflamatórios. In: ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, p.128-149, 2002.

- ANIYA, J. S.; GRIFFIN, C. E. The effects of otic vehicle and concentration of dexamethasone on liver enzyme activities and adrenal function in small breed healthy dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 19, n. 4, 226-31, 2008.
- ARCHANA, R.; NAMASIVAYAM, A. The effect of acute noise stress on neutrophil function. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 43, n. 4, p.491-5, 1999.
- BANKS, J. W. **Histologia veterinária aplicada**. 2.ed. Barueri, SP: Manole, 1992.
- BAXTER, J. D. Advances in glucocorticoid therapy. **Advances in internal medicine**, v.45, p. 317-349, 2000.
- BAZERQUE, P. M.; MARTINEZ, M.; MAGGI, N. D.; CERASO, O. L.; BOLANOS, R. Farmacologia, 3 / De La inflamacion y El dolor. Bueno Aires, Argentina: Totay Argentina S.A.C.I, p. 31-75, 1979.
- BEKESI, G.; RACZ, K.; HRABAK, A.; KAKUCS, R.; VARBIRO, S.; MAGYAR, Z.; FEHER, J.; DINYA, E.; PAZMANY, T.; PAKU, S.; SZEKACS, B. Systematic investigation of different steroid precursors with respect to their effect on superoxide anion production by human neutrophils granulocytes. **Hormonic and Metabolic Research**, v. 36, n. 3, p. 155-63, 2004.
- BIRGEL, E. H. **Patologia clínica veterinária**. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, p. 260, 1982.
- BOSJE, J.; RIJNBERK, A.;MOL, J. A.; VOORHOUT, G.; KOOIRSTRA, H. S. Plasma concentrations of ACTH precursors correlate with pituitary size and resistance to dexamethasone in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 22, p. 201-210, 2002.
- BRUYETTE, D. S.; RUEHL, W. W. L-deprenil in the treatment of canine pituitary-dependent hyperadrenocorticism. In: BONAGURA, J. D. **Kirk's Current Veterinary Therapy XIII – Small Animall Practice**. Saunders, p. 362-363, 2002.
- BUCKEY, R. H. Molecular defects in human severe combined immunodeficiency and approaches to immune reconstitution. **Annual Review of Immunology**, v. 22, n.3, p. 625-655, 2004.

BUCKINGHAM, J.; HODGES, J. R. Hypothalamo-pituitary adrenocortical function in the rat after treatment with betamethasone. **British Journal of Pharmacology**, v. 56, p. 235-239, 1976.

CASSATELA, M. A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. **Immunology Today**, v. 16, p. 21-6, 1995.

CHASTAIN, C. B. Uso de corticosteroids. In: ETTINGER, S.J. **Tratado de medicina interna veterinária**. 3 ed. São Paulo: Mande, p. 434-449, 1992.

CHROUSOS, G. P. Adrenocorticóides e antagonistas cortico-supra-renais. In: KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 536-551, 2006.

CHURCH, M. K.; LOWMANN, M. A.; REES, P. H.; BENYON, R. C. Mast cells, neuropeptides and inflammation. *Inflammation Research*, v.27, n. 1-2, p. 8-16, 1989.

COICO, R.; SUNSHINE, G.; BENJAMINI, E. **Immunology: a short course**. 5. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, p. 361, 2003.

CRUZ, A. A.; CARVALHO, E. M. Introdução à imunofarmacologia. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 523-530, 2006.

DALLMAN, M. F.; AKANA, S. F.; LEVIN, N.; WALKER, C. D.; BRADBURY, M. J.; SUEMARU, S.; SCRIBNER, K. S. Corticosteroids and the control of function in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 746, p. 22-31, 1994.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 and interleukin antagonism. **Blood**, v. 77, p. 1627-52, 1991.

DÓREA, E. L. Fármacos imunossupressores. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 531-536, 2006.

DUNLOP, R. H.; MALBERT, C. H. **Veterinary pathophysiology**. Iowa: Blackwell Publishing, 2004.

