



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

Solange Bezerra da Silva

**Efeito associativo da dexametasona e melatonina exógenas
sobre ratas prenhes**

**Recife
2012**

SOLANGE BEZERRA DA SILVA

**“Efeito associativo da dexametasona e melatonina exógenas
sobre ratas prenhes.”**

**Dissertação apresentada ao Programa
de Biociência Animal da Universidade
Federal Rural de Pernambuco, como
pré-requisito para obtenção do grau de
Mestre em Biociência Animal. Área de
Morfofisiologia.**

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira

Co-orientadores:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Prof. Dr. Anísio Francisco Soares

RECIFE

2012

SOLANGE BEZERRA DA SILVA

**“Efeito associativo da dexametasona e melatonina exógenas
sobre ratas prenhes.”**

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

Aprovada em 15 de fevereiro de 2012.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira - UFRPE

Prof. Dr. Anísio Francisco Soares - UFRPE

Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos – CPqAM-FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

“Eu não me envergonho de corrigir os meus erros e mudar as minhas opiniões porque não me envergonho de raciocinar e aprender.” Alexandre Herculano.

Essa é sem dúvida, uma das tarefas mais difíceis, pois agora irei agradecer a pessoas muito especiais que fizeram parte do meu cotidiano e puderam acompanhar vários momentos de tristeza e alegria que vivenciei durante o desenvolvimento desse trabalho.

Antes de qualquer coisa, gostaria de agradecer ao meu pai, José Bezerra da Silva, que embora não esteja mais entre nós, tenho certeza que está vibrando com mais essa minha conquista. Ele sempre foi para mim, um exemplo de dignidade, força e honestidade, e hoje, se cheguei até aqui, foi por tudo que ele me ensinou durante o pouco tempo que estive ao meu lado.

Também não posso deixar de agradecer a Deus, por ter me dado ânimo e coragem em momentos que pensei em desistir. Toda a honra e glória sejam dadas a Ele.

Tenho muito a agradecer a minha família, em especial ao meu filho Mateus e a minha mãe, Neuza. Sei que estive muito ausente durante esse tempo, mas sempre pude contar com a compreensão e carinho deles. Obrigada filho, por sempre me receber com um sorriso e um abraço confortante. Não posso esquecer-me de uma mulher maravilhosa que hoje eu considero como uma segunda mãe. Minha querida prima Noemia. Obrigada por todos os momentos de desabafo, por me estender a mão nas horas que fraquejei, por acreditar e confiar em mim sempre. Também agradeço ao seu esposo, Assis, pelo grande homem que é.

A minha orientadora a Dra. Valéria Wanderley Teixeira pelo apoio, incentivo e tempo despendido na realização deste trabalho. Sem dúvida, como fala sua neta, ela é uma mulher “magnífica”. Aos meus co-orientadores Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira e Dr. Anísio Francisco Soares pelos conselhos e sugestões dados. Agradeço pela atenção e tempo dedicados.

Também tenho muito a agradecer ao professor Lêucio, do departamento de Veterinária da UFRPE, e a professora Teresa Jansen do CCB da UFPE, por terem me ajudado num momento muito difícil da minha jornada. Como estes

me disseram: Deus não faz as pessoas se encontrarem por acaso. E com certeza, foi Deus que colocou essas pessoas no meu caminho.

Aos meus queridos amigos do laboratório que sempre estiveram presentes em todas as horas. Pessoas que hoje são como uma grande família para mim. Ismaela, Welma, Hilda, Ana Paula, Cíntia, Fernanda Ângelo, Fernanda Miguel, Clóvis, Sandra, Cristiane, minhas flores Shimene e Carol, Jeanine, Rose, Carina Helena, Franklin, Tiago e Gil, Agradeço a vocês por tornarem o ambiente de trabalho agradável, pelas boas risadas que demos juntos. Muito obrigada por toda a ajuda urgente, pela amizade verdadeira, pelo carinho de vocês. Amo a todos.

Agradeço em especial aos meus queridos amigos Ana Cláudia e Paulo, pela amizade e dedicação sempre que precisei. Vocês são pessoas maravilhosas.

Agradeço a todos que torceram e acreditaram em mim.

Agradeço A CAPES pelo apoio financeiro e realização desse trabalho.

Por fim, agradeço a UFRPE por ter me proporcionado desenvolver esse trabalho.

RESUMO

Dexametasona é largamente utilizada nos processos anti-inflamatórios, imunossupressores e em casos de gestação com risco de prematuridade. Doses supra-fisiológicas de dexametasona podem propiciar complicações e afetar a embriogênese. A melatonina, produzida pela pineal, tem demonstrado prevenir efeitos deletérios dos glicocorticóides. Assim, avaliamos a influência da melatonina sobre efeitos sistêmicos da dexametasona em ratas prenhes por meio dos seguintes parâmetros: 1. Hemograma e perfil glicídico; 2. Níveis de progesterona e 3. Histomorfometria e histoquímica de órgãos. Foram utilizadas 20 ratas divididas nos grupos: **I** – ratas prenhes sem tratamento (Controle); **II** – ratas prenhes tratadas com dexametasona (0.8mg/kg); **III** - ratas prenhes tratadas com melatonina (0,5 mg/Kg); **IV**: ratas prenhes tratadas com dexametasona e melatonina. Todos os tratamentos foram iniciados 10 dias após confirmação do acasalamento até o final da gestação. O sangue foi coletado no 7^o, 14^o e 21^o dia. A dosagem de carboidratos foi realizada pelo método antrona para a leitura em microplaca. A progesterona foi dosada pelo método ELISA. O fígado, rins e adrenais foram analisados histoquímica e morfometricamente. Os resultados mostraram uma proteção da melatonina para os parâmetros sanguíneos (valores de hematócrito, número total de hemácias, número total e contagem diferencial de leucócitos), bioquímicos e hormonais. O tratamento com dexametasona causou redução progressiva do número total de hemácias e anisocitose, neutrofilia, linfopenia e eosinopenia, além da redução dos níveis plasmáticos de carboidratos no 21^o dia, e de progesterona aos 14 e 21 dias de gestação. Não se evidenciaram alterações morfométricas e histoquímicas nos órgãos. A dexametasona na dosagem de 0,8 mg/Kg aplicada a partir do terço médio da gestação produz alterações hematológicas, bioquímicas e hormonais em ratas, porém, não afeta o fígado, rins e adrenais, quanto aos parâmetros morfométricos e histoquímicos. Estes efeitos foram prevenidos pela melatonina.

PALAVRAS-CHAVE: Melatonina, glicocorticóide, hormônio, hemograma, gestação, ratas

ABSTRACT

Dexamethasone is widely used in processes anti-inflammatory, immunosuppressive and in cases of pregnancy with risk of prematurity. Supraphysiological doses of dexamethasone can provide complications and affect embryogenesis. Melatonin, produced by the pineal gland, has been shown to prevent the deleterious effects of glucocorticoids. We evaluated the influence of melatonin on systemic effects of dexamethasone on pregnant rats through the following parameters: 1. Hematocrit and glucose profile, 2. Levels of progesterone and 3. Histomorphometry and histochemistry of organs. We used 20 rats divided into two groups: I - pregnant rats untreated (control), II - pregnant rats treated with dexamethasone (0.8mg/kg) III - pregnant rats treated with melatonin (0.5 mg / kg) IV: pregnant rats treated with dexamethasone and melatonin. All treatments were initiated 10 days after confirmation of mating until the end of pregnancy. Blood was collected in the 7th, 14th and 21st days. Determination of carbohydrate was accomplished by anthrone method for reading plate. Progesterone was measured by ELISA. The liver, kidneys and adrenals were examined histochemically and morphometrically. The results showed a protection of melatonin to blood parameters (hematocrit, total RBC, total and differential leukocyte count), biochemical and hormonal. Treatment with dexamethasone caused a gradual reduction in the total number of red blood cells and anisocytosis, neutrophilia, lymphopenia and eosinopenia, and reduced plasma levels of carbohydrates on day 21 and progesterone at 14 and 21 days of gestation. No evidence of morphological and histochemical changes in the organs. Dexamethasone at a dosage of 0.8 mg / kg applied from the middle third of pregnancy produces hematological, biochemical and hormonal in rats, however, does not affect the liver, kidneys and adrenals, as to histochemical and morphometric parameters. These effects were prevented by melatonin.

