

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

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.

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;).

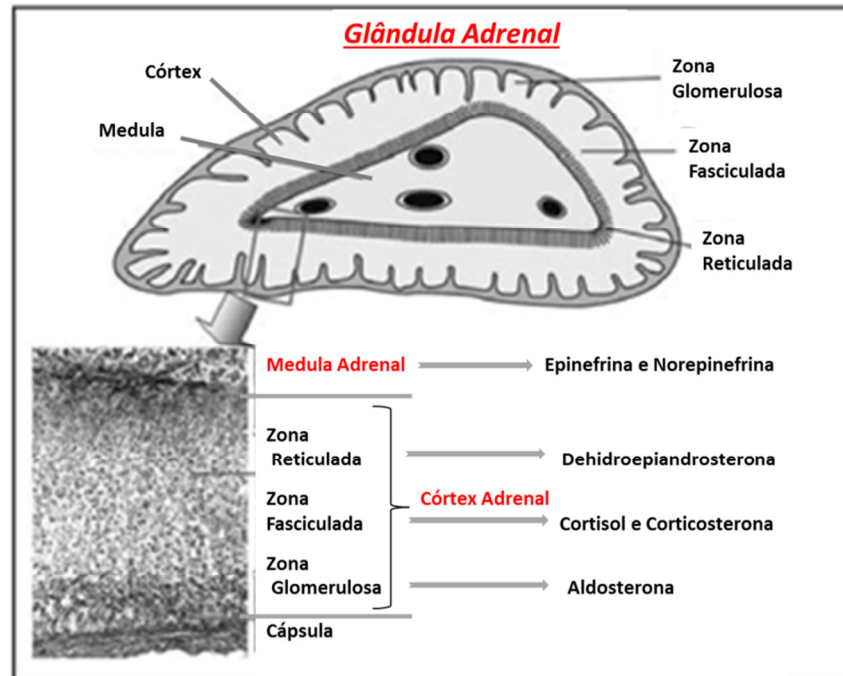
No entanto, a utilização dos fármacos glicocorticóides por tempo prolongado pode acarretar vários efeitos colaterais que interferem diretamente no metabolismo do organismo. São capazes de interferir no metabolismo de carboidratos, gorduras, proteínas, água, sódio (Na), potássio (K), cálcio (Ca) e no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

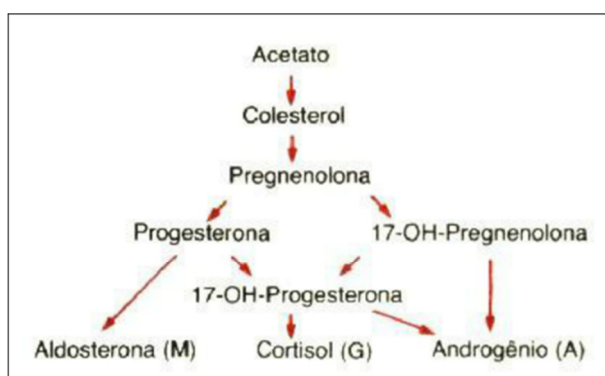
A Fig.1 ilustra a medula adrenal que é responsável pela secreção dos hormônios epinefrina e norepinefrina e o córtex adrenal que é responsável pela secreção dos hormônios corticosteróides: androgênios, mineralocorticóides e glicocorticóides. O córtex é composto por três zonas: zona glomerulosa, secretando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

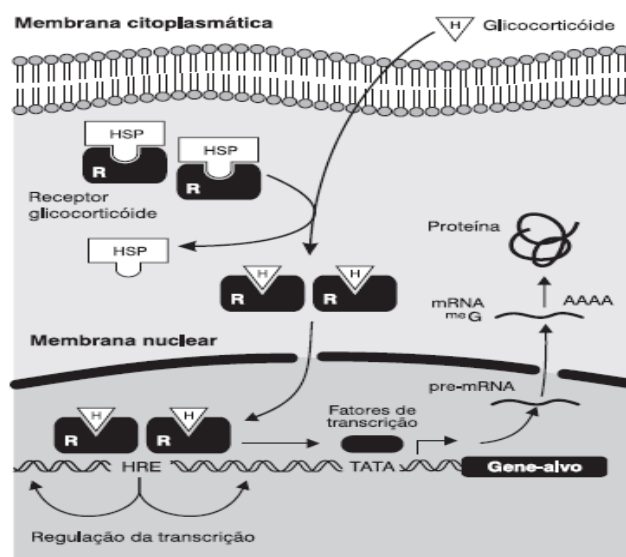
Após a ligação, o complexo (GC-GR) sofre uma transformação estrutural e se torna capaz de translocar-se para o núcleo celular. O GR contém dois sinais de translocação nuclear: NL-1 e NL-2. O sinal de translocação nuclear 1 contém uma estrutura clássica do tipo básico de sinal localização nuclear que 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 ligam 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 $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. 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).

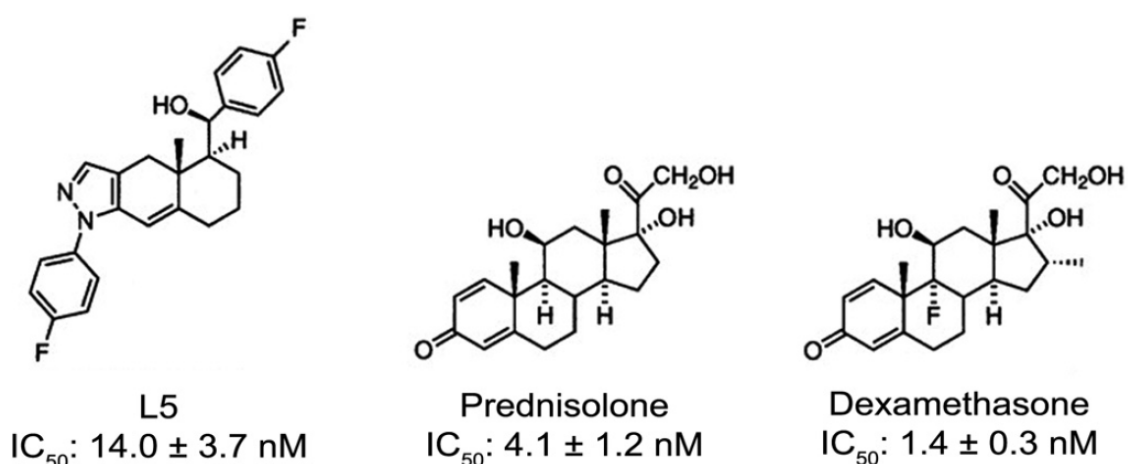
Os GCs afetam o tecido ósseo de maneira a promover perda de massa óssea de maneira direta e indireta. Ações indiretas incluem: 1- alteração do metabolismo do cálcio, diminuindo a sua absorção gastrointestinal, o que leva ao aumento da secreção de paratormônio (PTH) com conseqüente aumento da reabsorção 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 colagenase-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 conseqüente 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 glicocorticoide: 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-osteblásticas 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.

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.; VELDHUIS, 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 pediatric health and disease. **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.; POMPESIUS-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.; RUEGSEGGER, 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.; JAISSER, 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-DUAIJ, 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-3beta-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 cérebro vascular 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.