DUNN, J. K. **Tratado de medicina de pequenos animais**. Brasil: Roca, p. 545-557, 2001.

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. Glucocorticoid therapy. In: FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 323-37, 1995.

FERASIN, L. Iatrogenic hyperadrenocorticism in a cat following a short therapeutic course of methylprednisolone acetate. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.3, p. 87-93, 2001.

FERGUSON, D. C.; HOENIG, M. Glicocorticóides, mineralocorticóides e inibidores da síntese de esteróides. In: ADAMS, H. R. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 542-561, 2003.

FERGUSON, D. C.; HOENIG, M. Hormônios hipotalâmicos e hipofisários. In: ADAMS, H. R. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 495-510, 2003.

FITZGERALD, P. A. Hormônios hipotalâmicos e hipofisários. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 505-522, 2006.

GALLIN, J. I.; GOLDSTEIN, I. M.; SNYDERMAN, R. **Inflammation basic principles and clinical correlates**, 2. Ed. NewYork: Roven Press, 1992.

GARCIA LEME, J.; HAMAMURA, L.; LEITE, M. P.; ROCHA E SILVA, M. Pharmacological analysis of the acute inflammatory process induced in the rat's paw by local injection of carrageenan and by heating. **British Journal of Pharmacology**, v. 48, p. 88-96, 1973.

GARCIA LEME, J.; SCHAPOVAL, E. E. S. Stimulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis by compounds formed in inflamed tissue and corticosterona or vascular permeability response in the skin of rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 53, p. 75-83, 1975.

- GARCIA LEME, J.; WILTHELM, D. L. The effects of adrenalectomy and corticosterona or vascular permeability response in the skin of the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 56, p. 402-407, 1975.
- GHUBASH, R.; MARSELLA, R.; KUNKLE, G. Evaluation of adrenal function in small-breed dogs receiving otic glucocorticoids. **Veterinary Dermatology**, v. 6, n.15, p. 363-8, 2004.
- GOH, K.; FURUSAWA, S.; KAWA, Y.; NEGISHI-OKITSU, S.; MIZOGUSHI, M. Production of interleukin-1-alpha and beta by human peripheral polymorphonuclear neutrophils. **Internacional Archives of Allergy and Applied Immunology**, v. 88, p. 297-303, 1989.
- GOOSSENS, M.; FELDMAN, E. C.; THÉON, A. Diagnosis and management of large pituitary tumors in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. In: BONAGURA, J.D. **Kirk's current veterinary therapy XIII – Small animal practice**. Saunders, p. 366-367, 2000.
- GOTTHELF, L. N. Diagnosis and treatment of otitis media in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America*. **Small Animal Practice**, v.34, p. 469-87, 2004.
- GREGORY, C. R. Immunosuppressive agents. In: BONAGURA, J.D. **Kirk's Current Veterinary Therapy XIII – Small Animal Practice**. Saunders, p. 509-513, 2000.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 813-825, 2002.
- HADGRAFT, J.; DEGIM, I. T.; HOUGHTON, E.; TEALE, P. In vitro percutaneous absorption of fusidic acid and betamethasone 17-valerate across canine skin. **Journal of Small Animal Practice**, v.40. p. 515-518, 1999.
- HAGIWARA, M. K. Perspectivas da imunoterapia em medicina veterinária. **Revista Cães e Gatos**, n. 90, 2000.