KEYWORDS: Melatonin, glucocorticoid, hormone, hemogram, pregnancy, rats.

SUMÁRIO

Capítulos		Página
	AGRADECIMENTOS.....	4
	RESUMO.....	6
	ABSTRACT.....	7
1	INTRODUÇÃO.....	9
	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
2	Efeito associativo da dexametasona e melatonina exógenas sobre parâmetros sanguíneos, progesterona, carboidratos totais e histomorfomeria de órgãos em ratas prenhes	33
	RESUMO	33
	ABSTRACT.....	34
	INTRODUÇÃO.....	35
	MATERIAL E MÉTODOS	36
	RESULTADOS.....	39
	DISCUSSÃO	41
	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	43
	ANEXOS.....	47

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Nos mamíferos, a integração entre a temporalidade externa e a ordem temporal interna é dada pelos núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo. Estes núcleos recebem informação da luminosidade diretamente do ambiente por meio do feixe nervoso retino-hipotalâmico. A partir destas informações, os núcleos supraquiasmáticos trabalham como um relógio mestre que fornece o sinal para a sincronização da ordem temporal interna com o ciclo claro/escuro dado pelo movimento de rotação da terra (PEREIRA; TUFIK; PEDRAZZOLI, 2009). A partir dos núcleos supraquiasmáticos, os impulsos nervosos são transmitidos para os neurônios do seguimento cervical da medula, sendo enviadas posteriormente para os gânglios simpáticos cervicais superiores e destes para a glândula pineal (POIRIER et al., 2002).

A pineal é uma pequena glândula, suspensa na parte posterior do terceiro ventrículo, revestida externamente pela pia-máter (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Esta glândula é composta pelos pinealócitos (células glandulares), pelas células gliais do tipo astrocitário e por capilares sanguíneos contendo pouco tecido conjuntivo (POIRIER et al., 2002).

Essa glândula funciona como um transdutor capaz de informar às partes internas do organismo sobre as condições de iluminação ambiental, ou seja, quando a pineal libera melatonina, seu principal hormônio, informa ao organismo que está escuro. Dita como agente endócrino da escuridão, à noite a melatonina banha as células e tecidos fornecendo uma série de informações rítmicas, permitindo a diferenciação entre o dia e a noite. (FERREIRA; MARKUS, 2001; OKATANI et al., 2003; CARRILLO VICO et al., 2004).

A melatonina também pode ser secretada em menor quantidade pela retina, trato gastrointestinal e em resposta à quantidade e ao tipo de alimento que ingerimos (TAN et al., 2003). Apresenta solubilidade *in vivo* em lipídios e água, e *in vitro* em etanol absoluto e água. Seu peso molecular é de 232,28g e sua fórmula molecular é $C_{13}H_{16}N_2O_2$ (SHIDA; CASTRUCCI; LAMY-FREUND, 1994; REITER, 1998).

Os principais órgãos onde ocorre a metabolização da melatonina são o fígado e o cérebro. No fígado ocorre a hidroxilação da melatonina formando 6-hidroxi melatonina, seguida de uma conjugação com sulfato ou glucoronato, sendo posteriormente excretada na urina. Quando a melatonina reage com o peroxinitrito (ONOO^-) forma o metabólito 6-hidroxi melatonina que manifesta uma atividade antioxidante superior em determinados modelos *in vitro*. A melatonina tem várias vantagens distintas como um conservante de estrutura e função de organelas celulares. Funciona através de uma série de mecanismos reduzindo os danos oxidativos. Assim, a melatonina elimina uma série de reagentes, incluindo o radical hidroxila, peróxido de hidrogénio, ácido nítrico, peroxinitrito e ácido peroxinitroso. (BLANCHARD; POMPOM; DUCROCQ, 2000; REITER; TAN; BURKHARDT, 2002).

Estudos promissores demonstram que a baixa produção de melatonina poderia induzir um estado de imunodepressão e estar associado à causa de inúmeras doenças (REITER, 1998). Pois, uma pessoa sob estresse produz normalmente mais adrenalina e cortisol. Para cada molécula de adrenalina formada, quatro moléculas de radicais livres são produzidas aumentando a probabilidade de lesão celular (peroxidação lipídica). A melatonina teria o papel de reduzir o acúmulo de radicais livres nos tecidos, combater doenças neurodegenerativas, prevenir o envelhecimento celular e conseqüentemente algum tipo de câncer (principalmente o câncer de mama), diminuir alterações fotoperiódicas, ajustar o relógio biológico, combater insônia e tratar algumas imunodeficiências adquiridas, inclusive a AIDS (CUZZOCREA; REITER, 2001, JIMENEZ et al., 2001).

A glândula supra-renal, na sua porção cortical (zona fasciculada) é a responsável pela síntese dos glicocorticóides e está sob o comando adeno-hipofisário do ACTH (hormônio adreno-córtico-trófico) que, por sua vez, é controlado pelo hormônio liberador de corticotrofina hipotalâmica (CRH). A secreção de glicocorticóides apresenta um ritmo circadiano, ou seja, a cada 24 horas (dia), volta-se ao ponto inicial: para um indivíduo com ritmo vigília/sono normal, os níveis mais elevados de cortisol ocorrem às 8 horas da manhã, atingem 50% desse nível às 16 horas e chegam ao seu ponto mais baixo à meia-noite (OSTENSEN, 1998).

Segundo Lima et al. (2002), há trabalhos, ressaltando que a atividade mitótica das células da medula da adrenal pode ser alterada pela pineal, de acordo com a fase do dia, diminuindo durante o escuro. A pinealectomia em ratos adultos aumenta o nível dos hormônios do córtex da adrenal e promove modificações como: diminuição da atividade mitótica e hipertrofia da cortical. Assim, sugere-se que a melatonina atue como um fator anti-corticóide, e conseqüentemente amenizador dos seus efeitos colaterais.

Os glicocorticóides constituem um grupo de drogas com efeitos antiinflamatórios e imunossupressores comumente utilizados em Medicina Veterinária. São agentes recomendados para o tratamento de doenças alérgicas e imunomediadas, choque séptico e cardiogênico e traumatismos do sistema nervoso central e da coluna vertebral (OSTENSEN, 1998).

Os glicocorticóides são hormônios esteróides indispensáveis para o desenvolvimento do tecido pulmonar do feto e clinicamente utilizados em gestações com riscos de prematuridade para a aceleração o desenvolvimento pulmonar (WARD, 1994). O transporte transplacentário de glicocorticóides é regulado pelas enzimas 11 β -hidroxisteróide desidrogenase (11 β -HSD) tipo 1 e 2 que atuam na reativação e inativação de glicocorticóides, respectivamente, regulando a exposição do feto aos mesmos (DIEDERICH et al., 2002). Devido a progressiva redução da bioatividade da enzima 11 β -HSD2 ao longo da gestação (WADDELL et al., 1998), o terço final é o período de gestação em que ocorre uma maior permissibilidade do tráfego de glicocorticóides, estudos que exploram os efeitos da exposição à glicocorticóides durante esse período mostram alterações fisiológicas como a elevação do nível glicêmico pós-natal, a redução da síntese de receptores para insulina e a mobilização de glicogênio para a corrente sanguínea (NYRIENDA et al., 1998).

