BRUNO JOSÉ SILVA DE MELO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ANÁLOGO DE GLICOCORTICÓIDE L5 NA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA, NA ESTRUTURA E BIOMECÂNICA ÓSSEA E
NA COMPOSIÇÃO CORPORAL DE CAMUNDONGOS FÊMEAS ADULTOS**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Morfofuncionais do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Título
de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

BRUNO JOSÉ SILVA DE MELO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ANÁLOGO DE GLICOCORTICÓIDE L5 NA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA, NA ESTRUTURA E BIOMECÂNICA ÓSSEA E
NA COMPOSIÇÃO CORPORAL DE CAMUNDONGOS FÊMEAS ADULTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Morfofuncionais do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Ciências
Morfofuncionais

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cecília Helena de
Azevedo Gouveia

Versão corrigida. A versão original eletrônica
encontra-se disponível tanto na Biblioteca
do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses
e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Melo, Bruno José Silva de.

Avaliação do efeito do análogo de glicocorticóide L5 na resposta inflamatória, na estrutura e biomecânica ósseas e na composição corporal de camundongos fêmeas adultos / Bruno José Silva de Melo. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Cecilia Helena de Azevedo Gouveia.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Efeito do glicocorticóide no osso.

Versão do título para o inglês: Evaluation of the effect of the glucocorticoid analog L5 on the inflammatory response, on the bone structure and biomechanics and on the body composition of adult female mice.

1. Glicocorticóide 2. Osso 3. Arilpirazola 4. Inflamação
5. Composição corporal I. Gouveia, Profa. Dra. Cecilia Helena de Azevedo II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB0123/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Bruno José Silva de Melo.

Título da Dissertação: Avaliação do efeito do análogo de glicocorticóide L5 na resposta inflamatória, na estrutura e biomecânica ósseas e na composição corporal de camundongos fêmeas adultos.

Orientador(a): Profa. Dra. Cecilia Helena de Azevedo Gouveia.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **064** nas fls. **104** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Cecília Helena de Azevedo Gouveia Ferreira**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "*Estudo do efeito do análogo de glicocorticoide arilpirazol (L5) sobre o tecido ósseo de camundongos fêmeas adultos*" do qual participam o(s) alunos **Bruno José Silva e Melo**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **17.05.2011**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 23 de maio de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA - ICB/USP

**Dedico este trabalho com todo amor
ao meu pai, José Newton de Melo, e
a minha mãe, Irene Fernandes Silva
de Melo por me apoiarem
incondicionalmente na realização
desse sonho.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as gerações das minhas famílias materna e paterna que possibilitaram o meu nascimento. Agradeço aos meus avós maternos, Jorge e Minervina e aos meus avós paternos, Iraci e Adelidia por colocarem no mundo duas pessoas especiais que me deram a vida: Irene e Newton.

Obrigado pai e mãe por sempre me apoiarem seja nos momentos fáceis ou nos momentos difíceis. Eu amo muito vocês e serei sempre grato por tudo que fizeram e ainda fazem por mim.

Agradeço aos meus queridos irmãos Márcio, Cláudio, Milena e Júnior pelo apoio nessa minha estrada da vida.

Agradeço imensamente a minha orientadora, Cecília Helena de Azevedo Gouveia Ferreira, por me aceitar como seu aluno de mestrado, pela confiança e por todos os ensinamentos ao longo da graduação e pós graduação que possibilitaram a concretização dessa dissertação.

Agradeço à minha noiva, Ana Júlia De La Canal Canfild, pelo acolhimento em todos os momentos e por todo amor e carinho.

Aos meu queridos amigos de laboratório, Manuela Miranda, Marília Bianca, Marcos Vinicius por todas as brincadeiras, conversas e auxílios ao longo desse período. Agradeço especialmente duas amigas do laboratório, Gisele Martins Myamura e Cristiane Cabral Costa, que além de propiciarem suas excelentes companhias, me ensinaram muitas técnicas e conceitos laboratoriais e pessoais que os levarei por toda minha vida.

À todos os meus colegas do departamento em especial à Joelcimar Martins da Silva, Helder Costa, Aline Rosa Marosti Bobna e Ricardo Bandeira, os quais se tornaram meus grandes amigos.

Agradeço à todas e todos os professores do Instituto de Ciências Biomédicas que me auxiliaram ao longo do mestrado através das disciplinas cursadas ou das conversas nos seus laboratórios .

Agradeço muito a professora Dra. Suzana Beatriz Veríssimo de Mello, do departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da USP, pelos ensinamentos, pela participação e colaboração direta no meu projeto de mestrado.

Agradeço ao professor Dr. Júlio Cerca Serrão, do departamento de Biodinâmica da Escola de Educação Física e Esporte da USP, por me aceitar como monitor das disciplinas de Fundamentos de Biomecânica e Biomecânica Aplicada.

RESUMO

MELO, B. J. M. **Avaliação da resposta anti-inflamatória e do efeito sobre a estrutura e a biomecânica óssea do análogo de glicocorticóide (L5) em camundongos fêmeas adultos.** 2013. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Os glicocorticóides (GCs) atuam de forma potente no tratamento de doenças auto-imunes e inflamatórias. Entretanto, a sua utilização na prática clínica é limitada por uma variedade de efeitos colaterais indesejáveis, que incluem a osteoporose. O desenvolvimento e identificação de compostos que retenham a potente ação imunomoduladora e anti-inflamatória dos GCs, ao mesmo tempo em que exibam ações adversas reduzidas, é, portanto, uma das prioridades da ciência. Moduladores seletivos do receptor de glicocorticóides (SGRMs), por exemplo, poderiam apresentar efeitos desejáveis antiinflamatórios e imunomoduladores em maior medida do que ações biológicas indesejáveis. Recentemente, um grupo de novos compostos de arilpirazola foi identificado como potenciais SGRMs. Dentre os potenciais SGRMs-arilpirazola estudados, o composto L5 exibiu um padrão conhecido de efeitos anti-inflamatórios e um perfil reduzido de efeitos colaterais em células responsivas a GCs. Neste estudo, tivemos como objetivo avaliar ações anti-inflamatórias do L5 in vivo e, mais especificamente, estudar os efeitos do L5 na estrutura e biomecânica óssea de camundongos fêmeas adultas C57BL/6J (C57). Em um primeiro estudo (estudo I), comparamos a resposta anti-inflamatória da prednisolona (Pred) e L5 por contagem total de leucócitos, em modelo de inflamação induzido por carragenina em bolsa de ar. Em um segundo estudo (estudo II), comparamos o efeito do tratamento com Pred e L5 por 36 dias na estrutura do osso cortical e trabecular, por microtomografia computadorizada; em parâmetros biomecânicos ósseos, pelo teste de flexão de três pontos; e na composição corporal dos camundongos. A Pred e L5 reduziram de forma similar o número de total leucócitos, especialmente na dose de 2,1 mg/kg.pc/dia e 2,4 mg/kg.pc/dia (estudo I), respectivamente. Essas doses foram selecionadas para as análises posteriores (estudo II). A Pred reduziu a massa corporal desde a semana 1 até a semana 6 de tratamento, enquanto o L5 não teve efeito. Tanto a Pred quanto o L5 promoveram aumento de 15% ($p<0,05$), na massa do coração. A Pred promoveu redução significativa na massa muscular, enquanto que o L5 não teve efeito. Tanto a Pred quanto o L5 não alteraram os coxins adiposos axilar e retroperitoneal. A análise por microtomografia computadorizada do osso trabecular do fêmur mostrou que os animais tratados com L5 apresentaram diminuição de 55% ($p<0,05$) no volume trabecular (BV/TV), 11% ($p<0,0001$) na separação entre as trabéculas (Tb.Sp) e 28% ($p<0,05$) no grau de anisotropia (DA), enquanto que a Pred reduziu apenas a Tb.Sp. Tanto a Pred quanto o L5 não promoveram efeitos no osso cortical do fêmur e no osso trabecular e cortical da vértebra L5. Vimos, ainda, que os parâmetros biomecânicos do fêmur e da tíbia não foram afetados pelo tratamento com Pred e L5, com exceção da energia em quebra da tíbia, que se apresentou 44% ($p<0,05$) menor apenas nos animais tratados com Pred. Em conclusão, os achados deste estudo sugerem que o L5 tem o mesmo potencial anti-inflamatório da prednisolona, mas que detém ações seletivas em relação à prednisolona no tecido muscular e ósseo. Contrariamente à Pred, o L5 não se mostrou deletério à

massa muscular, mas apresentou efeitos divergentes da prednisolona na estrutura e biomecânica ósseas. Esses achados fazem do L5 uma droga com potencial de ser utilizada em doenças autoimunes que afetem o tecido muscular.

Palavras-chave: Glicocorticóide. Osso. Arilpirazola (L5). Inflamação. Composição corporal.

ABSTRACT

MELO, B. J. M. **Evaluation of the anti-inflammatory response and the effect on bone structure and biomechanics of the glucocorticoid analogue (L5) in adult female mice.** 2013. 70 p. Masters thesis in (Science Morphofunctional) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Glucocorticoids (GCs) act as potent drugs used in the treatment of autoimmune and inflammatory diseases. However, its clinical use is limited by a range of undesirable side effects, including osteoporosis. The identification and development of compounds that retain the potent immunomodulatory and antiinflammatory action of GCs, at the same time that exhibit reduced adverse actions, is, therefore, a priority of science. Selective modulators of the glucocorticoid receptor (SGRMs), for example, could provide desirable antiinflammatory and immunomodulating effects to a greater extent than undesirable biological actions. Recently, a new group of arilpirazol compounds has been identified as potential SGRMs. Among the potential SGRMs- arilpirazol studied, the L5 compound exhibited a pattern of known anti-inflammatory effects and reduced profile of side effects in responsive cells of GCs. In a first study (study I), we compared the anti-inflammatory effect of prednisolone (Pred) and L5 through the total leukocyte count in an inflammation model induced by carrageenan in air pouch. In a second study (Study II), we compared the effect of the treatment with Pred and L5 for 36 days in the structure of cortical and trabecular bone, by computed microtomography; in the bone biomechanical parameters, by the three-point bending test, and in the body composition of mice. Pred and L5 similarly reduced the number of total leukocytes, especially at a dose of 2,1 mg/kg.BW/day and 2,4 mg/kg.BW/day (study I), respectively. These doses were selected for further analysis (study II). Pred decreased body mass from week 1 to week 6 of treatment, while L5 had no effect. Both Pred and L5 caused an increase of 15% ($p < 0.05$) in the heart mass. Pred caused a significant reduction in the muscle mass, while L5 had no effect. Both Pred and L5 did not alter the axillary and retroperitoneal adipose cushions. Analysis by computed microtomography of the trabecular bone of the femur showed that animals treated with L5 showed 55% reduction ($p < 0.05$) in trabecular volume (BV / TV), 11% ($p < 0.0001$) in the trabecular separation (Tb.Sp) and 28% ($p < 0.05$) in the degree of anisotropy (DA), while Pred reduced only Tb.Sp. Both Pred and L5 did not promoted effects on cortical bone of the femur and the trabecular and cortical bone of the fifth lumbar vertebra. We also found that the biomechanical parameters of the femur and tibia were not affected by treatment with Pred and L5, with the exception of energy breaks of the tibia, which had 44% ($p < 0.05$) lower in animals treated only with pred. In conclusion, our findings suggest that L5 has the same anti-inflammatory potential of prednisolone, but has selective actions, in relation to prednisolone, in the muscle and bone tissues. Contrary to Pred, L5 was not deleterious to muscle mass, but had divergent effects of prednisolone on bone structure and biomechanics. These findings make L5 a potential drug to be used in autoimmune diseases that affect the muscle tissue.

Keywords: Glucocorticoid. Bone. Arylpyrazole (L5). Inflammation. Body composition.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Secreção dos hormônios adrenais pelas diferentes zonas do córtex e medula adrenal.....	19
Figura 2 - Síntese dos três esteróides adrenais fundamentais.....	20
Figura 3 - Mecanismo de ação do glicocorticóide.....	22
Figura 4 - Estrutura e afinidades de ligação ao GR do L5, prednisolona e dexametasona.....	30
Figura 5 - Esquema de seleção das áreas de interesse do fêmur e vértebra...	38
Figura 6 - Foto do osso no equipamento para a realização do teste de flexão de três pontos.....	39
Figura 7 - Total de leucócitos ao final do tratamento com L5 e Pred (Estudo I).....	40
.	
Figura 8 - Efeito do L5 e da Pred na massa corporal dos animais.....	41
Figura 9 - Efeito do L5 e da Pred nos parâmetros cardíacos dos animais.....	42
Figura 10 - Efeito do tratamento de L5 e da Pred no conteúdo de gordura axilar e retroperitoneal dos animais.....	43
Figura 11 - Efeito do tratamento de L5 e da Pred na massa úmida e seca dos músculos esqueléticos dos animais.....	44
Figura 12 - Efeito do tratamento de L5 e da Pred no comprimento corporal dos animais.....	45
Figura 13 - Efeito do tratamento de L5 e da Pred no comprimento do fêmur e da tíbia dos animais.....	45
Figura 14 -Análise por μ CT do efeito do tratamento de L5 e da Pred no osso trabecular femoral dos animais.....	47
Figura 15 - Análise por μ CTdo efeito do tratamento de L5 e da Pred no osso cortical da diáfise do fêmur dos animais.....	49
Figura 16 - Análise por μ CTdo efeito do tratamento de L5 e da Pred no osso trabecular da vértebra l5 dos animais.....	51