- HANAFUSA, J.; MUNE, T.; TANAHASHI, T.; ISOMURA, Y.; SUWA, T.; ISAJI, M.; DAIDO, H.; MORITA, H.; MURAYAMA, M.; YASUDA, K. Altered corticosteroid metabolism differentially affects pituitary corticotrophin response. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 282, p. 466-473, 2002.
- HANDA, R. J.; BURGESS, L.H.; KERR, J.E.; O'KEEFE, J. A. Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Horm Behav**, v. 28, n. 4, p. 464-476, 1994.
- HANSON, J. M.; KOOISTRA, H. S.; MOL, J. A.; TESKI, E.; MEIJ, B. P. Plasma profiles of adrenocorticotrophic hormone, cortisol, α -melanocyte-stimulating hormone and growth hormone in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism before and after hypophysectomy. **Journal of Endocrinology**, v. 190, p. 601-609, 2006.
- HOLFORD, A. L.; TOBIAS, K. M.; BARTGES, J. W.; JOHNSONSON, B. M. Adrenal response to adrenocorticotrophic hormone in dogs before and after surgical attenuation of a single congenital portosystemic shunt. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, p. 832-838, 2008.
- HILL, A. G. Initiators and Propagators of the Metabolic Response to injury. **World Journal of Surgery**, v. 24, n. 6, p. 624-629, 2000.
- JACOBSON, L. S. Diagnosis and medical treatment of otitis externa in the dog and cat. **Journal of the South African Veterinary Association**, v.73, p. 162-70, 2002.
- JERICÓ, M. M. Antiinflamatórios esteroidais. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 227-237, 1999.
- KEMPPAINEN, R. J.; PETERSON, M. E. Animal models of Cushing's disease. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 5, p. 21-28, 1994.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Acute and Chronic Inflammation. In: KUMAR, V., ABBAS, A. K., e FAUSTO, N. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease**. 7. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, p. 47-86, 2005.
- LAKE, D. F.; BRIGGS, A. D.; ARPORIAE, E.T. Imunofarmacologia. In: KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**, 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 778-800, 2006.

- LAMBERTS, S. W. Glucocorticoid receptors and Cushing's disease. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 197, p. 69-72, 2002.
- LORD, P. C. W.; WILMONT, L. M. G.; MIZEL, S. B.; CALL, C. E. Expression of interleukin -1 alfa and beta genes by human blood polymorphonuclear leukocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v.87, p. 1312-1321, 1991.
- LYDYARD, P. M.; GROSSI, C. E. Células, tecidos e órgãos do sistema imune. In: ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 6. ed. Barueri: Manole, p. 15-46, 2003.
- MACEDO, J. M. S.; OLIVEIRA, I. R. Corticosteróides. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 824-839, 2006.
- MAITRA, A.; ABBAS, A. K. The endocrine system. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease**. 7. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, p. 1155-1226, 2005.
- MAJNO, G.; JORIS, I. Inflammation. In: MAJNO, G.; JORIS, I. **Cells, tissues and disease**. 2. ed. New York: Oxford University Press, p. 307-522, 2004.
- MEDLEAU, L.; HNILICA, K. A. **Dermatologia de pequenos animais – Atlas colorido e guia terapêutico**. São Paulo: Roca, 2003.
- MEIJ, B. P.; MOL, J. A.; BEVERS, M. M.; RIJNBEEK, A. Alterations in anterior pituitary function of dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. **Journal of Endocrinology**, v. 154, p. 505-512, 1997.
- MIKHAIL, G. R.; SWEET, L. C.; MELLINGER, R. C. Parenteral long-acting corticosteroids: effect on hypothalamic-pituitary-adrenal function. **Annals of Allergy**, v. 31, p. 337-343, 1973.
- MOLLIDA, J. M.; TARDÓN, R. H.; GALLARDO, J. M.; MARTÍN-SUÁREZ, E.M. The ocular effects of intravitreal triamcinolone acetonide in dogs. **The Veterinary Journal**, v. 176, p. 326-332, 2008.