A dexametasona é um glicocorticóide fluorado sintético largamente utilizado por apresentar efeitos análogos ao da cortisona (SLOBODA et al., 2005), porém atravessa a placenta facilmente, devendo ser utilizado pela mãe com cautela.

Além das alterações relacionadas com a bioquímica do sangue, a dexametasona exerce influência sobre a distribuição de células sanguíneas através da inibição da expressão de citocinas (HAYNESWORTH; BABER;

CAPLAN, 1996), supressão de fatores de proliferação de linfócitos (ALMAWI et al, 1991) e indução da apoptose (MOR; COHEN, 1996). Dentre as alterações verificadas na distribuição de leucócitos entre o sangue e os compartimentos do sistema imune estão à redução drástica do número linfócitos T e a elevação acentuada de neutrófilos, além de uma redução acentuada dos linfócitos B, células NK (natural killer) e monócitos (DHABHAR, et al., 1995; DHABHAR, et al., 1996).

Segundo Dearden; Mosier, (1988), Levitt et al. (1996) e Ortiz et al. (2001), os rins da prole de ratas tratadas com dexametasona durante a gestação, tem seu desenvolvimento afetado, ocorrendo uma diminuição do número de néfrons, prejudicando a excreção renal do sódio, o que ocasiona a hipertensão nesses animais na fase adulta (BRENNER; GARCIA; ANDERSON, 1988).

De acordo com Ostensen (1998), os glicocorticóides têm ações sistêmicas e seu efeito colateral atinge vários órgãos e sistemas, entre esses se destacam: 1 - complicações gastrintestinais: úlcera péptica, pancreatite, hepatomegalia, aumento do apetite; 2 - complicações músculo–esqueléticas: miopatia, osteoporose, fraturas, necrose asséptica do osso; 3 - complicações renais: nefrocalcinose, nefrolitíase e uricosúria; 4 - complicações cardiovasculares: hipertensão (mais comum), infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral. 5 - alterações na distribuição da pele e gordura: aspecto “cushingóide”, acne, hirsutismo, atrofia da pele (uso de corticóides tópicos). 6 - suscetibilidade a infecções: infecções virais (varicela), infecções bacterianas (estafilococo, proteus, pseudomonas e salmonella), reativação da tuberculose, pneumocitose, infecções parasitárias (estrongiloidíase, toxoplasmose e amebíase), infeções fúngicas (aspergilose, candidíase e criptococose). 7 - alterações no crescimento. 8 - alterações no feto.

Slotkin et al. (1991), estudando o efeito dos glicocorticóides em fetos de rato, observaram que o tratamento pré-natal com dexametasona induziu a diminuição da proliferação celular em diversos tecidos, refletindo provavelmente uma ação seletiva destes medicamentos sobre certos tipos celulares e ainda sobre diversas fases da diferenciação celular, o que poderia ocasionar em retardo do crescimento pós-natal. Já Hansen et al, (1999), em estudo experimental em ratos, administraram dexametasona na dose de

0,8mg/kg, por via subcutânea, a fêmeas gestantes do 9° ao 14° dia de gestação. No vigésimo dia de gestação, estes animais foram submetidos à eutanásia e coletados fragmentos maternos e fetais para análise. Os autores observaram que os fetos do grupo tratado com dexametasona apresentaram menores pesos em comparação ao grupo não tratado, assim como alta taxa de mortalidade e fenda palatina.

Segundo Aoyama; Mori; Mori (1986) a administração de hormônio melatonina da pineal em ratas fêmeas jovens preveniu os efeitos deletérios (diminuição do ganho de peso corporal, atrofia do timo e das adrenais, glicosúria, elevação do nível de açúcar no sangue, triglicerídeos e colesterol total) causados por três diferentes glicocorticóides: dexametasona, prednisolona e hidrocortisona.

Os estudos que tratam das alterações de alguns órgãos como fígado, rins e adrenais relacionadas ao uso de corticóides e seus efeitos colaterais no organismo, apontam para a melatonina como um fator capaz de reduzir os danos causados por esses efeitos, uma vez que a melatonina exerce influência sobre os corticóides naturalmente produzidos pelas adrenais. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo relacionar a influência do uso de melatonina sobre os efeitos sistêmicos da dexametasona por meio dos seguintes parâmetros: 1.Hemograma e perfil glicídico; 2.Níveis de progesterona e 3.Histologia, histoquímica e morfometria do fígado, rins e adrenais de ratas prenhes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Pineal: síntese e secreção de melatonina

A glândula pineal, também conhecida como epífise, se localiza no teto do terceiro ventrículo entre os dois hemisférios cerebrais e está presente em todos os animais vertebrados. Pesa aproximadamente 0,13 gramas e possui cerca de 1,2 cm de diâmetro, originando-se do diencéfalo (COMMENTZ; HELMKE, 1995). É um órgão endócrino, formado por células com função neurosecretora, os pinealócitos, e pelas células intersticiais semelhantes às células da glia. Os produtos pineais específicos são, bioquimicamente, de dois tipos: indolaminas e peptídeos. A melatonina, uma indolamina, é o mais bem estudado dos produtos pineais (OKATANI et al, 2003; CARRILLO-VICCO et al., 2005). Possui baixo peso molecular (PM=232,28) e característica anfifílica, ou seja, difunde-se tanto em meios lipofílicos como hidrofílicos graças a presença do grupamento metoxi no carbono 5 e do grupamento acil ligado ao grupamento amina (CIPOLLA-NETO; AFECHE, 2008).

A síntese de melatonina depende de uma via neural que começa nas células ganglionares da retina, e projetam-se para o hipotálamo principalmente para os núcleos supraquiasmáticos (NSQ). Os neurônios dos NSQ projetam-se para os núcleos paraventriculares hipotalâmicos (NPVH), ou seja, o sistema neural responsável pela síntese de melatonina origina-se no NPVH enquanto que os NSQ são os responsáveis pela sincronização da síntese de melatonina ao ciclo claro escuro ambiental (CIPOLLA-NETO; AFECHE, 1999). A partir dos núcleos supraquiasmáticos, os impulsos nervosos são transmitidos da medula aos neurônios dos gânglios simpáticos cervicais superiores e deles para os pinealócitos (POIRIER et al., 2002).

Os NSQ ao liberarem o neurotransmissor inibitório GABA (ácido gama-aminobutírico), durante o período de luz, inibem os neurônios do NPVH e, conseqüentemente toda a via de síntese da melatonina. Já no período noturno, os neurônios dos NSQ possuem uma atividade elétrica menor, não liberam GABA, permitindo dessa maneira que todo o restante da via de síntese da melatonina seja ativada (MARKUS et al., 2003).

A melatonina é sintetizada a partir do triptofano pelos pinealócitos e imediatamente secretada. O triptofano é hidroxilado pela enzima triptofano hidroxilase (TPH), formando 5-hidroxitriptofano (5-HTP), o qual é descarboxilado pela enzima descarboxilase de L-aminoácido aromático (LAAD), gerando-se assim a serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT). A norepinefrina liberada pelas terminações nervosas simpáticas pós-ganglionares na pineal ativa os receptores β -adrenérgicos na membrana dos pinealócitos, o que ativa a enzima adenilato ciclase da membrana catalisando a conversão do ATP a AMPc dentro da célula. O AMPc estimula a síntese de uma enzima passo-limitante, a arilalquilamina N-acetil transferase (NAT), que transfere um grupamento acetil para a serotonina, convertendo-a N-acetil serotonina. Essa, por sua vez, sofre ação da enzima Hidroxi-indol-O-metil transferase (HIOMT), que, substituindo o hidrogênio do grupamento hidroxila do carbono 5 do grupo indólico por um grupamento metil, forma a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) (SUDGEN, 1989). Como a HIOMT só pode ser fabricada na escuridão, o mesmo é verdadeiro para a melatonina (PEKELMAN et al., 2003).