Figura 17 - Análise por μ CT do efeito do tratamento de L5 e da Pred no osso cortical da vértebra l5 dos animais	53
Figura 18 - Efeito do tratamento de L5 e da Pred em parâmetros biomecânicos do fêmur dos animais.....	54
Figura 19 - Efeito do tratamento de L5 e da Pred em parâmetros biomecânicos da tíbia dos animais.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos experimentais dos animais.....	35
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	- Duas dimensões
3D	- Três dimensões
μCT	- Microtomografia Computadorizada
ACTH	- Hormônio adrenocorticotrófico
AMO	- Alta Massa Óssea
AVP	- Arginina Vasopressina
BMD	- Densidade Mineral Óssea
BV/TV	- Volume ósseo/Volume trabecular
CRH	- Hormônio de liberação da corticotrofina
CSF-1	- Fator estimulante de colônias-1
CO₂	- Dióxido de carbono
DA	- Grau de anisotropia
DXA	- <i>Dual energy X-ray Absorptiometry</i>
EDL	- Músculo Extensor Longo dos Dedos
EFTP	- Ensaio de Flexão de Três Pontos
EPM	- Erro Padrão da Média
Fig.	- Figura
FGF23	- <i>Fibroblast growth factor 23</i>
GA	- Gordura Axilar
Gastro	- Músculo Gastrocnêmio
GC	- Glicocorticóide
GCs	- Glicocorticóides
GH	- Hormônio do crescimento

Gr	- Gordura Retroperitoneal
GR	- Receptor de glicocorticóide
GRα	- Receptor de glicocorticóide α
GRβ	- Receptor de glicocorticóide β
GREs	- Elementos responsivos Receptor de glicocorticóide
HHA	- Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
IGF-I	- <i>Insulin like growth fator I</i>
I5	- Quinta vértebra lombar
MEC	- Matriz Extracelular
NF-kβ	- Fator Nuclear kappa β
OPG	- Osteoprotegerina
PTH	- Paratormônio
Pred	- Prednisolona
RANK	- Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa β
RANK-L	- Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa β
Reto	- Músculo Reto Femoral
ROI	- Região de interesse
SGRMs	- Moduladoresseletivos de receptor de glicocorticóide
SMI	- Índice do modelo estrutural
SNA	- Sistema nervoso autônomo
SRC	- <i>Steroid receptor coactivator</i>
TA	- Temperatura Ambiente
Tb.N	- Número de trabéculas
Tb.Pf	- Fator de padrão de osso trabecular
Tb.Th	- Espessura trabecular

- Tb.Sp** - Separação entre as trabéculas
- TRAP** - Fosfatase ácida tartrato-resistente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Síntese e secreção de glicocorticóides.....	18
1.2 Regulação da secreção de glicocorticóides.....	20
1.3 Transporte e destino do glicocorticóides.....	21
1.4 Mecanismo de ação do glicocorticóides.....	21
1.5 Efeitos dos glicocorticóides.....	24
1.6 Respostas imussupressoras e anti-inflamatórias dos glicocorticóides.....	25
1.7 Uso terapêutico de glicocorticóides.....	25
1.8 Tecido ósseo.....	26
1.9 Glicocorticóides e tecido ósseo.....	29
1.10 Moduladores seletivos de receptores de glicocorticóide: dissociação dos efeitos negativos e positivos dos glicocorticóides.....	30
2 OBJETIVOS.....	32
2.1 Objetivos gerais.....	32
2.2 Objetivos específicos.....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Animais e tratamento.....	33
<i>3.1.1 Estudo I.....</i>	<i>33</i>
<i>3.1.2 Estudo II.....</i>	<i>34</i>
3.2 Sacrifício dos animais e coleta de amostras.....	35
3.3 Comprimento corporal e comprimento do fêmur e tíbia.....	36
3.4 Medida da composição corporal.....	36
3.5 Microtomografia computadorizada (μCT) em duas e três dimensões (2D e 3D).....	36
3.6 Teste biomecânico do fêmur e tíbia.....	38
3.7 Análise estatística.....	39
4 RESULTADOS.....	40
4.1 Estudo I- Resposta anti-inflamatória de L5 e prednisolona.....	41

4.2 Estudo II.....	42
4.2.2 <i>Massa corporal.....</i>	42
4.2.3 <i>Parâmetros cardíacos.....</i>	42
4.2.4 <i>Massa das gorduras axilar e retroperitoneal.....</i>	42
4.2.5 <i>Massa seca, massa úmida músculos esqueléticos.....</i>	43
4.2.6 <i>Comprimento corporal.....</i>	44
4.2.7 <i>Comprimento do fêmur e da tíbia.....</i>	45
4.2.8 <i>Microtomografia computadorizada em 3D: análise do osso trabecular da metáfise distal do fêmur.....</i>	46
4.2.9 <i>Microtomografia computadorizada em 2D: análise do osso cortical da diáfise do fêmur.....</i>	48
4.2.10 <i>Microtomografia computadorizada em 3D: análise do osso trabecular da quinta vértebra lombar (L5).....</i>	50
4.2.11 <i>Microtomografia computadorizada em 2D: análise do osso cortical da quinta vértebra lombar (L5).....</i>	52
4.2.12 <i>Teste biomecânico do fêmur e tíbia.....</i>	54
5 DISCUSSÃO.....	56
6 CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

Os glicocorticóides (GC) são hormônios esteróides, sintetizados na zona fasciculada do córtex da glândula adrenal, que atuam na regulação de inúmeros processos do organismo como a homeostase, a proliferação celular, desenvolvimento, reprodução, resposta imunes e inflamatórias. A utilização dos GCs sintéticos na prática clínica no tratamento de inúmeras patologias deve-se aos seus potentes efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores (GUYTON; HALL, 2006; HARDY; RAZA; COOPER, 2012;).

No entanto, a utilização dos fármacos glicocorticóides por tempo prolongado pode acarretar vários efeitos colaterais que interferem diretamente no metabolismo do organismo. São capazes de interferir no metabolismo de carboidratos, gorduras, proteínas, água, sódio (Na), potássio (K), cálcio (Ca) e no crescimento, desenvolvimento e metabolismo ósseos.

1.1 Síntese e secreção de glicocorticóides

As glândulas adrenais têm um importante papel no sistema endócrino: manutenção do equilíbrio do meio interno (homeostase do organismo) através da síntese e liberação de diversos tipos de hormônios. Ela é constituída por duas unidades funcionais: medula e córtex (GUYTON; HALL, 2006).

A Fig.1 ilustra a medula adrenal que é responsável pela secreção dos hormônios epinefrina e norepinefrina e o córtex adrenal que é responsável pela secreção dos hormônios corticosteróides: androgênios, mineralocorticóides e glicocorticóides. O córtex é composto por três zonas: zona glomerulosa, secretando mineralocorticóides (aldosterona); zona reticular, secretando androgênios (dehidroepiandrosterona) e zona fasciculada, secretando glicocorticóides (cortisol e corticosterona).

Figura 1 – Secreção dos hormônios adrenais pelas diferentes zonas do córtex e medula adrenal.

Todos os hormônios corticosteróides são compostos derivados do colesterol sanguíneo circulante. A síntese desses hormônios ocorre em duas organelas celulares, mitocôndrias e retículo endoplasmático, e em diferentes etapas. Cada etapa é catalisada por um sistema enzimático específico, atuando na formação dos diferentes tipos de hormônios. A Fig. 2 ilustra as diferentes etapas na formação principais hormônios corticosteróides (aldosterona, cortisol e androgênio).

Figura 2 – Síntese dos três esteroides adrenais fundamentais

Etapas na síntese dos três hormônios esteróides adrenais fundamentais. As características fisiológicas são: efeitos mineralocorticoides (M), efeitos glicocorticóides (G) e efeito androgênico (A)
 Fonte: Modificado de Guyton e Hall (2006).

1.2. Regulação da secreção de glicocorticóides

Durante uma situação de estresse há uma ameaça ao equilíbrio do organismo, da homeostase, fazendo com que um conjunto de respostas fisiológicas ocorra visando o restabelecimento desse equilíbrio. A resposta ao estresse é mediada pelo sistema nervoso autônomo (SNA) e pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). O SNA é responsável pela resposta imediata ao evento estressor, através da liberação de noradrenalina pela inervação simpática. Em seguida, há uma diminuição dessa resposta pelo reflexo parassimpático (BRIASSOULIS et al., 2011; BUTTGEREIT et al., 2005; GUYTON; HALL, 2006; STANBURY; GRAHAM, 1998).

Após a resposta do SNA, há ativação do eixo HHA elevando os níveis de glicocorticóides circulantes. A partir do estímulo de estresse, há uma ativação dos neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo que secretam o hormônio de liberação de corticotrofina (CRH). Este, por sua vez, é liberado na microcirculação porta da hipófise (BRIASSOULIS et al., 2011; BUTTGEREIT et al., 2005; GUYTON; HALL, 2006; KIRWAN, 1998 STANBURY; GRAHAM, 1998).

Em resposta a estimulação do CRH, a hipófise anterior secreta o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que, por sua vez, estimula a síntese e secreção do cortisol pelo córtex da adrenal. O cortisol, ao ligar se aos seus receptores (GR), no hipotálamo e na glândula hipófise anterior inibe (*feedback* negativo) a síntese de CRH e a síntese de ACTH, respectivamente (BRIASSOULIS et al., 2011;

BUTTGEREIT et al., 2005; GUYTON; HALL, 2006; KIRWAN, 1998; STANBURY; GRAHAM, 1998).

1.3 Transporte e destino do glicocorticoide

Os GCs, por serem derivados do colesterol, possuem baixa solubilidade plasmática. O cortisol é, sobretudo, transportado ligado a uma proteína carreadora específica, a globulina fixadora do cortisol ou transcortina e, em menor extensão, à albumina – cerca de 94% são transportados na forma fixada e 6% na forma livre. A fração livre dos GCs (naturais ou sintéticos) é a responsável pelos efeitos fisiológicos, já que os GCs ligados à transcortina e à albumina não são biologicamente ativos. Os GCs são degradados, sobretudo no fígado e conjugados para formar glicuronídeos e, em menor extensão, sulfatos ficando assim inativos. São secretados na bile e, depois, nas fezes, e, a sua maior parte, na urina (GUYTON; HALL, 2006; WRIGHT et al., 1993).

1.4 Mecanismo de ação do glicocorticoide

Embora sua denominação tenha origem em seu efeito característico sobre o metabolismo dos carboidratos, os GCs atuam praticamente sobre todos os órgãos e tecidos. Os hormônios GCs agem predominantemente através de mecanismo genômico (ação tardia), mas há evidências de que também agem através de mecanismos não genômicos (ação rápida).

O mecanismo genômico inicia-se com o hormônio, que é lipofílico, cruzando a membrana citoplasmática da célula-alvo por difusão passiva. No citoplasma, os GCs ligam-se a receptores proteicos específicos – os receptores de GC (GR) – que são proteínas citoplasmáticas, cuja estrutura contém domínios comuns a outros membros da superfamília de receptores nucleares (MCEWAN et al., 1993; WRIGHT et al., 1993).

Após a ligação, o complexo (GC-GR) sofre uma transformação estrutural e se torna capaz de translocar-se para o núcleo celular. O GR contém dois sinais de translocação nuclear: NL-1 e NL-2. O sinal de translocação nuclear 1 contém uma estrutura clássica do tipo básico de sinal localização nuclear que se estende da porção C-terminal do domínio de ligação do DNA para a região de dobradiça do GR.

A função nuclear translocação de sinal 1 é dependente importina α , um componente da proteína do sistema nuclear de translocação, que é dependente de energia e facilita a translocação do complexo (GC-GR) para o núcleo. Já o sinal de translocação nuclear 2 acontece quase todo ao longo do domínio de ligação do ligante. Os sinais de translocação nuclear facilitam a entrada GR no compartimento nuclear (SAVORY et al., 1999; HINKLE et al., 2003)

O complexo (GC-GR), no compartimento nuclear, modula a atividade de transcrição de genes alvos quer por ligação aos elementos responsivos aos GCs (GREs) ou por interação física com outros fatores de transcrição (CHROUSOS; KINO, 2005).

Após a modulação da transcrição de seus genes responsivos, os GRs dissociam dos GCs e é exportado para o citoplasma. A Fig. 3 abaixo ilustra o mecanismo de ação dos glicocorticóides (LONGUI, 2007).

Figura 3 – Mecanismo de ação do glicocorticóide.

Mecanismo de ação glicocorticóide. Os glicocorticóides (H) encontram-se com os receptores glicocorticóides (R) no citoplasma celular. Após ligação, o complexo H-R penetra no núcleo celular onde se liga aos elementos responsivos presentes na região reguladora dos genes-alvo dos glicocorticóides. Desta forma, os glicocorticóides exercem suas ações que modulam a expressão dos genes-alvo.

Fonte: Modificado de Longui (2007).

O gene humano do GR está localizado no cromossomo 5 (5q 31,3) que se estende por quase 160.000 pares de base e é composto por nove exons. Os GRs

são expressos em quase todos os tecidos e órgãos humanos em duas isoformas: o GR α e GR β (KINO; CHARMANDARI; CHROUSOS, 2011).

O GR α está localizado no citoplasma é o principal receptor e a sua ligação com os glicocorticóides produzem a maioria das ações conhecidas de glicocorticóides. Já o GR β , localizado predominantemente no núcleo, não se liga aos glicocorticóides (KINO; CHARMANDARI; CHROUSOS, 2011; OAKLEY; SAR; CIDLOWSKI, 1996; WEBSTER et al., 2001).

Kino, Charmandari e Chrousos (2011) descrevem que as isoformas de GRs são semelhantes, diferenciando no número total de aminoácidos (GR α - 777 e o GR β - 742) e que o GR β apresenta 15 aminoácidos não homólogos a GR α . O GR α transloca-se do citoplasma para o núcleo ligado aos glicocorticóides e regula a atividade de transcrição de inúmeros genes responsivos glicocorticóides, seja por ligação as sequências de DNA cognatas (GREs) ou pela interação com outros fatores de transcrição. Todas essas ações do GR desempenham um papel relevante na regulação das desordens inflamatórias auto-imunes (BAMBERGER et al., 1995)

Os GR β , por predominarem no núcleo, não se ligam aos GCs não ativando os genes responsivos aos GCs (OAKLEY; SAR; CIDLOWSKI, 1996). O GR β pode atenuar a transativação dos genes responsivos aos GCs mediada pelo GR α , tornando se responsável pela resistência de glicocorticóides (BAMBERGER et al., 1995; KINO; SU; CHROUSOS, 2009; LEWIS-TUFFIN; CIDLOWSKI, 2006; SILVERMAN; STERNBERG, 2012; WEBSTER et al., 2001).