- MORGUKIS, M. S.; STANKEVICIUS, D.; SA-ROCHA, L.; PALERMO-NETO, J. Cohabitation with a sick Cage mate: consequences on behavior and on ehrlich tumor growth. **Neuroimmunomodulation**, v.11, n. 1, p. 49-57, 2004.
- MULLER, G. H.; KIRK, R. W.; SCOTT, D. W. **Dermatologia de pequenos animais**. 3. ed. São Paulo: Roca, 1985.
- NOGUEIRA, G. P. Farmacologia do eixo hipotálamo-hipófise. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 300-318, 1999.
- NORMAN, A. W.; LITWACK, G. **Hormones**. 2. ed. New York: Academy Press, p. 67-70, 1997.
- NUTTALL, T.; MUELLER, R.; BENSIGNOR, E.; VERDE, M.; NOLI, C.; SCHIMIDT, V.; REME, C. Efficacy of a 0.0584% hydrocortisone aceponate spray in the management of canine atopic dermatitis: a randomised, double blind, placebo-controlled trial. **Veterinary Dermatology**, v. 20, n. 3, p. 191-198, 2009.
- OLIVRY, T.; SOUSA, C. A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XX): glucocorticoid pharmacotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 81, p. 317-22, 2001.
- PARHAM, P. **O sistema immune**. São Paulo: Artmed, p. 372, 2001.
- RAMALHO, A. C. R. Farmacologia do eixo hipotálamo-hipófise. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 769-781, 2006.
- REIMONDO, G.; PACCOTTI, P.; MINETTO, M.; TERMINE, A.; STURA, A.; BERGHI, M.; ANGELI, A.; TERZOLO, M. The corticotrophin-releasing hormone test is the most reliable noninvasive method to differentiate pituitary from ectopic ACTH secretion in Cushing's syndrome. **Clinical Endocrinology**, v. 58, p. 718-724, 2003.
- RIJNBERK, A.; VANWEES, A.; MOL, J. A. Assessment of two tests for the diagnosis of canine hyperadrenocorticism. **Veterinary Record**, v. 122, p. 178-180, 1988.

ROBBINS, R. S.; VINAY, K.; COTRAN, S. L. **Pathologic bases of disease**. 7. ed., Philadelphia, p. 1207-1218, 2005

ROCKWELL, J. L.; MONROE, W. E.; TROMBLEE, T. C. Spontaneous hypoadrenocorticism in a dog after a diagnoses of hyperadrenocorticism. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, p. 255-258, 2005.

ROUGIER, S.; BORELL, D.; PHEULPIN, S.; WOEHLÉ, F.; BOISRAMÉ, B. A.A comparative study of two antimicrobial /anti-inflammatory formulations in the treatment of canine otitis externa. **Veterinary Dermatology**, v.16, p. 299-307, 2005.

SAKUMA, E.; SOJI, T.; HERBERT, D. C. Effects of hydrocortisone on the formation of gap junctions and the abnormal growty of Cilia withim the rat anterior pituitary glan. **The Anatomical Records**, v. 262, p. 169-175, 2001.

SIMONNEAUX, V.; RIBELAYGA, C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. **Pharmacol Rev**, v. 55, n. 2, p. 325-395, 2003.

STANKEVIVIUS, D. **Ansiedade induzida pela picrotoxina: reflexos comportamentais, bioquímicos e sobre a atividade de macrófagos peritoneais**. 2004. Dissertação (Mestrado) – Instituto de ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2004.

THOMAS, R. C.; LOGAS, D.; RADOSTA, L.; HARRISON, J. Effects of a 1% hydrocortisone conditioner on haematological and biochemical parameters, adrenal function testing and cutaneous reactivity to histamine in normal and pruritic dogs. **Veterinary Dermatology**, v.10, p. 109-116, 1999.

TIKU, K.; TIKU, M. L.; SKOSEY, J. L. Interleukn 1 production by human polymorphonuclear neutrophils. **Journal of Immunology**, v. 136, p. 3677-85, 1986.

TIZARD, I. **Introdução à imunologia veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1985.

WEBSTER, C.R.L. **Farmacologia clínica em medicina veterinária**. São Paulo: Roca, p. 117-119, 2005

WILKINSON, G. R. Pharmacokinetics: The Dynamics of Drug Absorption, Distribution and Elimination. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 10 ed. Medical Publishing Division, p. 3-29, 2001.

ZALOGA, G. P.; MARIK, P. Hypothalamic-pituitary-adrenal insufficiency. **Critical Care Clinics**, v. 17, p. 25-41, 2001.