Além da melatonina produzida pela pineal, em mamíferos, há outras fontes de produção desse hormônio, como glândula de Harder, fígado, testículos, sistema circulatório, trato gastrointestinal, musculatura lisa, células do sistema imune e retina, também produzem melatonina, porém somente com ação local (SIMMONEAUX; RIBELAYGA, 2003).

2.2. Melatonina e o ritmo circadiano

Durante a noite, a síntese de melatonina na glândula pineal é maior (KIERSZEMBAUM, 2004). Portanto, a atividade secretória da glândula pineal apresenta um ritmo circadiano relacionado com o período escuro cuja duração, variando ao longo do ano de acordo com as estações, determina um padrão secretório com variações diárias e sazonais. Estas características de secreção determinam o papel fisiológico da glândula pineal: sinalizar para o meio interno, pela presença ou ausência de melatonina nos líquidos corporais, se é dia ou noite no meio exterior e sinalizar, pelo perfil diário do hormônio, qual a estação do ano. Desta forma a pineal confere ritmos a uma série de funções neuroendócrinas que modula, determinando, por exemplo, o ciclo sono-vigília,

a atividade reprodutora, a atividade metabólica de várias espécies (COMMENTZ; HELMKE, 1995), como também regulação do sistema imunológico, cardiovascular, entre outros. Além disso, a melatonina influencia o ritmo de vários processos fisiológicos durante a noite: a digestão torna-se mais lenta, a temperatura corporal cai, o ritmo cardíaco e a pressão sanguínea diminuem e o sistema imunológico é estimulado. Parece ser capaz de aumentar atividade e mobilidade das células de defesa, estimular a formação de anticorpos e facilitar a defesa contra microrganismos (MAGANHIN et al., 2008).

2.3. Melatonina e o sistema imune

Vários estudos têm revelado que a melatonina apresenta propriedades imunomodulatórias e que atua tanto sobre a imunidade inata quanto sobre a humoral (SILVA, 2005; SRINIVASAN et al., 2005; SOUSA NETO; SCALDAFERRI, 2005; BERGER, 2008). Na imunidade inata a melatonina atuaria aumentando a produção de citocinas, enquanto que na imunidade humoral aumentaria o número de células imunocompetentes. Sabe-se ainda que a melatonina tem receptores de alta afinidade em diversas células e órgãos do sistema imune em roedores, galinhas e humanos, incluindo o baço e o timo (POON; PANG, 1992; PANG et al., 1995; TAMURA, 2009).

Outros estudos mostraram os efeitos imunomoduladores da melatonina administrada por via oral em ratos, os quais resultaram em aumento da atividade proliferativa de linfócitos e da taxa de síntese de DNA em linfócitos tímicos e esplênicos. Também foram realizadas pesquisas em ratos portadores de tumor, e estas revelaram um aumento, tanto na produção linfocítica, como na habilidade regulatória de produção de citocinas por macrófagos, após tratamento com melatonina (MARTINS et al., 1998; EL-SOKKARY; REITER; ABDEL-GHAFFAR, 2003).

A melatonina passa pela placenta sem sofrer alteração e em ratas prenhas os níveis séricos deste hormônio aumentam do 12^o ao 21^o dia de gestação, ocorrendo um rápido declínio destes níveis logo após o parto (LANOIX; OUELLETTE; VAILLANCOURT, 2006; MAEKAWA et al., 2007). Na literatura poucas pesquisas têm demonstrado a ocorrência de alterações na

função imune em ratas durante a prenhez. Foi relatado que os linfócitos, monócitos e granulócitos mostram um fenótipo ativo em ratas, especialmente na última semana de gestação, e uma diminuição nas subpopulações de linfócitos (FAAS et al., 2005).

2.4 Influência da melatonina sobre as glândulas adrenais, fígado e rins

Diversos trabalhos têm demonstrado a influência da pineal na adrenal (BROWN; PANG; PANG, 1994). Zats; Wang, (1991) referem que a glândula pineal regularia a secreção de mineralocorticóides e glicocorticóides. Além disso, estudos têm demonstrado a influência inibitória da glândula pineal sobre o córtex da adrenal (LIMA et al., 2002). Alguns autores afirmam que após a pinealectomia, ocorre aumento dos hormônios corticais da adrenal, e esse aumento é abolido após hipofisectomia (KINSON; SINGER; GRANT, 1968). Outros trabalhos ressaltam que a atividade mitótica das células da medula adrenal pode ser alterada pela pineal, de acordo com a fase do dia, diminuindo com o escuro (KACHI et al., 1990).

A literatura relata que a pinealectomia em ratos adultos aumenta o nível dos hormônios do córtex da adrenal e promove modificações como: diminuição da atividade mitótica e hipertrofia da cortical, aumento da camada fasciculada nos animais pinealectomizados em relação aos não pinealectomizados, aumento do peso da adrenal por hipertrofia celular da zona fasciculada e não hiperplasia, em vista de ocorrer diminuição ou inibição da proliferação celular do córtex da adrenal (LIMA et al., 2002). Outros trabalhos afirmam que a pinealectomia aumenta, e, a reposição da melatonina diminui a proliferação celular da zona glomerulosa da adrenal de ratas (EVÊNCIO, 1998).

A literatura também relata que ratas prenhas submetidas à ausência de luz apresentam um atraso no desenvolvimento das adrenais e a única região desenvolvida foi à zona fasciculada do córtex. Esse fato, provavelmente está relacionado a pouca atividade de síntese de esteróides, em decorrência da presença constante de melatonina materna. A região medular também teve sua formação inibida, demonstrando que a melatonina materna pode exercer uma função reguladora na sua formação (CORREIA et al., 2002).

Os rins apresentam receptores de melatonina na membrana basolateral do epitélio tubular proximal (SONG et al., 1997) e de acordo com Sener et al., (2002) a melatonina preveniu danos oxidativos nos rins de ratos submetidos a lesões térmicas, por impedir a infiltração de neutrófilos para tecidos lesados e reduzir os níveis de glutathione.

O hormônio melatonina exerce também importante função no fígado regulando vários processos fisiológicos nesse órgão, agindo como um antioxidante e eliminador de radicais livres (EL-SOKKARY; REITER; ABDEL-GHAFFAR, 2003), além de inibir o crescimento de hepatocarcinomas (OHTA; KONGO; KISHIKAWA, 2003; OKATANI et al., 2003; CARRILLO-VICO et al., 2004). Estudos relatam a presença de receptores da melatonina tanto na membrana plasmática, como na carioteca das células hepáticas (NAJI et al. 2004).

2.5 Melatonina e carboidratos

Em ratos, foi demonstrado que a pinealectomia, e conseqüentemente redução de melatonina, induz diminuição da glicogenogênese hepática e muscular, assim como aumento na concentração de piruvato plasmático. Além disso, foi relatado que a infusão de extrato de pineal promove redução glicêmica, que envolve aumento na tolerância a glicose e na glicogenogênese hepática e muscular, em resposta a uma sobrecarga glicídica (MILCU; NANU-IONESCU; MILCU, 1971). Outros estudos demonstraram que, em ratos pinealectomizados, ocorreram alterações nas concentrações plasmáticas de glicose, insulina e glucagon (DIAZ; BLASQUEZ, 1986).