Em adição a estas ações genômicas, os GCs também exercem efeitos rápidos não genômicos. As ações não genômicas (ações rápidas), que ocorrem em segundos, têm sido frequentemente reportadas em órgãos como músculo, pâncreas, coração, tecido adiposo, sistema imune e cérebro. Evidências atuais indicam que essas ações são resultado tanto de interações não específicas dos GCs, com as membranas celulares, ou são resultado da ligação citoplasmática do GC ao GR, com a subsequente liberação de proteínas co-ativadoras do GR, incluindo as da família SRC (*steroid receptor coactivator*) (BOLDIZSAR et al., 2010).

Acredita-se, também, que possam ocorrer através da interação de GC com GR (intacto ou variante) ligado à membrana celular ou com possíveis receptores acoplados à proteína G, sinalizando, portanto, através de mecanismos dependentes da proteína G e de quinases (EVANSON et al., 2010). Os mecanismos de ações não genômicos dos GCs, entretanto, permanecem para ser elucidados.

1.5 Efeitos dos glicocorticóides

O cortisol, principal GC produzido pelas glândulas adrenais, possui uma grande variedade de efeitos no organismo.

Efeito sobre o metabolismo dos carboidratos: induz a hiperglicemia devido à estimulação da síntese de glicose a partir de proteínas e outros compostos, num processo conhecido por gliconeogênese ou neoglicogênese; indução da resistência periférica à insulina, levando ao aumento da concentração sanguínea da glicose e podendo gerar diabetes (GUYTON; HALL, 2006).

Efeito sobre o metabolismo das proteínas: aumenta o catabolismo proteico em todas as células corporais, exceto nas do fígado, acarretando transporte diminuído de aminoácidos para interior das células extra-hepáticas e transporte acentuado para o interior das células hepáticas (GUYTON; HALL, 2006).

Efeito sobre o metabolismo de gorduras: aumenta a mobilização de ácidos graxos dos tecidos adiposos aumentando assim a concentração sanguínea de ácidos graxos livres (GUYTON; HALL, 2006).

Efeitos no crescimento esquelético: redução da secreção hipofisária do hormônio do crescimento (GH) e sua capacidade de gerar IGF-I (*insulin like growth factor*) ao nível hepático e ao nível osteocartilaginoso. Com isso, verifica-se a redução da concentração local de IGF-I e da ação do GH na cartilagem de crescimento. Além disso, os GCs inibem a maturação das células da camada de repouso (GH dependente) e a divisão celular na camada proliferativa (IGF-I dependente) na cartilagem de crescimento (LONGUI, 2007).

Efeito no metabolismo de Na, K e da água: aumento da reabsorção de Na⁺ e da excreção de K⁺ pelos rins. Além disso, os glicocorticóides aumentam a depuração de água livre devido a um efeito direto no túbulo renal e a um aumento na taxa de filtração glomerular.

Efeito no metabolismo do cálcio: diminuição da absorção intestinal, devido a redução das concentrações das proteínas responsáveis pela absorção ativa de Ca, incluindo a calbindina D9K, o canal epitelial TRPV6 e a ATPase PMCA1b da membrana plasmática e aumento da depuração urinária de cálcio nos rins, devido à combinação do aumento da filtração glomerular e diminuída reabsorção tubular (HUYBERS et al., 2007).

1.6 Respostas imunossupressora e anti-inflamatória dos glicocorticóides

As respostas imunossupressoras e anti-inflamatórias dos glicocorticóides, fisiológicas ou farmacológicas, ocorrem com a ativação do receptor de glicocorticóide regulando inúmeros genes que controlam as redes reguladoras dessas respostas.

Após o processo inflamatório instalado, a ação dos glicocorticóides ocorre de maneira direta (genômica) no sistema imune em vários pontos. Culmina com o desvio da resposta dos linfócitos T (Th1) para um padrão T helper 2 (Th2), ou seja, esse padrão é caracterizado pelo aumento das citocinas com características anti-inflamatórias como as interleucinas IL4, IL10, IL13 e o fator transformador de crescimento β (FTC β), gerenciando a resposta imune do organismo. Ainda são capazes de inibir citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas IL1, IL2, IL6, IL7 e o fator de necrose tumoral (TNF α), bem como moléculas de adesão, como a lipocortina-1, moléculas de adesão vascular (VCAM-1) e moléculas de adesão intercelular (ICAM), ou ainda enzimas, como a sintase óxido nítrico (NOS), a ciclo oxigenase (COX2) e a fosfolipase (PLA2). Ou seja, inibem a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular acarretando uma melhora do quadro inflamatório (VANDEVYVER et al., 2013).

Verifica-se que alguns efeitos anti-inflamatórios dos glicocorticóides acontecessem rapidamente (em minutos) e que, portanto, não são efeitos genômicos. Esses efeitos indiretos (não-genômicos) dos glicocorticóides determinam a redução da ação histamínica, diminuição da síntese de prostaglandina e da ativação do plasminogênio, inibindo também a vasodilatação e diminuindo o edema.

1.7 Uso terapêutico de glicocorticóide

A administração exógena de GC é, geralmente, utilizada para se obter a sua ação anti-inflamatória e imunomoduladora. É, portanto, utilizada no tratamento de condições dermatológicas, doença inflamatória intestinal, doenças pulmonares (asma, doença pulmonar obstrutiva crônica e doença intersticial pulmonar), doenças renais (glomerulonefrite), doenças reumatológicas e autoimunes (artrite reumatóide,

lúpus, vasculites e polimialgia reumática) e, ainda, para prevenir a rejeição de órgãos após transplante.

De acordo com Buttgereit et al. (2005), Stanbury e Graham (1998) os efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores do tratamento com glicocorticóides são acompanhados por efeitos colaterais. Dentre eles os autores citam a osteoporose, a perda de massa muscular, o aumento e redistribuição da gordura corporal, o afinamento da pele, a resistência à insulina ou diabetes mellitus, a hipertensão arterial e distúrbios neuropsiquiátricos, incluindo a depressão, a disfunção cognitiva e a labilidade de humor.

1.8 Tecido ósseo

O tecido ósseo desempenha e participa de importantes funções do corpo humano, tais como armazenamento de cálcio, fósforo e outros íons e proteção de órgãos e locomoção (BARON, 2003; GRAAF, 2003). Recentemente, viu-se que o tecido ósseo também participa da regulação do metabolismo mineral, através da liberação do fator de crescimento fibroblástico 23 (*fibroblast growth factor 23* – FGF-23) pelos osteócitos; e da regulação do metabolismo da glicose, através da liberação de osteocalcina pelos osteoblastos (FUKUMOTO; MARTIN, 2009).

Macroscopicamente, o tecido ósseo pode ser classificado como cortical (ou compacto) e trabecular (ou esponjoso). O osso cortical representa 80% da massa esquelética, predomina nos ossos longos e tem principalmente função mecânica e de proteção de órgãos. Sua espessura e arquitetura variam dependendo do sítio esquelético, o que reflete o desempenho funcional do osso. O osso trabecular ou esponjoso representa 20% da massa esquelética, é encontrado predominantemente no esqueleto axial e no interior dos ossos longos, dentro de suas extremidades expandidas (metáfises e epífises). O osso esponjoso dá resistência adicional aos ossos, além de acomodar a medula óssea por entre suas traves ósseas. Tanto o osso trabecular quanto o cortical formam um reservatório de cálcio e fosfato que podem ser prontamente removidos ou acrescentados por ação celular, sob controle hormonal (BARON, 2003).

Por se tratar de um tecido conjuntivo, microscopicamente o tecido ósseo consiste de uma porção celular e de uma matriz extracelular (MEC). A MEC possui um componente orgânico (35%) e inorgânico (65%). O seu componente orgânico é

formado por colágeno, proteínas não colágenas (osteonectina, osteocalcina, entre outras), mucopolissacarídeos e lipídeos. A fase inorgânica é, predominantemente, constituída por cálcio e fósforo, que são depositados como sais amorfos sobre a MEC e, durante o processo de mineralização óssea, formam estruturas cristalinas similares aos cristais de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. As moléculas de colágeno formam uma estrutura tridimensional, criando espaços para acomodar esses cristais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

As células ósseas representam apenas 1 a 2% do tecido ósseo. Entretanto, são responsáveis pelas funções metabólicas do osso (como, por exemplo, o remodelamento ósseo e a manutenção dos níveis circulantes de cálcio). Basicamente, há duas linhagens de células no tecido ósseo, as células da linhagem osteoblástica e osteoclástica. As células ósseas da linhagem osteoblástica são: (a) as células osteoprogenitoras, que dão origem aos osteoblastos; (b) os osteoblastos, responsáveis pela formação óssea; (c) os osteócitos, encontrados embebidos na MEC; e (d) as células de revestimento ou de superfície, responsáveis pela proteção das superfícies ósseas. A outra linhagem é de células osteoclásticas, responsáveis pela reabsorção óssea (BARON, 2003).

O tecido ósseo está em constante processo de remodelamento. O remodelamento ósseo é um processo fisiológico constante que permite a manutenção da resistência óssea. Esse processo permite a substituição de um osso envelhecido, danificado por um osso novo e é organizado pela atividade finamente regulada e acoplada dos osteoclastos e osteoblastos nas unidades de células de remodelamento ósseo (BRUs, *bone remodeling units*) presenciadas em sítios das superfícies óssea. O ciclo de remodelamento ósseo na BRUs segue uma sequência de eventos: ativação-reabsorção-formação. As superfícies ósseas quiescentes são recobertas por células de superfície ou de revestimento (*flat bone-lining cells*). Em resposta a um estímulo de reabsorção, as células de superfície se retraem e expõem a superfície celular; ao mesmo tempo, ocorre a diferenciação, ativação e migração dos osteoclastos aos sítios de reabsorção (superfície exposta). Os osteoclastos reabsorvem o osso velho e formam uma lacuna, chamada de lacuna de Howship. Finalmente, os osteoblastos ocupam o sítio de reabsorção e sintetizam a matriz extracelular (osteóide) que, após um período de amadurecimento (aproximadamente 10 dias), será mineralizada. Ao final de cada ciclo de remodelamento, a quiescência é restaurada. O produto final do remodelamento ósseo é a manutenção da

integridade óssea (GOUVEIA, 2004; MUNDY; OYAJOB, 2003). Em adultos, a reabsorção e formação óssea geralmente ocorrem de um modo balanceado, a fim de manter a massa óssea praticamente constante (BARON, 2003; MUNDY; OYAJOB, 2003). O remodelamento ósseo é importante para o reparo dos micro e macro-danos e para permitir a renovação contínua da matriz óssea, o que, por sua vez, garante a sua integridade (MUNDY; OYAJOB, 2003).

Uma série de fatores sistêmicos e locais é responsável pela regulação do processo de remodelamento. Sabe-se, atualmente, que a interação entre proteínas localizadas nas superfícies dos osteoblastos e osteoclastos é extremamente importante para a regulação local e sistêmica do remodelamento ósseo.

O ligante do receptor ativador do NF- κ B (RANK-L) é um membro da superfamília dos ligantes aos fatores de necrose tumoral (TNF). O RANK-L está presente na superfície das células osteoblásticas e se liga a seu receptor o RANK (*Receptor activator of nuclear factor – kappa B*), que está presente na superfície das células precursoras dos osteoclastos e nos osteoclastos maduros. O RANK é uma proteína de membrana do tipo I, que foi originalmente clonada a partir de células dendríticas (ANDERSON et al., 1997). A ligação do RANK-L ao seu receptor específico, o RANK, promove a indução da osteoclastogênese e atividade dos osteoclastos. O RANK-L também é um fator essencial para sobrevivência e maturação dos osteoclastos (SCHNEEWEIS; WILLARD; MILLA, 2005; WADA et al., 2006).

Segundo Liu et al. (1991), a osteoprotegerina (OPG) é uma glicoproteína solúvel, sintetizada pelos osteoblastos, que se liga ao RANK-L e, desta forma, bloqueia a ligação RANK/RANK-L. Assim sendo, a interação OPG/RANK-L limita a sobrevivência, diferenciação e atividade dos osteoclastos (SCHNEEWEIS; WILLARD; MILLA, 2005; WADA et al., 2006).

A descoberta desta interação celular entre osteoblastos e osteoclastos – via sistema RANK/RANKL/OPG - permitiu um maior entendimento dos mecanismos de regulação do remodelamento ósseo, tanto em condições fisiológicas como também em condições patológicas.

1.9 Glicocorticóide e tecido ósseo

Os GCs têm ações importantes sobre o metabolismo ósseo. Sabe-se que o uso de GCs pode levar a uma série de alterações ósseas, levando à osteoporose (BONADONNA et al., 2005; CANALIS, 1996; CANALIS; GIUSTINA, 2001; CARPINTERI et al., 2010; DELANEY et al., 2001; EASTELL et al., 1998; HOFBAUER et al., 1999; LURKET, 2006;; MANOLAGAS, 2000; WEINSTEIN et al., 1998).

Os GCs afetam o tecido ósseo de maneira a promover perda de massa óssea de maneira direta e indireta. Ações indiretas incluem: 1- alteração do metabolismo do cálcio, diminuindo a sua absorção gastrointestinal, o que leva ao aumento da secreção de paratormônio (PTH) com consequente aumento da reabsorção óssea; 2- alteração da secreção dos hormônios sexuais (inibição da secreção hipofisária de gonadotrofinas, da secreção ovariana de estrógenos, da secreção testicular de testosterona e da secreção adrenal de androstenidiona e dehidroepiandrosterona agravando a perda óssea); 3- diminuição da produção de prostaglandinas, levando à diminuição da síntese de proteínas colágenas e não colágenas); 4- redução da síntese de fatores de crescimento (por ex., inibição da transcrição de IGF-I e IGF-binding protein-5). Diretamente, os GCs aumentam, em um primeiro momento, a reabsorção óssea, com aumento da expressão do receptor ativador nuclear Kappa B (RANK), do ligante receptor ativador nuclear Kappa B (RANKL), da collagenase-3 e do fator estimulante de colônias-1 (CSF-1), e inibição da produção de osteoprotegerina por osteoblastos induzindo a atividade osteoclástica. Posteriormente, a reabsorção óssea é reduzida em função de uma importante diminuição na atividade osteoblástica. Com relação à formação óssea, os GCs levam, diretamente, a apoptose de osteoblastos maduros e osteócitos e à diminuição da diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, levando à diferenciação dessas células em adipócitos. O resultado disso é uma redução importante no número de osteoblastos e na formação óssea, com consequente perda de massa óssea (BONADONNA et al., 2005; CANALIS, 1996; CANALIS; GIUSTINA, 2001; DELANEY et al., 2001; EASTELL et al., 1998; HOFBAUER et al., 1999; LURKET, 2006; MANELLI et al., 2001; WEINSTEIN et al., 1998).