Os tecidos insulino sensíveis expressam uma isoforma de transportador de glicose específica chamada GLUT4. Em estado basal de concentração de insulina, apenas cerca de 10% do conteúdo total de transportador está presente na membrana plasmática dessas células participando da captação basal de glicose. Sob estímulo insulínico, ocorre rápida translocação de vesículas intracelulares que se fundem a membrana plasmática, aumentando rapidamente a densidade de GLUT4, permitindo um incremento de até 30 vezes no transporte de glicose (REA; JAMES, 1997). Trabalhos realizados com

animais pinealectomizados evidenciaram que a pinealectomia leva a um quadro de resistência insulínica devido a uma queda considerável da quantidade de transportadores GLUT4 nas células do tecido adiposo e muscular (LIMA et al., 1998).

Embora o papel da melatonina na função da célula β (produtora de insulina) pancreática ainda não esteja totalmente esclarecido, sabe-se que melatonina age em células-alvo, ligando-se a receptores específicos localizados na membrana plasmática da célula e esses receptores já foram demonstrados no pâncreas (FRANKEL; STRANDBERG, 1991).

2.6 Glicocorticóides

Os glicocorticóides constituem um grupo de drogas com efeitos antiinflamatórios e imunossupressores comumente utilizados na medicina humana e veterinária. São agentes recomendados para o tratamento de doenças alérgicas e imunomediadas, choque séptico e cardiogênico, traumatismos do sistema nervoso central e da coluna vertebral (OSTENSEN, 1998). Constituem a maior subclasse de hormônios esteróides que regulam processos metabólicos, cardiovasculares, imunitários e comportamentais (CHARMANDARI; TSIGOS; CHROUSOS, 2005). Tem importância fundamental na gestação em mamíferos, uma vez que estão envolvidos nas adaptações metabólicas maternas (ATKINSON; WADDEL, 1995).

Durante a gestação, os esteróides lipofílicos facilmente atravessam a placenta, mas os níveis de glicocorticóides são muito menores que os maternos (BEITINS et al., 1973). Isso se deve a intensa atuação na placenta da enzima 11 β -hidróxi-esteróide-desidrogenase tipo 2 (11 β -HSD-2), que catalisa a conversão dos glicocorticóides fisiologicamente ativos cortisol e corticosterona em formas inertes como a cortisona (WHITE; MUNE; AGARWAL, 1997). Assim forma-se uma barreira que protege o feto da exposição aos glicocorticóides maternos, embora ainda permita a passagem de 10 a 20 % (VENIHAKI; CARRIGAN; DIKES, 2000).

O glicocorticóide cortisol é produzido pelo córtex adrenal e é um índice útil da atividade secretora do eixo hipotálamo- hipófise-adrenal (HPA). A produção de cortisol é controlada pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que é

sintetizado na Adeno- Hipófise. O ACTH estimula a síntese e secreção de hormônios pelo córtex da adrenal. A liberação do ACTH é majoritariamente estimulada pelo hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e a liberação do CRH segue um ritmo circadiano. O pico de secreção do cortisol ocorre mais ou menos por volta do amanhecer e a altura em que os seus níveis são mais baixos é ao início da noite. A regulação desse ritmo depende de estímulos internos (por ex. dos núcleos supraquiasmáticos) e também por estímulos ambientais como a luz (SARAIVA; SOARES; GAVINA, 2005). Esse achado demonstra que a melatonina, provavelmente está envolvida na regulação dos níveis plasmáticos de cortisol, ocorrendo uma relação inversa entre esses.

Estudos realizados mostraram que as adrenais das ratas mães e dos fetos cujas mães receberam betametasona, por injeção intramuscular, na dose de 1mg/kg de peso corporal, nos dias 11, 12, 18 e 19 da prenhez revelaram-se distintas das adrenais dos grupos tratados com placebo. Foi observada extensa vacuolização do citoplasma das células das camadas glomerulosa e fasciculada do córtex, caracterizando acúmulo de colesterol devido ao estado de supressão adrenal pelo uso do corticóide exógeno (SOUZA et al., 2001) Esses achados foram confirmados por outro trabalho, onde administração de uma única dose de dexametasona (1,5 mg/kg de peso) no período antenatal crítico de desenvolvimento do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal provocou algumas mudanças como diminuição significativa no peso das adrenais e no volume das zonas glomerulosa, fasciculada e reticular dos conceptos. Essas alterações seriam decorrentes da diminuição do número de células, além de áreas de necrose e infiltrações por macrófagos, células gigantes e linfócitos (HRISTIC et al.,1995).

Segundo estudos, a utilização de glicocorticóides no período pré-natal causa, freqüentemente, alterações no metabolismo da glicose na vida adulta, devido principalmente, ao desenvolvimento de resistência a insulina, comumente associada à redução da síntese dos receptores de insulina, desencadeando hiperglicemia e hiperinsulinemia (NYRIENDA et al.,1998).

Alguns autores afirmam que o aumento matinal de adrenocorticotropina e cortisol parecem ser induzidos por osciladores circadianos (RANDLER; SCHAAL, 2010), e como descrito, a melatonina desempenha um papel central na sintonia do sistema circadiano (DOUGLAS, 2006). Os ritmos circadianos da

melatonina influenciam a secreção de insulina, reduzem a glicose sanguínea e os lipídeos plasmáticos em ratos diabéticos (SUDNICOVICK et al., 2007). Alguns autores afirmam que a suplementação apropriada de melatonina pode ser uma terapia ou profilaxia para a resistência insulínica, aumento da gordura intra-abdominal e patologias resultantes que normalmente aparecem com a idade (RASMUSSEN et al., 1999).

2.7 Dexametasona

A dexametasona é um glicocorticóide sintético que apresenta atividade farmacológica de dez a 20 vezes maior que o cortisol e a corticosterona. Este fármaco é um potente antiinflamatório e imunossupressor que atua inibindo a transcrição de genes que após a tradução origina receptores, proteínas que suprimem citocinas e, também, proteínas que controlam a ativação, migração, adesão e recrutamento celular (BAVARESCO; BERNARDI; BATTASTINI, 2005). Como consequência, ocorre inibição periférica da proliferação de linfócitos T, acompanhada por inibição da migração celular para sítios inflamatórios e controle da recirculação de leucócitos (SORIANELLO et al., 2002).

A dexametasona possui baixo custo e é amplamente utilizada com propriedades imunossupressoras e antiinflamatórias. No entanto, doses suprafisiológicas podem propiciar complicações como: osteoporose, osteonecrose, insuficiência da glândula supra-renal, imunodepressão, hiperglicemia, hipertensão arterial sistêmica, anormalidades hidreletrolíticas e possível risco de úlceras pépticas (RHODUS et al., 2006). Alguns experimentos usando a dexametasona em animais, na fase tardia de gestação, determinaram menor ganho de peso da matriz, diminuição no peso do feto e de alguns de seus órgãos como coração, fígado, pulmões e cérebro (CARLOS; SEIDLER; SLOTKIN, 1992).

O tratamento com dexametasona pode afetar ainda a embriogênese. São citados efeitos deletérios como reabsorções e implantações de embriões inviáveis. Também são relatadas alterações morfológicas como fenda palatina e tamanho reduzido do concepto (HANSEN et al, 1999). Alguns órgãos como o

pâncreas, o fígado e os rins podem apresentar alterações morfofuncionais atribuídas a corticoterapia (BRUDER; PING; RAFF, 2006).