1.10 Moduladores seletivos de receptores de glicocorticóide: dissociação dos efeitos negativos e positivos dos glicocorticóides

Até recentemente, o conceito clássico era o de que os efeitos negativos do tratamento com GCs não poderiam ser farmacologicamente dissociados dos efeitos benéficos (STANBURY; GRAHAM, 1998). Entretanto, nos últimos anos, um novo conceito terapêutico surgiu: diferentes ligantes para receptores nucleares podem exibir seletividade por ações fenotípicas em função de especificidade por diferentes subtipos de receptores ou em função do recrutamento diferenciado de cofactores (fatores de transcrição) (COGHLAN et al., 2003; SCHACKE et al., 2007). Moduladores seletivos de GR (SGRMs), por exemplo, poderiam apresentar efeitos desejáveis anti-inflamatórios e imunomoduladores em maior medida do que ações biológicas indesejáveis.

Shah and Scanlan (2004) desenvolveram compostos de arilpirazola (L1 a L15) como potenciais SGRMs. Esses compostos se diferenciam por apresentarem substituintes em posições diferentes na estrutura de arilpirazola. Os autores relataram que esses compostos apresentaram afinidade de ligação pelo GR com potência similar ao cortisol, a dexametasona e prednisolona. A Fig. 4 mostra a estrutura química e a afinidade de ligação pelo GR do L5, prednisolona e dexametasona, conforme descrito em Wang et al. (2006).

Figura 4 - Estrutura e ação farmacológica do L5, prednisolona e dexametasona

Fonte: Modificado de Wang et al. (2006)

Wang et al. (2006), em sistemas de culturas de células verificou que dentre os compostos de arilpirazola o L5 teve efeito anti-inflamatório e redução dos efeitos colaterais. O L5 teve efeito similar a dexametasona, inibindo a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias, IL-8, RANTES, GRO1, MCP1, GMCSF e IL-6 em células epiteliais de pulmão A549 induzidas com fator de necrose tumoral. Além disso, o L5 não inibiu a diferenciação de células pré-osteoblásticas em osteoblastos e induziu a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos de maneira reduzida quando comparada com a dexametasona que inibe e induz a diferenciação de pré-osteoblastos em osteoblastos e pré-adipócitos em adipócitos, respectivamente.

Em um estudo recente, Roohk et al. (2010), comparou efeitos do L5 a efeitos clássicos da prednisolona e mostraram, pela primeira vez, que o L5 também exibe ações seletivas in vivo. A prednisolona reduziu a síntese de colágeno na pele e osso, a síntese de proteínas musculares e a contagem de linfócitos esplênicos, enquanto que o L5 não apresentou nenhuma dessas ações. Por outro lado, o L5 foi um inibidor mais potente e rápido da neurogênese hipocampal do que a prednisolona, e induziu resistência à insulina da mesma forma que a prednisolona. Além disso, a administração de prednisolona ou L5 aumentou, de forma similar, a expressão de um gene envolvido na degradação da musculatura esquelética induzida por GC, o Murf1, e um gene envolvido na gliconeogênese induzida por GC, o PEPCK.

Em sumário, este estudo mostrou que o L5 dissocia efeitos pleiotrópicos do GR in vivo. Sendo assim, torna se clara a necessidade de caracterização mais aprofundada dos seus efeitos em diferentes tecidos e órgãos, incluindo o tecido ósseo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

- 1- Avaliar se o L5 retém ações anti-inflamatórias in vivo comparado a prednisolona;
- 2- Avaliar os efeitos do L5 na estrutura e biomecânica óssea de camundongos fêmeas adultos C57BL/6J (C57).

2.2 Objetivos específicos

- 1- Analisar a resposta anti-inflamatória de L5 por contagem total de leucócitos comparado a prednisolona – Estudo I;
- 2- Analisar o efeito do tratamento L5 na estrutura do osso cortical e trabecular, por microtomografia computadorizada, e em parâmetros biomecânicos, pelo teste de flexão de três pontos – Estudo II.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e tratamento

Todos os protocolos aplicados ao uso e manuseio de animais estão de acordo com os termos estabelecidos pelo Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas (autorização nº 64, fls. 104, livro 02).

Foram estudados camundongos fêmeas adultos (C57BL/6J) com 210 dias de idade. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP sob o ciclo/escuro de 12h/12h, com acesso à água e a ração *ad libitum*.

3.1.1 Estudo I

Para análise da resposta anti-inflamatória da prednisolona (acetato de prednisolona – Sigma-Aldrich, Germany) foram utilizados 20 camundongos fêmeas C57 com 240 dias de idade. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: (1) CONT= camundongos tratados com salina (n=5); (2) PRED 2,1= camundongos tratados com prednisolona (2,1 mg/kg.pc/dia) (n=5); (3) PRED 5= camundongos tratados com prednisolona (5 mg/kg.pc/dia) (n=5); e (4) PRED 10 = camundongos tratados com prednisolona (10 mg/kg.pc/dia) (n=5). A salina e a prednisolona foram administradas intraperitonealmente uma vez ao dia. Todos os animais foram pesados antes do início do tratamento para verificar a quantidade de salina e de prednisolona a serem administradas. O tratamento dos grupos foi iniciado quando os animais atingiram 240 dias de idade e foram tratados por 7 dias. Ao final desse período, os camundongos foram eutanasiados por exposição a CO₂.

Na análise da resposta anti-inflamatória de L5 os animais foram divididos em quatro grupos e tratados com doses diárias de salina (0,9%) e de L5. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: (1) CONT= camundongos tratados com salina (0,9%), (n=5); (2) L5 2,4= camundongos tratados com L5 (2,4 mg/kg.pc/dia) (n=5); (3) L5 5,4= camundongos tratados com L5 (5,4 mg/kg.pc/dia) (n=5); e (4) L5 10,9 = camundongos tratados com L5 (10,9 mg/kg.pc/dia) (n=5). A salina e a L5 foram administradas intraperitonealmente uma vez ao dia. Todos os animais foram pesados antes do início do tratamento para verificar a quantidade de salina e de L5 a

serem administradas. O tratamento dos grupos foi iniciado quando os animais atingiram 240 dias de idade e foram tratados por 7 dias. Ao final desse período, os camundongos foram eutanasiados por exposição a CO₂.

A eficácia anti-inflamatória da prednisolona e do L5 foi avaliada em modelo de bolsa de ar (*air-pouch model*) em camundongos, como descrito em (KLEMM; HARRIS; PERRETTI, 1995), em colaboração com a Profa. Dra. Suzana Beatriz Veríssimo de Mello, do Departamento de Clínica Médica, FMUSP. As bolsas de ar subcutâneas dorsais foram preparadas pela injeção de 3,0 ml de ar no 1º dia de tratamento e 2,5 ml de ar no 3º e 5º dia. Seis dias após a primeira injeção foi administrado 350 µl de carragenina (6 horas antes da eutanásia). Os animais foram eutanasiados por exposição a CO₂ e as bolsas de ar foram injetadas com 1,5 ml de PBS contendo 50 U/ml de heparina e o líquido injetado coletado por aspiração. O lavado coletado foi centrifugado a 220 x g por 12 min a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado, contendo os leucócitos, foi separado. Após essa separação, o precipitado foi ressuspenso em 1 ml de salina (0,9%). 20 µl dessa diluição foi misturado com 180 µl de solução corante Leishman (*Eosina Azul de Metileno Segundo Leishman*) cedido pela Profa. Dra. Suzana Beatriz Veríssimo de Mello. Foi colocado 10 µl dessa mistura em câmara de Neubauer para contagem total de leucócitos.

A contagem total de leucócitos foi feita nos quatro quadrantes e multiplicada por 10².

Após a análise da resposta anti-inflamatória foi definida a dose de L5 a ser utilizada no Estudo II.

3.1.2 Estudo II

Os animais foram divididos em três grupos e tratados com doses diárias de salina (0,9%), de L5 (2,4mg/kg) e de acetato de prednisolona(2,1mg/kg) (Sigma-Aldrich, Germany). Os animais foram divididos nos seguintes grupos: (1) CONT= camundongos tratados com salina(0,9%), (n=9); (2) L5 2,4= camundongos tratados com L5 (2,4 mg/kg.pc/dia) (n=10); (3) PRED 2,1 = camundongos tratados com acetato de prednisolona (2,1 mg/kg.pc/dia) (n=10). A salina, o L5 e o acetato de prednisolona foram administrados intraperitonealmente uma vez ao dia. Todos os animais foram pesados uma vez por semana para acompanhamento da variação da

massa corporal ao longo do período experimental e para o ajuste das doses de salina, L5 e acetato de prednisolona a serem administradas. O tratamento dos grupos foi iniciado quando os animais atingiram 210 dias de idade e foram tratados por 36 dias. A tabela 1 mostra a divisão dos grupos.

Tabela 1 – Tratamento de salina, L5 e Pred (Estudo II).

Grupos	(1) CONT	(2) L5	(3) PRED
Tratamento	Salina 0.9%	2,4mg/kg	2,1 mg/kg
	n=9	n=10	n=10

3.2 Sacrifício dos animais e coleta de amostras

Os camundongos foram sacrificados por exposição a dióxido de carbono (CO₂) e, em seguida, o sangue foi coletado por punção cardíaca com seringa e agulha heparinizadas com 10 µl de heparina (liquemine 5.000 µl/5ml). Parte do volume do sangue coletado foi imediatamente centrifugada a 3000 rpm à 4 °C, por 10 minutos, para obtenção do plasma, que, em seguida, foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80 °C para posterior análise de cortisol, ACTH e estradiol.

Os fêmures foram coletados e dissecados rapidamente sobre uma superfície resfriada (0-4 °C). Em seguida foram congelados em nitrogênio líquido, e armazenados em freezer -80 °C. O coração, as gorduras axilar (GA), retroperitoneal (GR), os músculos extensor longo dos dedos (ELD), gastrocnêmio (GASTRO) e o reto femoral (RF) foram coletados e congelados para posterior análise. A quarta vértebra lombar (L4) e a tíbia esquerda foram coletadas, dissecadas, armazenadas em álcool 70%, e posteriormente armazenadas em temperatura entre 0-4 °C. O fêmur direito, a tíbia direita e a quinta vértebra lombar (L5) foram coletados, dissecados e armazenados em solução salina 0,9%, e em seguida, congelados.

As carcaças foram congeladas para posterior análise.

3.3 Comprimento corporal e comprimento do fêmur e tibia

Após o sacrifício, o comprimento corporal foi aferido em centímetros (cm), pela medida da distância entre a ponta do focinho até a base da cauda. Mediu-se, também, o comprimento do fêmur e tibia direitos com um paquímetro eletrônico digital (Vonder).

3.4 Medida da composição corporal

A medida da composição corporal foi realizada através da aferição da massa úmida de GR e GA e da aferição da massa úmida e seca dos seguintes músculos esqueléticos: reto femoral (Reto), gastrocnêmio (Gastro) e extensor longo dos dedos (EDL). Foi, também, realizada a medida da massa úmida e seca do coração, para avaliação de hipertrofia cardíaca. Para tanto, após o sacrifício dos animais, a GR, GA, os músculos esqueléticos e o coração foram retirados dos animais e, logo em seguida, pesados em balança analítica de precisão (Denver Instrument M-220D), para aferição de massa úmida. As amostras foram, em seguida, colocadas em estufa a 60 °C, por 48 horas. Após esse período, os músculos foram pesados novamente para a aferição de massa seca. O conteúdo de água foi calculado a partir da diferença entre a massa úmida e a massa seca. As massas do Reto foram divididas pelo comprimento, em centímetros, do fêmur (CF) e as massas do Gastro e EDL foram divididas pelo comprimento da tibia (CT) e, portanto, expressas como $\text{g/mm} \cdot \text{CF} \times 100$ e $\text{g/mm} \cdot \text{CT} \times 100$, respectivamente. As massas das gorduras axilar e retroperitoneal e do coração foram divididas pela massa em gramas do animal, sendo expressas como $\text{g/g} \cdot \text{PC} \times 100$.

3.5 Microtomografia computadorizada (μCT) em duas e três dimensões (2D e 3D)

O fêmur direito e a L5 foram dissecados e mantidos em salina -20° C até o momento das análises. Parâmetros em 2D e 3D dos ossos foram obtidos através de um Microtomógrafo Skyscan 1172 (Desktop X-ray microtomograph), e analisados com o auxílio do programa CT-Analyser (versão 1.10, Skyscan, Artselaar, Bélgica). A região de interesse (*region of interest-ROI*) dos fêmures foi padronizada com base

no comprimento do osso. Para a análise de osso trabecular, inicialmente, o comprimento total de cada fêmur foi dividido em quatro partes iguais. Em seguida, o comprimento do quarto distal foi dividido por 1.5, onde a parte proximal desta divisão foi selecionada para análise (ROI). Este procedimento foi adotado a fim de excluir a lâmina epifisial das análises (Fig. 3A)

Os parâmetros trabeculares analisados foram: volume trabecular (BV/TV), espessura trabecular (Tb.Th), separação trabecular (Tb.Sp), número de trabéculas (Tb.N), fator do padrão trabecular ósseo (Tb.Pf), um índice de conectividade trabecular; índice do modelo estrutural (SMI), que indica a prevalência de trabéculas ósseas em forma de “rods” (cilíndricas) e “plates” (achatadas) e o grau de anisotropia (DA).

O Tb.Pf reflete a conectividade trabecular, sendo que baixos índices, indicam melhor conectividade da estrutura trabecular (HAHN et al., 1992).

O SMI indica a prevalência de trabéculas ósseas em forma de “rods” (cilíndricas) e “plates” (achatadas, em forma de placas). Este parâmetro é de suma importância na análise da estrutura trabecular, uma vez que a deterioração do osso trabecular, em função do envelhecimento ou doença, é caracterizada pela conversão de trabéculas achatadas para cilíndricas. Assim sendo, o predomínio de trabéculas cilíndricas resulta em um maior valor de SMI e em trabéculas menos resistentes ao *stress* mecânico (HILDEBRAND; RUEGSEGG, 1997).

O DA é a medida da simetria em 3 dimensões e reflete a orientação das trabéculas ósseas. No caso do osso, que é um material não contínuo, repleto de estruturas (trabéculas) orientadas em diferentes direções, a mensuração do DA reflete a capacidade de reagir diferentemente a cargas vindas de sentidos diferentes. Quanto menos simétrico o objeto, maior o DA. Com relação ao osso, quanto maior o DA, maior será o número de trabéculas orientadas em diferentes direções e, portanto, melhor será a sua resposta a diferentes vetores de forças mecânicas.

Para a análise do osso cortical, parâmetros em 2D do fêmur foram obtidos e analisados conforme descrito anteriormente. Primeiramente, o osso foi dividido em metades proximal e distal, em seguida, a metade distal foi subdividida em quatro partes iguais. Por fim, o segundo quarto proximal foi selecionado para análise (ROI) (Fig 5B).

Os parâmetros corticais analisados foram: área perióstica - área total delimitada pelo perióstio, inclui a área medular e cortical (T.Ar), perímetro do perióstio (T.Pm), área da cortical (B.Ar), área medular (MA), perímetro do endóstio (EP), espessura cortical (Ct.Th) e porosidade da cortical (Po).

Figura 5 - Esquema de seleção das áreas de interesse do fêmur (quadriculado) e vértebra.

A. Osso trabecular. **B.** Osso cortical. **C.** Osso trabecular e cortical.

3.6 Teste biomecânico do fêmur e tíbia

Os fêmures e as tíbias direitos foram dissecados e mantidos em salina a 20°C até o momento das análises. Parâmetros biomecânicos do fêmur e da tíbia dos animais controles e tratados com GC foram obtidos pelo Ensaio de Flexão de Três Pontos (EFTP), realizado em um sistema para teste de materiais Instron, modelo 3344 (Instron Corporation, MA, USA). Durante o ensaio, as extremidades dos fêmures e tíbias eram apoiadas em dois roletes, posicionados sobre um suporte, sendo a distância entre os apoios variadas, conforme o tamanho dos ossos (conseqüência das diferentes idades). Uma força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso no ponto médio entre os dois apoios, no sentido ântero-posterior no fêmur e no sentido látero-medial na tíbia, por uma haste cilíndrica a uma velocidade constante de 05 cm/min até o momento de ruptura do osso (Fig. 6).

Figura 6 – Foto do osso no equipamento para a realização do teste de flexão de três pontos.

A força aplicada e o deslocamento da haste cilíndrica foram monitorados e registrados através de um software próprio do equipamento (Bluehill lite, versão 2.25). Foram avaliados os seguintes parâmetros biomecânicos: Carga máxima (em N), que corresponde à maior força aplicada durante o ensaio, referindo-se à força máxima à qual o osso é capaz de resistir; Resiliência (J), que é a propriedade do osso de retornar à sua forma original após uma deformação elástica; Ductibilidade (em mm), que corresponde à quantidade deformação que o osso atinge após a fase a elástica e início da sua quebra; Energia em quebra (J), que corresponde à energia produzida pelo Trabalho exercido sobre durante a sua ruptura; Módulo Young (N/mm^2), que corresponde à rigidez óssea.

3.7 Análise estatística

A significância estatística da diferença entre os valores médios dos grupos para qualquer parâmetro foi testada pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo pós teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Para a realização dos testes estatísticos, foi utilizado o *software* Instat Instant Biostatistics e para a construção de gráficos foi utilizado o *software* Prism (ambos provenientes da GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Estudo I- Resposta anti-inflamatória de L5 e prednisolona

A análise da resposta anti-inflamatória de prednisolona e L5 por contagem total de leucócitos mostrou que, ao final do tratamento, as diferentes doses de prednisolona e L5 causaram diminuição importante no número de leucócitos. Os grupos Pred 2,1, Pred 5 e Pred 10 apresentaram diminuições de 65%, 73% e 84% ($p<0,05$), respectivamente, e os grupos L5 2,4, L5 5,4 e L5 10,9 apresentaram diminuições de 71%, 80% e 61% ($p<0,05$), respectivamente, em relação ao grupo controle (Fig. 7). Não houve diferença entre os efeitos da Pred e L5, bem como entre as diferentes doses dessas drogas, na redução do número de leucócitos. A partir deste estudo, foi selecionada a dose de 2,4 mg/kg.pc/dia de L5 e 2,1mg/kg.pc/dia de prednisolona, já que o efeito anti-inflamatório foi similar.

Figura 7 – Total de leucócitos ao final do tratamento com L5 e Pred (Estudo I)

Camundongos fêmeas de 240 dias de idade foram agrupados em CONT (controle; n=5), tratados com salina; PRED 2,1 (n=5), tratados com 2,1 mg/kg.pc/dia de prednisolona; PRED 5 (n=5), tratados com 5 mg/kg.pc/dia de prednisolona; PRED 10 (n=5), tratados com 10 mg/kg.pc/dia de prednisolona; L5 2,4 (n=5), tratados com 2,4 mg/kg.pc/dia de L5; L5 5,4 (n=5), tratados com 5,4 mg/kg.pc/dia de L5; L5 10,9 (n=5), tratados com 10,9 mg/kg.pc/dia de prednisolona, respectivamente. Os animais foram tratados por 7 dias através de injeções únicas i.p. A contagem do total de leucócitos foi feita a partir de 10 µl de solução. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=5/grupo). * $p<0,05$, *versus* CONT.

4.2 Estudo II

4.2.1 Massa corporal

A Fig. 8 mostra que os animais tratados com 2,1 mg/kg.pc/dia de Pred apresentaram massa corporal significativamente menor do que os animais controle e do que os animais tratados com 2,4 mg/kg.pc/dia de L5, desde a primeira semana de tratamento. A massa corporal diminuiu 3% na 1ª, 4% na 2ª, 8% na 3ª, 9% na 4ª, 10% na 5ª e 12% na 6ª semana em relação ao CONT e 4% na 1ª, 7% na 2ª, 11% na 3ª, 10% na 4ª, 10% na 5ª e 11% na 6ª semana em relação ao L5.

Por outro lado, os animais tratados com L5 apresentaram praticamente a mesma massa corporal dos animais CONT. Observou-se, entretanto, uma maior massa corporal (3%) nos animais tratados com L5, em relação aos animais CONT, na segunda e terceira semanas de tratamento.

Figura 8 – Efeito do L5 e da Pred na massa corporal dos animais

A medida da massa corporal foi iniciada quando os animais tinham 210 dias de idade, sendo pesados semanalmente. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM ($n=9-10$ /grupo). * $p<0,01$, todos *versus* PRED, + $p<0.01$ L5 *versus* CONT.

4.2.3 Parâmetros cardíacos

A Fig. 9 mostra que os animais tratados com L5 e com Pred apresentaram hipertrofia cardíaca, evidenciada pelo aumento da massa seca do coração. A massa úmida e seca do coração dos animais tratados com Pred de 210 de idade (36 dias de tratamento) foram 12% ($p<0,05$) e 15 % ($p<0,01$) maiores em relação aos animais controle (Fig. 9 A e B). A massa úmida e seca do coração dos animais tratados com L5 de 210 de idade (36 dias de tratamento) foram 16% e 15 % ($p<0,05$) maiores em relação aos animais controle (Fig. 9 A e B).

Figura 9 - Efeito do L5 e da Pred nos parâmetros cardíacos dos animais.

Animais de 210 dias de idade foram tratados diariamente com L5 e prednisolona por 36 dias. CONT=animais controle tratados com salina 0,9%; PRED=animais tratados com 2,1mg/kg de prednisolona; L5=animais tratados com 2,4mg/kg de L5. (A) Massa úmida do coração. (B) Massa seca do coração. Os parâmetros são expressos em mg de coração/g de massa corporal x 100. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM ($n=8-10$ /grupo). ^x $p<0,05$, *versus* CONT; ^{xx} $p<0,01$, *versus* CONT

4.2.4 Massa das gorduras axilar e retroperitoneal

Não houve diferença significativa após 36 dias de tratamento no conteúdo de gordura axilar (Fig. 10A) e gordura retroperitoneal (Fig. 10B) entre os animais controle e os animais tratados com L5 e Pred.

Figura 10 – Efeito do tratamento de L5 e da Pred no conteúdo de gordura axilar e retroperitoneal dos animais.

Animais de 210 dias de idade foram tratados diariamente com L5 e prednisolona por 36 dias. CONT=animais controle tratados com salina 0,9%; PRED=animais tratados com 2,1mg/kg de prednisolona; L5=animais tratados com 2,4mg/kg de L5. (A) Massa de gordura axilar. (B) Massa de gordura retroperitoneal. As massas de gordura axilar e gordura retroperitoneal referem-se à massa úmida e são expressas em miligramas (mg) de gordura por gramas (g) de massa corporal (PC) x 100. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=8-10/grupo).

4.2.5 Massa seca e massa úmida dos músculos esqueléticos

A Fig. 11 mostra que ao final de 36 dias de tratamento, os animais tratados com L5 não apresentaram alteração significativa na massa úmida e seca dos músculos esqueléticos comparado aos animais controle. Já os animais tratados com Pred apresentaram perdas significativas de massa muscular. A massa úmida e seca do músculo reto femoral dos animais de 210 de idade foram 16% ($p<0,05$) e 13 % ($p<0,01$) menores em relação aos animais controle e 19% ($p<0,05$) e 20 % ($p<0,001$) menores em relação aos animais tratados com L5 (Fig. 9 A e B). A massa úmida e seca do músculo gastrocnêmio foram 18% e 16 % ($p<0,0001$) menores em relação aos animais controle e 15% e 13% ($p<0,0001$) menores em relação aos animais tratados com L5 (Fig. 9 C e D). A massa úmida do músculo extensor longo dos dedos dos animais tratados com Pred foi 20% ($p<0,05$) menor em relação aos animais controle e 25% ($p<0,01$) menor em relação aos animais tratados com L5 (Fig. 9 E). Em relação à massa seca do músculo EDL, não houve diferenças significativas entre os animais controle e os tratados com Pred e L5 (Fig. 9 F).

Figura 11 - Efeito do tratamento de L5 e da Pred na massa úmida e seca dos músculos esqueléticos dos animais

Animais de 210 dias de idade foram tratados diariamente com L5 e prednisolona por 36 dias. CONT=animais controle (salina 0,9%); PRED=animais tratados com 2,1mg/kg de prednisolona; L5=animais tratados com 2,4mg/kg de L5. (A e B) Massa úmida e seca do reto. (C e D) Massa úmida e seca do Gastro. (E e F) Massa úmida e seca do EDL. EDL = extensor longo dos dedos, Gastro = gastrocnêmio, Reto = reto femoral. As medidas foram expressas em miligramas (mg) de músculos (reto femoral) por milímetros (mm) do comprimento do osso fêmur (CF) x 100, em miligramas (mg) de músculos (gastrocnêmio e extensor longo dos dedos) por milímetros (mm) do comprimento do osso tibia (CT) x 100. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=8-10/grupo). ^xp<0,05, *versus* CONT; ^{*}p<0,05, *versus* PRED; ^{xx}p<0,01, *versus* CONT; ^{xxx}p<0,001, *versus* CONT; ^{***}p<0,001, *versus* PRED.

4.2.6 Comprimento corporal

A Fig. 12 mostra que o tratamento com L5 e Pred não alterou o comprimento corporal dos animais.

Figura 12 – Efeito do tratamento de L5 e Pred no comprimento corporal dos animais.

Animais de 210 dias de idade foram tratados diariamente com L5 e prednisolona por 36 dias. CONT=animais controle (salina 0,9%); PRED=animais tratados com 2,1mg/kg de prednisolona; L5=animais tratados com 2,4mg/kg de L5. O comprimento corporal refere-se à medida linear desde o focinho até a base da cauda do animal. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=8-10/grupo).

4.2.7 Comprimento do fêmur e da tíbia

A Fig. 13 mostra que, ao final do período de tratamento, os animais tratados com L5 e Pred não apresentaram alteração significativa quanto ao comprimento longitudinal do fêmur (Fig. 13A) e da tíbia (Fig. 13B).

Figura 13 – Efeito do L5 e Pred no comprimento do fêmur e tíbia.

Animais de 210 dias de idade foram tratados diariamente com L5 e prednisolona por 36 dias. CONT=animais controle (salina 0,9%); PRED=animais tratados com 2,1mg/kg de prednisolona; L5=animais tratados com 2,4mg/kg de L5. (A) Comprimento longitudinal do fêmur e da (B) tíbia dos animais, medido através de paquímetro digital. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=8-10/grupo).

4.2.8 Microtomografia computadorizada em 3D: análise do osso trabecular da metáfise distal do fêmur

Através da microtomografia em 3 dimensões, observamos que o tratamento com L5 e Pred afetou de forma importante alguns parâmetros do osso trabecular da metáfise distal do fêmur. Observamos, nos animais tratados com Pred uma diminuição de 8% ($p<0,01$) no Tb.Sp e 25% ($p<0,05$) no DA. Nos animais tratados com L5 houve uma diminuição de 55% ($p<0,05$) no BV/TV, 11% ($p<0,0001$) no Tb.Sp e 28% ($p<0,05$) no DA.