2.8 Melatonina e gestação

A pineal é amplamente aceita como a glândula reguladora da reprodução em mamíferos, pela capacidade de influenciar a função gonadal. Sua atividade na rata, com frequência é avaliada pelos níveis de melatonina, os quais variam de acordo com o ciclo estral (MAGANHIN et al., 2008). A pineal exerce importante ação antigonadotrófica, tendo papel específico no controle da atividade do ciclo sexual de ratas (JOHNSON et al., 1982) e, possivelmente de outros mamíferos, inclusive da espécie humana (BRZEZINSKI et al., 1988). Sua ação no sistema reprodutor é mediada por receptores no hipotálamo que podem alterar a secreção dos pulsos do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH), que por sua vez, controla a secreção das gonadotrofinas FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante) pela hipófise (DAIR et al., 2008). Através da estimulação do FSH e do LH, as células granulosa-luteínicas passam a secretar progesterona e estrogênio, hormônios necessários para a manutenção do endométrio no decorrer da gestação.

Alguns estudos realizados em suínos (PELTONIEMI; TAST; LOVE, 2000), especularam que altas concentrações de melatonina tenham efeito supressor na secreção de LH ou tenham efeito direto no ovário, e isso cause redução na secreção de progesterona, o que leva a falhas na manutenção da gestação (LOVE; EVANS; KLUPIEC, 1993), podendo prejudicar o desenvolvimento normal da prole de matrizes tratadas com melatonina durante a gestação. No entanto, Tast (2002), relatou que programas de iluminação artificial podem manipular o ritmo circadiano de secreção de melatonina, reduzindo a taxa de prenhez em porcas, em decorrência da queda dos níveis de progesterona.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMAWI, W.Y.; LIPMAN, M.L.; STEVENS, A.C.; ZANKER, B.; HADRO, E.T.; STROM, T.B. Abrogation of glucocorticoid-mediated inhibition of T cell proliferation by the synergistic action of IL-1, IL-6, and IFN-gamma. **J. Immunol.** v. 146, n. 10, p. 3523-3527, 1991.

AOYAMA, H.; MORI, W.; MORI N. Anti-Glucocorticoid Effects of melatonin in young rats. **Acta Pathol. Jpn.** v. 36, n. 3, p. 423-428, 1986.

ATKINSON, H.C.; WADDELL, B.J. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rat pregnancy and lactation: circadian variation and interrelationship of plasma adrenocorticotropin and corticosterone. **Endocrinology.** v. 136, p. 512-520, 1995.

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

BEITINS, I.Z.; BAYARD, F.; ANCES, I.G.; KOWARSKI, A.; MIGEON, C.J. The metabolic clearance rate, blood production, interconversion and transplacental passage of cortisol and cortisone in pregnancy near term. **Pediatr. Res.** v.7, p. 509-519, 1973.

BERGER, J. A two-clock model of circadian timing in the immune system of mammals. **Pathol. Biol.** v. 56, p. 286 – 291, 2008.

BLANCHARD, B.; POMPOM, D.; DUCROCQ, C. Nitrosation of melatonin by nitric oxide and peroxynitrite. **J. Pineal Res.** v. 29, p. 184-192, 2000.

BRENNER, B.M.; GARCIA, D.L.; ANDERSON, S. Glomeruli and blood pressure: Less of one, more the other? **Am. J. Hypertens.** v. 1, p. 335-347, 1988.

BROWN, G.M.; PANG, C.S.; PANG, S.F. Binding sites for 2- [125I] iodomelatonin in the adrenal gland. **Biol. Signals.** v. 3, p. 91-8, 1994.

BRUDER, E.D.; PING C.L.; RAFF H. Metabolic consequences of hypoxia from birth and dexamethasone treatment in the neonatal rat: comprehensive hepatic lipid and fatty acid profiling. **Endocrinology.** v. 145, n. 11, p. 5364 – 5372, 2006.

BRZEZINSKI, A.; LYNCH, H.J.; SEIBEL, M.M.; DENG, M.H.; NADER, T.M.; WURTMAN, R.J. The circadian rhythm of plasma melatonin during the normal menstrual cycle and in amenorrheic women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v. 66, p. 891-895, 1988.

CARLOS, R.Q.; SEIDLER, F.J.; SLOTKIN, T.A. Fetal dexamethasone exposure alters macromolecular characteristics of rat brain development: a critical period for regionally selective alterations? **Teratology.** v. 46, p.45-59, 1992.

CARRILLO-VICO, A.; CALVO, J.R.; ABREU, P.; LARDONE, P.J.; GARCÍA-MAURIÑO, S.; REITER, R.J.; GUERRERO, J.M. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. **FASEB J.** v.18, n. 3, p. 537-539, 2004.

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

CIPOLLA-NETO, J. ; AFECHE, S.C. Glândula pineal. In: Aires MM (Ed.). **Fisiologia.** 3 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p.981-990, 2008.

CIPOLLA-NETO, J.; AFECHE, S.C. Glândula Pineal. In: Aires MM (coord.). **Fisiologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 805-811,1999.

COMMENTZ, J.C.; HELMKE, K. Precocious puberty and decreased melatonin secretion due to a hypothalamic hamartoma. **Horm. Res.**, v. 44, n. 6, p. 271-275, 1995.

CORREIA, J.S.; ARAÚJO, A.C.C.; SILVA, F.C.A.; MAIA, C.S.; JÚNIOR, P.E.A.; SILVA JÚNIOR, V.A.; TEIXEIRA, V. W.; TEIXEIRA, A.A.C. Aspectos Morfológicos da Adrenal de ratas submetidas à ausência de luz. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 69, p.108-110, 2002.

CUZZOCREA, S.; REITER, R.J. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. **Eur. J. Pharmacol.** v. 426, p.1-10, 2001.

DAIR, E.L.; SIMÕES, R.S.; SIMÕES, M.J.; ROMEU, L.R.; OLIVEIRA-FILHO, R.M.; HAIDAR, M.A. Effects of melatonin on the endometrial morphology and embryo implantation in rats. **Fertil. Steril.** v. 89, p.1299-305, 2008.

DEARDEN, L.C.; MOSIER, H.D. Ultrastructure of rat fetal lung after various glucocorticoid treatments. **An. Anat. Norm.** v. 6, n. 6, p. 146-150, 1988.

DHABHAR, F.S.; MILLER, A.H.; MCEWEN, B.S.; SPENCER, R.L. Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. **J. Immunol.** v. 154, n. 10, p. 5511-5527, 1995.

DHABHAR, F.S.; MILLER, A.H.; MCEWEN, B.S.; SPENCER, R.L. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. **J. Immunol.** v. 157, n. 4, p. 1638-1644, 1996.

DIAZ, B.; BLASQUEZ, E. Effect of pinealectomy on plasma glucose, insulin and glucagon levels in the rat. **Horm. Metab. Res.** v. 18, p. 225-229, 1986.

DIEDERICH, S.; EIGENDORFF, E.; BURKHARDT, P.; QUINKLER, M.; BUMKE-VOGT, C.; ROCHEL, M.; SEIDELMANN, D.; ESTERLING, P.; OELKERS, W.; BÄHR, V. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2: A important pharmacokinetic determinant for the activity of synthetic mineralo- and glucocorticoids. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v. 87, n. 12, p. 5695-5701, 2002.

DOUGLAS, C.R. **Fisiologia aplicada à nutrição**. 2 ed. Rio de Janeiro, Editora. Guanabara Koogan. 2006. 1124p.

EL-SOKKARY, G.H.; REITER, R.J.; ABDEL-GHAFFAR, S.K.H. Melatonin supplementation restores cellular proliferation and DNA synthesis in the splenic and thymic lymphocytes of old rats. **Neuro Endocrinol. Lett.**, v. 24, n. 3-4, p.215-223, 2003.

EVÊNCIO, J. N. Efeitos da melatonina na adrenal de ratos pinealectomizados. São Paulo, 1998, 54p. [Tese apresentada a Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina, para obtenção do título de Doutor em Ciências].

FAAS, M.M.; BOUMAN, A.; NIEUWENHOVEN, A.L.V.V.; SCHAAF, G.V.D.; MOES, H.; HEINEMAN, M.J.; VOS, P. Species differences in the effect of pregnancy on lymphocyte cytokine production between human and rat. **J. Leukocyte Biol.** v. 78, p. 946 – 953, 2005.

FERREIRA, Z.S.; MARKUS, R.P. Characterization of P2Y(1)-like receptor in cultured rat pineal glands. **Eur. J. Pharmacol.** v.415, p.151-156, 2001.

FRANKEL, B.J.; STRANDBERG, M.J. Insulin release from isolated mouse islets in vitro: no effect of physiological levels of melatonin or arginine vasotocin. **J. Pineal. Res.** v. 11, p. 145-8, 1991.

HANSEN, D.K.; LABORDE, J.B.; WALL, K.S.; HOLSON, R.R.; YOUNG, J.F. Pharmacokinetic considerations of dexamethasone-induced developmental toxicity in rats. **Toxicol. Sci.** v. 48, n. 2, p. 230-239, 1999.

HAYNESWORTH, S.E.; BABER, M.A.; CAPLAN, A.I. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1. **J. Cell Physiol.** v. 166, n. 3, p. 585-592, 1996.

HRISTIC, M.; KALAFATIC, D.; PLECAS, B.; JOVANOVIC, V. The effect of dexamethasone on the adrenal gland in fetal and neonatal rats. **J. Exp. Zool.** v. 272, p. 21-90, 1995.

JIMENEZ, J.L.; NICOLAS, J.G.; ALVAREZ, S.; FRESNO, M.; FERNANDEZ, MAM. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 replication in human T lymphocytes by nitric oxide. **J. Virol.** v. 75, p. 4655-4663, 2001.

JOHNSON, L.Y.; VAUGHAN, M.K.; RICHARDSON, B.A.; PETTERBORG, L.J.; REITER, R.J. Variation in pineal melatonin content during the estrous cycle of the rat. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v.169, p. 419, 1982.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica - Texto e Atlas.** 10. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008. 488p.

KACHI, T.; QUAY, W.B.; BANERTI, T.K.; IMAGAWA, T. Effects of pinealectomy on the mitotic activity of adrenomedullary chromaffin cells in relation to time of day. **J. Pineal Res.** v. 8, p. 21-34, 1990.

KIERSZEMBAUM, A. L. **Histologia e biologia celular: uma introdução a patologia.** 2º Ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2004. 696p.

KINSON, G.A; SINGER, B.; GRANT, L. Adrenocortical hormone secretion at various time intervals after pinealectomy in the rat. *Gen Comp.* **Endocrinol.** v. 10, p. 317-323, 1968.

LANOIX, D.; OUELLETTE, R.; VAILLANCOURT, C. Expression of melatoninergic receptors in human placental choriocarcinoma cell lines. **Human Reprod.**, v. 21, n. 8, p. 1981 – 1989, 2006.

LEVITT, N.S.; LINDDAY, R.S.; HOLMES, M.C.; SECKL, J.R. Dexamethasone in the last week of pregnancy attenuates hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and elevates blood pressure in the adult offspring in the rat. **Neuroendocrinology**, v. 64, p. 412-418, 1996.

LIMA, F.B.; MACHADO, U.F.; BARTOL, I.; SERAPHIM, P. M.; SUMIDA, D.H.; MORAES, S.M.F.; HELL, N.S.; OKAMOTO, M.N.O.; SAAD, M.J.; CARVALHO, C.R.O.; CIPOLLA-NETO, J. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cells responsiveness to insulin in rats. **Am. J. Physiol.** v. 275, p. E934-E941, 1998.

LIMA, L. M. B.; LIMA, M.A.; RITA, C.V.C.; OLIVEIRA, P.F.; REIS, L.C.; BORGES, M.F.; SILVA, G.P. Influência da pineal sobre a morfologia do córtex da adrenal. **Medicina**. v. 35, p. 36-40, 2002.

LOVE, R.J.; EVANS, G.; KLUPIEC, C. Seasonal effects on fertility in gilts and sows. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** v. 48, p. 191-206, 1993.

MAEKAWA, R.; TAMURA, H.; TANIGUCHI, K.; TAKETANI, T.; SUGINO, A. Role and regulation of maternal melatonin during pregnancy in rats. **Biol. Reprod.** v. 77, p. 105 – 110, 2007.

MAGANHIN, C.C.; FERRAZ, A.A.C.; HALLEY, J.H.; FUCHS, L.F.P.; OLIVEIRA-JÚNIOR, I.S.; SIMÕES, M.J. ; SIMÕES, R.S.; BARACAT, E.C.; SOARES, J. M. Efeitos da melatonina no sistema genital feminino:breve revisão. **Ver. Assoc. Med. Bras.** v. 54, n. 3, p. 267-71, 2008.

MARKUS, R.P.; AFECHE, S.C.; BARBOSA, E.M.; LOTUFO, C.M.C.; FERREIRA, Z.S.; CIPOLLA-NETO, J. Glândula Pineal e melatonina. In: Marques. N.; Menna Barreto L. (coord.). **Cronobiologia: princípios e aplicações**. 3º ed. São Paulo. EDUSP, p. 191-222, 2003.

MARTINS, E.J.; FERNANDES, L.C.; BARTOL, I.; CIPOLLA-NETO, J.; COSTA ROSA, L.F. The effect of melatonin chronic treatment upon macrophage and lymphocyte metabolism and function in Walker-256 tumor-bearing rats. **J. Neuroimmunol.** v. 82, n. 1, p.81-89, 1998.

MILCU, S.M.; NANU-IONESCU, I.; MILCU, I. The effect of pinealectomy on the plasma insulin rats. In: WOLTENSHOLME G.E.W.; KNIGHT J. **The Pineal Gland**. eds. Edinburg: Churchill Livingstone, p. 354-357, 1971.

MOR, F.; COHEN, I.R. IL-2 rescues antigen-specific T cells from radiation or dexamethasone-induced apoptosis. Correlation with induction of Bcl-2. **J. Immunol.** v. 156, p. 515 – 522, 1996.

NAJI, L.; CARRILLO-VICO, A.; GUERRERO, J. M.; CALVO, J. R. Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs. **Life Sci.** v. 74, n. 18, p. 2227-2236, 2004.

NYIRENDA, M. J.; LINDSAY, R.S.; KENYON, C.J.; BURCHELL, A.; SECKL, J.R. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. **J. Clin. Invest.** v. 101, n. 10, p. 2174–2181, 1998.

OHTA, Y.; KONGO, M.; KISHIKAWA, T. Therapeutic effect of melatonin on cholestatic liver injury in rats with bile duct ligation. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 527, p. 559-565, 2003.

OKATANI, Y.; WAKATSUKI, A.; REITER, R.J.; ENZAN, H.; MIYAHARA, Y. Protective effect of melatonin against mitochondrial injury induced by ischemia and reperfusion of rat liver. **Eur. J. Pharmacol.** v. 469, n. 1-3, p. 145-152, 2003.

ORTIZ, L.A.; QUAN, A.; WEINBERG, A.; BAUM, M. Effect of prenatal dexamethasone on rat renal development., **Kidney Int.** v. 59, p. 1663-1669, 2001.

OSTENSEN, M. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs during pregnancy. **J. Rheumatol. Suppl.** v. 107, p. 128-132, 1998.

PANG, C.S.; TANG, P.L.; PANG, S.F.; BROWN, G.M. Comparison of the pharmacological characteristics of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin binding sites in the lung, spleen, brain and kidney of chicken. **Biol. Signals.** v. 4, p. 311 – 324, 1995.