Figura 14 – Análise por μ CT do efeito do tratamento de L5 e da Pred no osso trabecular femoral dos animais

Animais de 210 dias de idade foram tratados diariamente com L5 e prednisolona por 36 dias. CONT=animais controle (salina 0,9%); PRED=animais tratados com 2,1mg/kg de prednisolona; L5=animais tratados com 2,4mg/kg de L5. (A) BV/TV: Volume ósseo/Volume trabecular em %; (B) Tb/Pf: Fator padrão de osso trabecular em μ m; (C) SMI: Índice de modulo estrutural; (D) Tb.Th: Espessura trabecular em μ m; (E) Tb.N: Número de trabéculas em μ m; (F) Tb.Sp: Separação trabecular em μ m; (G) DA: Grau de anisotropia e (H) Po (tot)= porosidade total em %. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=8-10/grupo). ^xp<0,05, versus CONT; ^{xx}p<0,01, versus CONT; ^{xxx}p<0,001, versus CONT.

4.2.9 Microtomografia computadorizada em 2D: análise do osso cortical da diáfise do fêmur

Através da microtomografia computadorizada em 2D da diáfise do fêmur, observamos que o osso cortical não foi afetado pelo tratamento de 36 dias com doses de L5 e Pred.

Figura 15 – Análise por μ CT do efeito do tratamento de L5 e da Pred no osso cortical da diáfise do fêmur dos animais

Animais de 210 dias de idade foram tratados diariamente com L5 e prednisolona por 36 dias. CONT=animais controle (salina 0,9%); PRED=animais tratados com 2,1mg/kg de prednisolona; L5=animais tratados com 2,4mg/kg de L5. (A) T.Ar (área perióstica em μm^2), (B) T.Pm (perímetro do perióstio em μm), (C) B.Ar (área da cortical em μm^2). (D) MA (área medular em μm^2), (E) EP (perímetro do endóstio em μm), (F) Ct.Th (espessura da cortical em μm) e (G) Po (porosidade total em %). Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=8-10/grupo).

4.2.10 Microtomografia computadorizada em 3D: análise do osso trabecular da quinta vértebra lombar (L5)

Observamos na Fig. 16 que, através da microtomografia computadorizada em 3D da quinta vértebra lombar (L5), nenhum dos parâmetros do osso trabecular foi alterado pelo tratamento de 36 dias com doses de L5 e Pred.

Figura 16 – Análise por μ CTdo efeito do tratamento de L5 e da Pred no osso trabecular da vértebra l5 dos animais.

Animais de 210 dias de idade foram tratados diariamente com L5 e prednisolona por 36 dias. CONT=animais controle (salina 0,9%); PRED=animais tratados com 2,1mg/kg de prednisolona; L5=animais tratados com 2,4mg/kg de L5. (A) BV/TV: Volume ósseo/Volume trabecular em %; (B) Tb/Pf: Fator padrão de osso trabecular em μ m; (C) SMI: Índice de modulo estrutural; (D) Tb.Th: Espessura trabecular em μ m; (E) Tb.N: Número de trabéculas em μ m; (F) Tb.Sp: Separação trabecular em μ m; (G) DA: Grau de anisotropia e (H) Po (tot)= porosidade total em %. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=8-10/ grupo).

4.2.11 Microtomografia computadorizada em 2D: análise do osso cortical da quinta vértebra lombar (I5)

Através da microtomografia computadorizada em 2D da cortical da quinta vértebra lombar, observamos que o osso cortical dos animais não foi afetado pelo tratamento com Pred e L5 (Fig. 17).

Figura 17 – Análise por μ CT do efeito do tratamento de L5 e da Pred no osso cortical da vértebra L5 dos animais.

Animais de 210 dias de idade foram tratados diariamente com L5 e prednisolona por 36 dias. CONT=animais controle (salina 0,9%); PRED=animais tratados com 2,1mg/kg de prednisolona; L5=animais tratados com 2,4mg/kg de L5. (A) T.Ar (área perióstica em μm^2), (B) T.Pm (perímetro do periosteio em μm), (C) B.Ar (área da cortical em μm^2). (D) MA (área medular em μm^2), (E) EP (perímetro do endóstio em μm), (F) Ct.Th (espessura da cortical em μm) e (G) Po (porosidade total em %). Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=8-10/grupo).

4.2.12 Teste biomecânico do fêmur e tíbia

Através do teste biomecânico de flexão de três pontos do fêmur e da tíbia direitos, observamos que os tratamentos com Pred e L5 não alteraram, significativamente, os parâmetros biomecânicos analisados (Fig. 18).

Figura 18 – Efeito do tratamento de L5 e da Pred em parâmetros biomecânicos do fêmur dos animais

Animais de 210 dias de idade foram tratados diariamente com L5 e prednisolona por 36 dias. CONT=animais controle (salina 0,9%); PRED=animais tratados com 2,1mg/kg de prednisolona; L5=animais tratados com 2,4mg/kg de L5. (A) Carga máxima fêmur direito (N); (B) Módulo Young fêmur direito (N/mm²); (C) Energia em quebra fêmur direito (J). Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=8-10/grupo).

Através do teste biomecânico de flexão de três pontos da tíbia direita, observamos que o tratamento com Pred alterou um parâmetro biomecânico, mas não o L5. Os animais tratados com Pred tiveram uma redução de 42% ($p < 0,05$) na energia em quebra em relação aos animais controle.

Figura 19 – Efeito do tratamento de L5 e da Pred em parâmetros biomecânicos da tíbia dos animais

Animais de 210 dias de idade foram tratados diariamente com L5 e prednisolona por 36 dias. CONT=animais controle (salina 0,9%); PRED=animais tratados com 2,1mg/kg de prednisolona; L5=animais tratados com 2,4mg/kg de L5. (A) Carga máxima tíbia direita (N); (B) Resiliência tíbia direita (J); (C) Energia em quebra tíbia direita (J); (D) Ductibilidade tíbia direita (mm). Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM ($n=8-10/\text{grupo}$), * $p<0,05$, *versus* CONT.

5 DISCUSSÃO

Os GCs são amplamente usados no tratamento de doenças auto-imunes e inflamatórias (SMITH; FRENKEL, 2005; VAN STAA et al., 2000), em função dos seus potentes efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores. No entanto, o tratamento contínuo com GCs pode acarretar vários efeitos colaterais, tais como osteoporose, retardo no crescimento em crianças, hipertensão, inibição da cicatrização e distúrbios metabólicos (BUTTGEREIT et al., 2005; POPP et al., 2005; SMITH; FRENKEL, 2005; STANBURY; GRAHAM, 1998; VAN STAA et al., 2000). Esses efeitos adversos limitam, de forma importante, a terapia prolongada com GCs.

Diante disso, nos últimos anos, tem se desenvolvido novos compostos que visam manter os efeitos desejáveis antiinflamatórios e imunomoduladores dos glicocorticóides em maior medida do que as ações biológicas indesejáveis. Esses compostos são chamados de moduladores seletivos dos receptores de glicocorticóides (SGRMs) e baseiam-se em um novo conceito terapêutico. Este conceito estabelece que diferentes ligantes para receptores nucleares podem exibir seletividade por ações fenotípicas em função de especificidade por diferentes subtipos de receptores ou em função do recrutamento diferenciado de cofactores (fatores de transcrição) (COGHLAN et al., 2003; SCHACKE et al., 2007; WEBB et al., 2003)

Um grupo de novos compostos de arilpirazola foi identificado como potenciais SGRMs, conforme descritos em Shah e Scanlan (2004). Os efeitos pleiotrópicos desses agentes de arilpirazola foram caracterizados em sistemas baseados em cultura de células (WANG et al., 2006). Dentre os potenciais SGRMs - arilpirazola estudados, o composto L5 exibiu um padrão conhecido de efeitos anti-inflamatórios e um perfil reduzido de efeitos colaterais em células responsivas a GCs.

No presente estudo, analisou-se o efeito do L5 na resposta anti-inflamatória induzida por carragenina em bolsa de ar, através da contagem total de leucócitos; o efeito do tratamento com L5 na estrutura do osso cortical e trabecular, por microtomografia computadorizada; e em parâmetros biomecânicos, pelo teste de flexão de três pontos.

O processo inflamatório é uma reação do organismo a uma infecção ou lesão dos tecidos e está presente em várias doenças, como a asma crônica, artrite reumatóide, doenças inflamatórias intestinais e doenças auto-imunes, entre outras.

Em um processo inflamatório, há um acúmulo de células provenientes do sistema imunológico (leucócitos, macrófagos e linfócitos) na região atingida, com dor localizada mediada por certas substâncias químicas produzidas pelo organismo. A região atingida fica avermelhada e quente. Isso ocorre devido a um aumento do fluxo de sangue no local. No processo, os leucócitos destroem o tecido danificado e enviam sinais aos macrófagos, que ingerem e digerem os antígenos e o tecido morto (CHEN; NUÑEZ, 2010; LAU et al., 2005). Os leucócitos representam um importante papel tanto nos processos inflamatórios agudos quanto nos processos inflamatórios crônicos. Por isso, muita atenção tem sido atribuída a modelos animais de inflamação aguda que permitam a quantificação e estimativa da migração de leucócitos para a região inflamada (SEDGWICK; LEES, 1986).

O modelo de inflamação na bolsa de ar permite que a migração celular, mediadores inflamatórios e extravasamento plasmático sejam quantitativamente mensurados após um processo inflamatório agudo, induzido por diferentes agentes irritantes aplicados no interior da cavidade. Esse modelo simula o processo inflamatório na cavidade sinovial (CHIBA; GOTO; SHIROTA, 1991; SEDGWICK et al., 1983; SEDGWICK et al., 1985; SEDGWICK; LEES, 1986, 1986).

O processo inflamatório induzido pela carragenina é um processo agudo, não imune, altamente reproduzível e bem estudado. A carragenina quando injetada subcutaneamente na bolsa de ar no animal, é capaz de produzir os sinais cardinais da inflamação – edema (tumor), eritema (rubor) e hiperalgesia (maior sensibilidade a estímulos dolorosos) - que se desenvolvem rapidamente em decorrência da ação de vários mediadores pró-inflamatórios derivados do plasma ou das células envolvidas na resposta inflamatória (HAMBLETON; MILLER, 1989; KLEMM; HARRIS; MORRIS, 2003; PERRETTI, 1995; RULL et al., 2003).

Para a análise da resposta anti-inflamatória neste estudo, foram utilizados animais de 240 dias de idade, com doses de Pred (2,1 mg/kg PC/dia, 5 mg/kg PC/dia e 10 mg/kg PC/dia) e doses equimolares de L5 (2,4 mg/kg.pc/dia, 5,4 mg/kg.pc/dia e 10,9 mg/kg.pc/dia, respectivamente) por 7 dias. Após o tratamento, verificou-se que o tratamento com Pred reduziu, de forma significativa, o número total de leucócitos. Essa diminuição desempenha um importante papel na regulação da resposta inflamatória (PENIDO et al., 2006). Com isso, verifica-se a importante atuação anti-inflamatória do GC na migração dos leucócitos, evitando a aproximação desses na área lesada. Todo esse processo acarreta uma diminuição da

permeabilidade do endotélio capilar, diminuindo a formação do edema (SILVA, 2006). O L5 apresentou efeitos similares ao da prednisolona e reduziu de maneira significativa os parâmetros inflamatórios como o número total de leucócitos. Esse composto demonstrou atividade anti-inflamatória, reduzindo a migração celular de leucócitos induzidos pela carragenina em camundongos. Considerando-se que 2,1 mg/kg.pc/dia de Pred e 2,4 mg/kg.pc/dia de L5 promoveram o mesmo efeito no número total de leucócitos, selecionamos tais doses para a avaliação do efeito da Pred e L5 em parâmetros ósseos (Estudo II).

Uma vez selecionada a dose de Pred e L5 (no estudo I), em um segundo estudo (estudo II), comparamos o efeito do tratamento com Pred e L5 na estrutura do osso cortical e trabecular, por microtomografia computadorizada; e em parâmetros biomecânicos, pelo teste de flexão de três pontos, em camundongos de 210 dias de idade tratados com doses diárias de 2,1 mg/kg.pc/dia de Pred e 2,4 mg/kg.pc/dia de L5 por 36 dias. Considerando-se que os GCs também afetam o tecido muscular, o tecido adiposo e o crescimento ósseo e, ainda, que a composição corporal pode afetar a massa e estrutura ósseas (CRABTREE et al., 2004), inicialmente, caracterizamos parâmetros antropométricos dos animais, como comprimento corporal e do fêmur e tíbia, massa corporal e massa de músculos esqueléticos e de coxins adiposos.

Há evidências na literatura de que os GCs inibem o crescimento longitudinal ósseo, atuando nas lâminas epifisiais (LONGUI, 2007). Entretanto, no presente estudo, o tratamento com L5 e Pred não alteraram o comprimento corporal dos animais, bem como o comprimento do fêmur e da tíbia. Isso provavelmente ocorreu pelo fato dos animais deste estudo apresentarem 210 dias de idade no início do estudo. Nesta idade, o crescimento longitudinal ósseo é pequeno e as lâminas epifisiais apresentam-se bastante reduzidas em espessura (LUI; BARON, 2011; LUI; NILSSON; BARON, 2011).

Observamos, entretanto, que o tratamento com Pred causou redução na massa corporal, da primeira à última semana de tratamento, enquanto que o L5 não afetou a massa corporal em relação aos animais controles. Esse efeito da Pred na massa corporal foi também observado em outros estudos com roedores (MA et al, 2003). No presente estudo, esta redução provavelmente se explica pelo efeito deletério da prednisolona, e não do L5, na massa muscular. Vimos, como esperado (GILSON et al., 2007), que a Pred causou redução na massa úmida e/ou seca de

praticamente todos os músculos esqueléticos avaliados neste estudo. Esse é um achado bastante interessante e confere ao L5 o potencial de ser utilizado como droga imunossupressora em doenças autoimunes que comprometem a função muscular como, por exemplo, a miastenia grave, síndrome miastênica de Lambert-Eaton, poliomiosite e dermatomiosite. Em todas essas doenças, o uso de corticoide é, geralmente, a terapia central, que tem, como objetivo, deprimir o sistema imunológico para controlar a sua ação autoimune e destrutiva. Por outro lado, os GCs são deletérios ao tecido muscular, uma vez que produzem redução da massa muscular por inibição da síntese protéica e aumento do catabolismo proteico, com balanço nitrogenado negativo (BAILEY; MITCH, 2000). Portanto, no caso de doenças autoimunes que comprometem a função muscular, seria de grande valia o desenvolvimento de análogos de GCs que mantivessem a sua ação anti-inflamatória e imunossupressora, ao mesmo tempo em que poupasse o tecido muscular da sua ação deletéria. Nesse sentido, o potencial imunossupressor do L5 merece ser investigado.

Por outro lado, vimos que tanto o tratamento com prednisolona como com L5 não alteraram a massa de gordura retroperitoneal e axilar. Houve apenas uma tendência de aumento do conteúdo de gordura axilar nos animais tratados com Pred. Sabe-se que as ações dos GCs na gordura corporal são complexas. Os GCs aumentam o apetite e a ingestão de calorias, provavelmente por induzir a síntese de neuropeptídeo Y no hipotálamo (KUO et al., 2008). Os GCs também aumentam a diferenciação de pré-adipócitos para adipócitos e estimulam a lipogênese, por aumentar a atividade de enzimas lipogênicas (*adipocyte lipoprotein lipase* e *glucose-6-phosphate dehydrogenase*). Estas ações variam em diferentes regiões do corpo. De qualquer forma, no geral, o excesso de GCs resulta em obesidade, com uma distribuição peculiar de gordura no abdômen, tronco, e face, mas não nas extremidades. Como o cortisol também induz a síntese de leptina nos adipócitos (SUKUMARAN et al., 2011), o ganho de gordura é eventualmente limitado pela ação do feedback negativo que a leptina exerce nos centros de apetite do hipotálamo (YANG et al., 2007). É possível que, no presente estudo, a leptina tenha promovido esse efeito. Uma avaliação mais detalhada do conteúdo corporal de gordura, dos níveis séricos de leptina e da ingestão alimentar se faz necessária para o entendimento do efeito da prednisolona e L5 no conteúdo corporal de gordura do nosso modelo experimental.

Foi interessante observar que o L5 e a prednisolona promoveram aumento significativo da massa seca do coração, o que pode refletir hipertrofia cardíaca (EVANS, 1994; GOODWIN et al., 2010; ISRAEL et al., 1993; SOUVEREIN et al., 2004; SAINTE-MARIE et al., 2007). De acordo com Roy et al. (2009), o excesso de GCs estimula a sinalização da angiotensina II provocando hipertrofia cardíaca, fibrose do miocárdio e disfunção ventricular. Além disso, De et al. (2011), relata que o excesso de GCs altera a expressão de proteínas de Ca^{2+} e de manipulação de Ca^{2+} acarretando uma disfunção no miocárdio.

Após essas análises para determinação da composição corporal, realizamos o ensaio por microtomografia computadorizada, para verificação da estrutura do osso cortical e trabecular do fêmur e do corpo vertebral de L5 dos animais.

A microtomografia computadorizada pode ser usada para medir tanto a quantidade e qualidade do osso (ISSEVER, 2003). Em nosso estudo, verificamos que o osso trabecular femoral dos animais foi sensível ao tratamento com L5 e Pred em alguns parâmetros. Os animais tratados com L5 apresentaram diminuição de 55% no BV/TV e 28% no DA. Esses parâmetros estruturais do osso trabecular femoral sugerem uma deterioração da sua estrutura. A redução do BV/TV (volume trabecular) reflete uma redução na massa óssea. Há evidências de que a massa óssea correlaciona-se positivamente com a resistência óssea (CORTET et al., 2004, CORTET; MARCHANDISE, 2001). Por outro lado, a redução do DA representa uma alteração na qualidade óssea. O DA mensura a orientação anisotrópica das trabéculas ósseas. Uma redução desse parâmetro reflete uma diminuição da capacidade do osso de resistir ao estresse mecânico vindo de diferentes direções. De acordo com Goldstein et al. (1993), a orientação e organização das trabéculas garante resistência mecânica. Por outro lado, o L5 e a Pred acarretaram uma diminuição de 11% e 8% no Tb.Sp, respectivamente. Este efeito positivo da Pred no osso trabecular do fêmur está em desacordo com o esperado e com os dados da literatura (ELVY SUHANA et al., 2011). No caso do L5, a sua ação de reduzir o Tb.Sp está em desacordo com a redução do BV/TV. Assim sendo, estes dados necessitam ser reavaliados.

Por outro lado, a microtomografia computadorizada em 2D da diáfise do fêmur, demonstrou que o osso cortical não foi afetado pelo tratamento de 36 dias com doses de L5 e Pred. Com relação a estrutura óssea trabecular e cortical do

corpo vertebral L5 dos animais, verificamos que também não houve diferença em nenhum dos parâmetros após o tratamento com L5 e Pred.

A análise da função óssea, através do teste biomecânico de três pontos, possibilita investigar a função de um segmento ósseo, uma vez que permite medidas diretas da capacidade de um determinado osso de resistir ao stress mecânico. Com relação aos parâmetros biomecânicos dos ossos dos animais, observamos que a Pred, mas não o L5, causou redução da energia em quebra na tíbia, o que reflete aumento da fragilidade óssea e menor resistência mecânica (MCILWAIN, 2003). Este resultado corrobora os efeitos deletérios dos GCs na biomecânica óssea (CORTET et al., 2001; MANELLI; GIUSTINA, 2000). No presente estudo, a maior fragilidade óssea observada nos animais tratados com Pred provavelmente se explica por alteração na qualidade do tecido ósseo, uma vez que a Pred não alterou o volume trabecular (massa óssea). Não foram observadas diferenças significativas nos outros parâmetros biomecânicos analisados do fêmur e da tíbia.

Em resumo, o presente estudo demonstrou que o L5 apresentou efeito similar ao da prednisolona quanto à ação anti-inflamatória (o que é positivo) e quanto à ação no coração, promovendo hipertrofia cardíaca (o que é deletério). Por outro lado e diferentemente da prednisolona, o L5 não foi deletério à massa muscular esquelética. Vimos, também, que a prednisolona e L5 tiveram efeitos diferentes na estrutura óssea trabecular do fêmur e que os efeitos do L5 foram mais deletérios que os da prednisolona no osso trabecular. Além disso, o L5 não teve nenhum efeito sobre os parâmetros biomecânicos, enquanto a prednisolona reduziu a energia em quebra.

6 CONCLUSÃO

- Os achados deste estudo sugerem que o L5 tem o mesmo potencial anti-inflamatório da prednisolona, mas que detém ações seletivas, em relação a ela, no tecido muscular e ósseo;
- contrariamente à prednisolona, o L5 não se mostrou deletério à massa muscular, mas apresentou efeitos divergentes em relação à essa droga na estrutura e biomecânica ósseas;
- esses achados fazem do L5 uma droga com potencial de ser utilizada em doenças autoimunes que afetem o tecido muscular, como por exemplo, a miastenia grave, síndrome miastênica de Lambert-Eaton, poliomiosite e dermatomiosite.

REFERÊNCIAS*

- ANDERSON, D. M.; MARASKOVSKY, E.; BILLINGSLEY, W. L.; DOUGALL, W. C.; TOMETSKO, M. E.; ROUX, E. R.; TEEPE M. C.; DUBOSE, R. F.; COSMAN. D.; GALIBERT. L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. **Nature**, v. 309, n. 6656, p. 175-179, 1997.
- BAILEY, J. L.; MITCH, W. E. Mechanisms of protein degradation: what do the rat studies tell us. **J. Nephrol.**, v. 13, n. 2, p. 89-95, 2000.
- BAMBERGER, C. M.; BAMBERGER, A. M.; DE CASTRO, M.; CHROUSOS, G. P. Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. **J. Clin. Invest.**, v. 95, p. 2435-2441, 1995.
- BARON, R. Anatomy and Biology of bone matrix and cellular elements. In: MURRAY, J.; FAVUS, M. D. **Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism**. Washington. The American Society for Bone and Mineral Research. p. 1-8, 2003.
- BOLDIZSAR. F.; TALABER, G.; SZABO, M.; BARTIS, D.; PALINKAS, L.; NEMETH, P.; BERKI, T. Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. **Immunobiology**. v. 215, p. 521-526, 2010.
- BONADONNA, S.; BURATTIN, A.; NUZZO, M.; BUGARI, G.; ROSEI E. A.; VALLE, D.; IORI, N.; BILEZIKIAN, J. P.; VELDHIJS, J. D.; GIUSTINA, A. Chronic glucocorticoid treatment alters spontaneous pulsatile parathyroid hormone secretory dynamics in human subjects. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 152, n. 2, p.199-205, 2005.
- BRIASSOULIS, G.; DAMJANOVIC, S.; XEKOUKI, P.; LEFEBVRE, H.; STRATAKIS, C. A. The glucocorticoid receptor and its expression in the anterior pituitary and the adrenal cortex: a source of variation in hypothalamic-pituitary-adrenal axis function; implications for pituitary and adrenal tumors. **Endocr. Pract.**, v. 17, p. 941-948, 2011.
- BUTTGEREIT, F.; SAAG, K. G.; CUTOLO, M.; DA SILVA, J. A.; BIJLSMA, J. W. The molecular basis for the effectiveness, toxicity, and resistance to glucocorticoids: focus on the treatment of rheumatoid arthritis. **Scand. J. Rheumatol.**, v. 34, p.14-21, 2005.
- CANALIS, E.; GIUSTINA, A. Glucocorticoid-induced osteoporosis: summary of a workshop. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 86, n. 12, p. 5681-5685, 2001.
- CANALIS, E. Clinical review 83: Mechanisms of glucocorticoid action in bone: implications to glucocorticoid-induced osteoporosis. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 81, n. 10, 3441-3447, 1996.
- CARPINTERI, R.; PORCELLI, T.; MEJIA, C.; PATELLI, I.; BILEZIKIAN, J. P.; CANALIS, E.; ANGELI, A.; GIUSTINA, A.; MAZZIOTTI, G. Glucocorticoid-induced

* De acordo:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

osteoporosis and parathyroid hormone. **J. Endocrinol. Invest.**, v. 33, n. 7, p. 16-21, 2010.

CHEN, G. Y.; NUÑEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 10, n. 12, p. 826-837, 2010.

CHIBA, K.; GOTO, M.; SHIROTA, H. A novel inhibitor of IL-1 generation, E5090: in vivo inhibitory effect on the generation of IL-1-like factor and on granuloma formation in an air-pouch model. **Agents Actions Suppl.**, v. 32, p.231-235, 1991.

CHROUSOS, G. P.; KINO, T. Interactive functional specificity of the stress and immune responses: the ying, the yang, and the defense against 2 major classes of bacteria. **J. Infect. Dis.**, v. 192, p. 551-555, 2005.

COGHLAN, M. J.; ELMORE, S. W.; KYM, P. R.; KORT, M. E. The pursuit of differentiated ligands for the glucocorticoid receptor. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 3, n. 14, p. 1617-1635, 2003.

CORTET, B.; CHAPPARD, D.; BOUTRY, N.; DUBOIS, P.; COTTEN, A.; MARCHANDISE, X. Relation ship between computed tomographic image analysis and histomorphometry for microarchitectural characterization of human calcaneus. **Calcif. Tissue Int.**, v. 75, n. 1, p. 23-31, 2004.

CORTET, B.; MARCHANDISE, X. Bone microarchitecture and mechanical resistance **Joint Bone Spine**, v. 68, n. 4, p. 297-305, 2001.

CRABTREE, N. J.; KIBIRIGE, J. N.; FORDHAM, L. M.; BANKS, F. M.; MUNTONI, F. CHINN, D. The relationship between lead body mass and bone mineral content in pedriatic health and desease. **Bone**, v. 35, p. 965-72, 2004.

DE, P.; ROY, S. G.; KAR, D.; BANDYOPADHYAY, A. Excess of glucocorticoid induces myocardial remodeling and alteration of calcium signaling in cardiomyocytes. **J. Endocrinol.**, v. 209, n. 1, p. 105-114, 2011.

DELANY, A. M.; DURANT, D.; CANALIS, E. Glucocorticoid suppression of IGF I transcription in osteoblasts. **Mol. Endocrinol.**, v. 15, n. 10, p. 1781-1789, 2001.

EASTELL, R.; REID, D. M.; COMPSTON, J.; COOPER, C.; FOGELMAN, I.; FRANCIS, R. M.; HOSKING, D. J.; PURDIE, D. W.; RALSTON, S. H.; REEVE, J.; RUSSELL, R. G.; STEVENSON, J. C.; TORGERSON, D. J. A UK Consensus Group on management of glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. **J. Intern. Med.** v. 244, n.4, p. 271-292,1998

ELVY SUHANA, M. R.; FARIHAH, H. S.; FAIZAH, O.; NAZRUN, A. S.; NORAZLINA, M.; NORLIZA, M.; IMA-NIRWANA, S. Effect of 11 β -HSD1 dehydrogenase activity on bone histomorphometry of glucocorticoid-induced osteoporotic male Sprague-Dawley rats. **Singapore Med. J.**, v. 52, n. 11, p. 786-793, 2011.

EVANS, N. Cardiovascular effects of dexamethasone in the preterm infant. **Arch. Dis. Child.** Fetal Neonatal Ed., v. 70, n. 1, p.25-30, 1994.

EVANSON NK, TASKER JG, HILL MN, HILLARD CJ, HERMAN JP. Fast feedback inhibition of the HPA axis by glucocorticoids is mediated by endocannabinoid signaling. **Endocrinology.** v. 151, p. 4811-4819, 2010.

FUKUMOTO, S.; MARTIN, J. T. Bone as an endocrine organ. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 20, n. 5, p. 230-235, 2009.

GILSON, H.; SCHAKMAN, O.; COMBARET, L.; LAUSE, P.; GROBET, L.; ATTAIX, D.; KETELSLEGERS, J. M.; THISSEN, J. P. Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. **Endocrinology.** v. 148, n. 1, p. 452-460, 2007.

GOLDSTEIN, S. A.; GOULET, R.; MCCUBBREY, D. Measurement and significance of three-dimensional architecture to the mechanical integrity of trabecular bone. **Calcif. Tissue Int.**, v. 53, n. 1, p. 127-132, 1993.

GOODWIN, J. E.; ZHANG, J.; VELAZQUEZ, H.; GELLER, D. S. The glucocorticoid receptor in the distal nephron is not necessary for the development or maintenance of dexamethasone-induced hypertension. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 394, n. 2, p. 266-271, 2010.

GOUVEIA. C. H. The molecular and structural effects of thyroid hormone in bones. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 43, n. 1, p. 183-195, 2004.

GRAAF, V. D. **Anatomia humana.** São Paulo: Manole, 2003.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica.** 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HAHN, M.; VOGEL, M.; POMPESIU-KEMPA, M.; DELLING, G. Trabecular bone pattern factor a new parameter for simple quantification of bone microarchitectura. **Bone**, v. 13, p. 327-330, 1992.

HAMBLETON, P.; MILLER, P. Studies on carrageenin air pouch inflammation in the rat. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 70, n. 4, p. 425-433, 1989.

HARDY, R. S.; RAZA, K.; COOPER, M. S. Endogenous glucocorticoids in inflammation: contributions of systemic and local responses. **Swiss. Med. Wkly.**, v. 142, 2012.

HILDBRAND, T.; RUEGSEGG, P. Quantification of bone microarchitecture with the structure model index. **Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering**, v. 1, p. 15-23, 1997.

HINKLE, R. T.; DONNELLY, E.; CODY, D. B.; SAMUELSSON, S.; LANGE, J. S.; BAUER, M. B.; TARNOPOLSKY, M.; SHELDON, R. J.; COSTE, S. C.; TOBAR, E.; STENZEL-POORE, M. P.; ISFORT, R. J. Activation of the CRF 2 receptor

modulates skeletal muscle mass under physiological and pathological conditions. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 285, p. 889-898, 2003.

HOFBAUER, L. C.; GORI, F.; RIGGS, B. L.; LACEY, D. L.; DUNSTAN, C. R.; SPELSBERG, T. C.; KHOSLA, S. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. **Endocrinology**, v. 140, n. 10, p. 4382-4389, 1999.

HUYBERS, S.; NABER, T. H.; BINDELS, R. J.; HOENDEROP, J. G. Prednisolone induced Ca²⁺ malabsorption is caused by diminished expression of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV6. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 292, p. 92-97, 2007.

ISRAEL, B. A.; SHERMAN, F. S.; GUTHRIE, R. D. Hypertrophic cardiomyopathy associated with dexamethasone therapy for chronic lung disease in preterm infants. **Am. J. Perinatol.**, v. 10, n. 4, p. 307-310, 1993.

ISSEVER, A. S.; BURGHARDT, A.; PATEL, V.; LAIB, A.; LU, Y.; RIES, M.; MAJUMDAR, S. A micro-computed tomography study of the trabecular bone structure in the femoral head. **J. Musculoskelet Neuronal Interact.**, v. 3, n. 2, p. 176-184, 2003.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KINO, T.; CHARMANDARI, E.; CHROUSOS, G. P. Glucocorticoid receptor: implications for rheumatic diseases. **Clin. Exp. Rheumatol.**, v. 29, p. 32-41, 2011.

KINO, T.; SU, Y. A.; CHROUSOS, G. P. Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 66, p. 3435-3448, 2009.

KIRWAN, J. R. Systemic corticosteroids in rheumatology. In: KLIPPEL, J. H.; DIEPPE, P. A. **Rheumatology 2nd ed**. London. Mosby International. v.1, p.1-6, 1998.

KLEMM, P.; HARRIS, H. J.; PERRETTI, M. Effect of rolipram in a murine model of acute inflammation: comparison with the corticoid dexamethasone. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 281, n. 1, p. 69-74, 1995.

KUO, L. E.; CZARNECKA, M.; KITLINSKA, J. B.; TILAN, J. U.; KVETNANSKÝ, R.; ZUKOWSKA, Z. Chronic stress, combined with a high-fat/high-sugar diet, shifts sympathetic signaling toward neuropeptide Y and leads to obesity and the metabolic syndrome. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1148, p. 232-237, 2008.

LAU, D.; MOLLNAU, H.; EISERICH, J. P.; FREEMAN, B. A.; DAIBER, A.; GEHLING, U. M.; BRÜMMER, J.; RUDOLPH, V.; MÜNDEL, T.; HEITZER, T.; MEINERTZ, T.; BALDUS, S. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 102, n. 2, p. 431-436, 2005.

LEWIS-TUFFIN, L. J.; CIDLOWSKI, J. A. The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1069, p. 1-9, 2006.

LIU, X. K.; KIRSCHENBAUM, A.; YAO, S.; LEVINE, A. C. Cross between the interleukin-6 and prostaglandin E (2) signaling systems results in enhancement of osteoclastogenesis through effects on the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) ligand/RANK system. **Endocrinology**, v. 146, n. 4, p. 1991-1998, 2005.

LONGUI, C. A. Glucocorticoid therapy: minimizing side effects. **J. Pediatr. (Rio J.)**, v. 83, p. 163-177, 2007.

LUI, J. C.; BARON, J. Mechanisms limiting body growth in mammals. **Endocr. Ver.**, v. 32, n. 3, p. 422-440, 2011.

LUI, J. C.; NILSSON, O.; BARON, J. Growth plate senescence and catch- up growth. **Endocr. Dev.**, v. 21, p. 23-29, 2011.

LUKERT, B. P. Editorial: glucocorticoid replacement-how much is enough? **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 91, n. 3, p. 793-794, 2006.

MA, K.; MALLIDIS, C.; BHASIN, S.; MAHABADI, V.; ARTAZA, J.; GONZALEZ-CADAVID, N.; ARIAS, J.; SALEHIAN, B. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 285, n. 2, p.363-371, 2003.

MANELLI, F.; GIUSTINA, A. Glucocorticoid-induced osteoporosis. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 11, n. 3, p. 79-85, 2000.

MANOLAGAS, S. C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of Osteoporosis. **Endocr. Rev.**, v. 21, n. 2, p. 115-137, 2000.

MCEWAN, I. J.; WRIGHT, A. P.; DAHLMAN-WRIGHT, K.; CARLSTEDT-DUKE, J.; GUSTAFSSON, J. A. Direct interaction of the tau 1 transactivation domain of the human glucocorticoid receptor with the basal transcriptional machinery. **Mol. Cell. Biol.**, v. 13, p. 399-407, 1993.

MCILWAIN, H. H. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathogenesis, diagnosis, and management. **Prev. Med.**, v. 36, n. 2, p. 243-249, 2003.

MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods Mol. Biol.**, v. 225, p. 115-121, 2003.

MUNDY, G.; OYAJOBI, B. O. Bone remodeling. In: FAVUS, M. J. **Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism**. The American Society for Bone and Mineral Research. p. 46-58, 2003.

OAKLEY, R. H.; SAR, M.; CIDLOWSKI, J. A. The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function. **J. Biol. Chem.**, v. 16, p. 9550-9559, 1996.

PENIDO, C.; CONTE, F. P.; CHAGAS, M. S.; RODRIGUES, C. A.; PEREIRA, J. F.; HENRIQUES, M. G. Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. **Inflamm. Res.** v. 55, n. 11, p. 457-464, 2006.

POPP, A. W.; ISENEGGER, J.; BUERGI, E. M.; BUERGI, U.; LIPPUNER, K. Glucocorticosteroid induced spinal osteoporosis: scientific update on pathophysiology and treatment. **Eur. Spine J.**, v. 15, n. 7, p. 1035-1049, 2006.

ROOHK, D. J.; VARADY, K. A.; TURNER, S. M.; EMSON, C. L.; GELLING, R. W.; SHANKARAN, M.; LINDWALL, G.; SHIPP, L. E.; SCANLAN, T. S.; WANG, J. C.; HELLERSTEIN, M. K. Differential in vivo effects on target pathways of a novel arylpyrazole glucocorticoid receptor modulator compared with prednisolone. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 333, n. 1, p. 281-289, 2010.

ROY, S. G.; DE, P.; MUKHERJEE, D.; CHANDER, V.; KONAR, A.; BANDYOPADHYAY, D.; BANDYOPADHYAY, A. Excess of glucocorticoid induces cardiac dysfunction via activating angiotensin II pathway. **Cell. Physiol. Biochem.**, v. 24, p. 1-10, 2009.

RULL, M.; CLAYBURNE, G.; SIECK, M.; SCHUMACHER, H. R. Intra-articular corticosteroid preparations: different characteristics and their effect during inflammation induced by monosodium urate crystals in the rat subcutaneous air pouch. **Rheumatology (Oxford)**, v. 42, n. 9, p. 1093-1100, 2003.

SAINTE-MARIE, Y.; NGUYEN DINH CAT, A.; PERRIER, R.; MANGIN, L.; SOUKASEUM, C.; PEUCHMAUR, M.; TRONCHE, F.; FARMAN, N.; ESCOUBET, B.; BENITAH, J. P.; JAISSE, F. Conditional glucocorticoid receptor expression in the heart induces atrio-ventricular block. **FASEB J.**, v. 21, n. 12, p. 3133-3141, 2007.

SAVORY, J. G.; HSU, B.; LAQUIAN, I. R.; GIFFIN, W.; REICH, T.; HACHÉ, R. J.; LEFEBVRE, Y. A. Discrimination between NL1- and NL2-mediated nuclear localization of the glucocorticoid receptor. **Mol. Cell. Biol.**, v. 19, p. 1025-1037, 1999.

SCHÄCKE, H.; BERGER, M.; REHWINKEL, H.; ASADULLAH, K. Selective glucocorticoid receptor agonists (SEGRAs): novel ligands with an improved therapeutic index. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 275, p. 109-117, 2007.

SCHNEEWEIS, L. A.; WILLARD, D.; MILLA, M. E. Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with receptor activator of NF-Kappa B ligand. **J. Biol. Chem.**, n. 50, v. 280, p. 41155-41164, 2005.

SEDGWICK, A. D.; LEES, P. A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. **Agents Actions.**, v. 18, p. 439-446, 1986.

SEDGWICK, A. D.; LEES, P. Studies of eicosanoid production in the air pouch model of synovial inflammation. **Agents Actions.**, v. 18, p. 429-438, 1986.

SEDGWICK, A. D.; MOORE, A. R.; AL-DUALI, A. Y.; EDWARDS, J. C.; WILLOUGHBY, D. A. The immune response to pertussis in the 6-day air pouch: a model of chronic synovitis. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 66, n. 4, p. 455-464, 1985.

SEDGWICK, A. D.; SIN, Y. M.; EDWARDS, J. C.; WILLOUGHBY, D. A. Increased inflammatory reactivity in newly formed lining tissue. **J. Pathol.**, v. 141, n. 4, p. 483-495, 1983.

SHAH, N.; SCANLAN, T. S. Design and evaluation of novel nonsteroidal dissociating glucocorticoid receptor ligands. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 14, n. 20, p. 5199-5203, 2004.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SILVERMAN, M. N.; STERNBERG, E. M. Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1261, p. 55-63, 2012.

SMITH, E.; FRENKEL, B. Glucocorticoids inhibit the transcriptional activity of LEF/TCF in differentiating osteoblasts in a glycogen synthase kinase-3 β -dependent and -independent manner. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 3, p. 2388-2394, 2005.

SOUVEREIN, P. C.; BERARD, A.; VAN STAA, T. P.; COOPER, C.; EGBERTS A. C.; LEUFKENS, H. G.; WALKER, B. R. Use of oral glucocorticoids and risk of cardiovascular and cerebrovascular disease in a population based case-control study. **Heart**. v. 90, n. 8, p. 859-865, 2004.

STANBURY, R. M.; GRAHAM, E. M. Systemic corticosteroid therapy-side effects and their management. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 82, p. 704-708, 1998.

SUKUMARAN, S.; JUSKO, W. J.; DUBOIS, D. C.; ALMON, R. R. Mechanistic modeling of the effects of glucocorticoids and circadian rhythms on adipokine expression. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 337, n. 3, p. 734-746, 2011.

VAN STAA, T. P.; LEUFKENS, H. G.; ABENHAIM, L.; ZHANG, B.; COOPER, C. Oral corticosteroids and fracture risk: relationship to daily and cumulative doses. **Rheumatology (Oxford)**, v. 39, n. 12, p.1383-1389, 2000.

VANDEVYVER, S.; DEJAGER, L.; TUCKERMANN, J.; LIBERT, C. New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging

role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation. **Endocrinology**. v. 154, p. 993-1007, 2013.

WADA, T.; NAKASHIMA, T.; HIROSHI, N.; PENNINGER, J. M. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. **Trends Mol. Med.**, n. 1, v. 12, p. 17-25, 2006.

WANG, J. C.; SHAH, N.; PANTOJA, C.; MEIJSING, S. H.; HO, J. D.; SCANLAN T. S.; YAMAMOTO, K. R. Novel arylpyrazole compounds selectively modulate glucocorticoid receptor regulatory activity. **Genes Dev.**, v. 20, n. 6, p. 689-699, 2006

WEBB, P.; NGUYEN, P.; KUSHNER, P. J. Differential SERM effects on corepressor binding dictate ERalpha activity in vivo. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 9, p. 6912-6920, 2003.

WEBSTER, J. C.; OAKLEY, R. H.; JEWELL, C. M.; CIDLOWSKI, J. A. Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 98, p. 6865-6870, 2001.

WEINSTEIN, R. S.; JILKA, R. L.; PARFITT, A. M.; MANOLAGAS, S. C. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. **J. Clin. Invest.**, v. 102, n. 2, p. 274-282, 1998.

WRIGHT, A. P.; ZILLIACUS, J.; MCEWAN, I. J.; DAHLMAN-WRIGHT, K.; ALMLÖF, T.; CARLSTEDT-DUKE, J.; GUSTAFSSON, J. A. Structure and function of the glucocorticoid receptor. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v. 47, p. 11-19, 1993.

YANG, X. J.; MASTAITIS, J.; MIZUNO, T.; MOBBS, C. V. Glucokinase regulates reproductive function, glucocorticoid secretion, food intake, and hypothalamic gene expression. **Endocrinology**. v. 148, n. 4, p. 1928-1932, 2007.