PEKELMANN, R.M.; MONTANI, E.J.; BARBOSA, J.; FERREIRA, Z.S. Ritmos biológicos: entendendo as horas, os dias e as estações do ano. **Einstein.** v. 1, p. 143-148, 2003.

PELTONIEMI, O.A.T.; TAST, A.; LOVE, R.J. Factors effecting reproduction in the pig: seasonal effects and restricted feeding of the pregnant gilt and sow. **Anim. Reprod. Sci.** v. 60-61, p. 173-184, 2000.

PEREIRA, D.S.; TUFIK, S.; PEDRAZZOLI, M. Moléculas que marcam o tempo: implicações para os fenótipos circadianos, Timekeeping molecules: implications for circadian phenotypes. **Rev. Bras. Psiquiatr.** v. 31, n. 1, p. 63-71, 2009.

POIRIER, J.; RIBADEAU, J.D.; CATALA, M.; ANDRÉ, J.M.; GHERARDI, R.K.; BERNAUDIN, J.F. **Histologia molecular - Texto e Atlas.** 1º ed. São Paulo: Editora Santos, 2002. 430p.

POON, A.M.S.; PANG, S.F. 2[125I] iodomelatonin binding sites in spleens of guineapigs. **Life. Sci.** v. 50, p. 1719 – 1726, 1992.

RANDLER, C.; SCHAAL, S. Morningness-eveningness, habitual sleep-wake variables and cortisol level. **Biol. Physical.** v. 85, n. 1, p.14-18, 2010.

RASMUSSEN, D.D.; BOLDT, M.D.; WILKINSON, C.W.; YELLON, S.M.; MATSUMOTO, A.M. Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. **Endocrinology.** v. 140, n. 2, p. 1009-1012, 1999.

REA, S.; JAMES, D.E. Perspective in Diabetes- Moving GLUT4-The biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. **Diabetes.** v. 46, p.1667-1677, 1997.

REITER, R.J. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. **Prog. Neurobiol.** v. 56, p. 359-384, 1998.

REITER, R.J.; TAN, D.X.; BURKHARDT, S. Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. **Mech. Ageing. Dev.** v. 123, p. 1007-1019, 2002.

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

SARAIVA, E. M.; SOARES, J.M.F.; GAVINA, C. Oscilações do cortisol na depressão sono-vigília. **Revista Portuguesa de Psicossomática.**v. 7, n. 1-2, p. 89-100, 2005.

SENER, G.; SEHIRLI, A.O.; SATIROGLU, H.; KEYER-UYSAL, M.; YEGEN, B.C. Melatonin prevents oxidative kidney damage in a rat model of thermal injury. **Life Sci.** v. 70, p. 2977–2985, 2002.

SHIDA, C.S.; CASTRUCCI, A.M.L.; LAMY-FREUND, M.T. High melatonin solubility in aqueous medium. **J. Pineal Res.** v. 16, p. 198-201, 1994.

SILVA, S.O. Oxidação de melatonina e formação de N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina: possíveis efeitos biológicos. São Paulo, 2005, 91p. [Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo].

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

SLOBODA, D.M.; CHALLIS, J.R.; MOSS, T.J.; NEWNHAM, J.P. Synthetic glucocorticoids: antenatal administration and long-term implications. **Current Pharmaceutical Design**, v.11, n.11, p.1459 –1472, 2005.

SLOTKIN, T.A.; SEIDLER, F.J.; KAVLOCK, R.J.; BARTOLOME, J.V. Fetal dexamethasone exposure impairs cellular development in neonatal rat heart and kidney: effects on DNA and protein in whole tissues. **Teratology.** v. 43, p. 301-306, 1991.

SONG, Y.; CHAN, C.W.; BROWN, G.M.; PANG, S.F.; SILVERMAN, M. Studies of the renal action of melatonin: evidence that the effects are mediated by 37 kDa receptors of the Mel1a subtype localized primarily to the basolateral membrane of the proximal tubule. **FASEB J.** v.11, p.93-100, 1997.

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

SOUSA NETO, J.A.; SCALDAFERRI, P.M. Melatonina e câncer – revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.51, n.1, p.49 – 58, 2005.

SOUZA, E.; KOBAYASHI, S.; SIMÕES, M.L.C.; KULAY, L.J. Effect of betamethasone on pregnant rats: Impact and on corticosterone level and maternal and fetal adrenal glands. **RBGO**. v. 23, n. 10, 2001.

SRINIVASAN, V.; MAESTRONI, G.J.M.; CARDINALI, D.P.; ESQUIFINO, A.I.; PANDI-PERUMAL, S.R.; MILLER, S.C. Melatonin, immune function and aging. **Immunity & Ageing**, v.17, n.2, p.1 – 10, 2005.

SUDNICOVICK, E.J.; MAKSIMCHIK, Y.Z.; ZABRODSKAYA, S.V.; KUBYSHIN, V.L.; LAPSHINA, E.A.; BRYZSEWSKA, M., REITER, R.J.; ZAVODNIK, I.B.. Melatonin attenuates metabolic disorders due to streptozotocin-induced diabetes in rats. **Eur. J. Pharmacol.** v. 569, n. 3, p.180-7, 2007.

SUGDEN, D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. **Experientia**. v.45, p.922-931,1989.

TAMURA, E.K. Efeito da melatonina sobre a produção endotelial de óxido nítrico in vitro e in vivo. São Paulo, 2009, 68p. [Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo].

TAN, D.X.; REITER, R.J.; MANCHESTER, L.C.; HARDELAND, R.; LOPEZ-BURILLO, S.; MAYO, J.C.; SAINZ, R.M.; REITER, R.J. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. **J. Pineal Res.** v. 34, p. 75-78, 2003.

TAST, A. Endocrinological basis of seasonal infertility in pigs. [Dissertation. University of Helsinki], Helsinki, Finland, 69p., 2002.

VENIHAKI, M.A.; CARRIGAN, P.; DIKES, P. Circadian rise in maternal glucocorticoid prevents pulmonary dysplasia in fetal mice with adrenal insufficiency. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 97, p. 7336-7341, 2000.

WADDELL, B.J.; BENEDIKTSSON, R.; BROWN, R.W.; SECKL, J.R. Tissue-specific messenger ribonucleic acid expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 and the glucocorticoid receptor within rat placenta suggests exquisite local control of glucocorticoid action. **Endocrinology**. v. 139, p. 1517 – 1523, 1998.

WARD, R.M. Pharmacologic enhancement of fetal lung maturation. **Clin. Perinatol.** v. 21, n. 3, p. 523–542, 1994.

WHITE, P.C.; MUNE, T.; AGARWAL, A.K. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. **Endocr. Rev.** v.18, p. 135-56, 1997.

ZATS, M.; WANG, H.M. High salt mimics effects of light pulses on circadian pacemaker in cultured chick pineal cells. **Am J. Physiol.** v.261, p.1424-1430, 1991.

CAPÍTULO II

Efeito da dexametasona e melatonina exógenas sobre parâmetros sanguíneos, progesterona, carboidratos totais e histomorfometria de órgãos em ratas prenhes.

Silva, S. B.¹; Soares, A. F.²; Wanderley-Teixeira, V.^{3*}; Teixeira, A. A. C.³; Vilaça, P. E. A. J.⁴

1. Aluna do programa de pós-graduação em Biociência Animal, nível de Mestrado, do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil.
2. Professor adjunto da Área Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil.
3. Professores adjuntos da Área de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil.
4. Mestre em Biociência Animal do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil.

*Autor para correspondência: Professor Doutora Valéria Wanderley Teixeira. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil. Tel.: (81) 33206389.

E-mail: valeria@dmfa.ufrpe.br

Efeito da dexametasona e melatonina exógenas sobre parâmetros sanguíneos, progesterona, carboidratos totais e histomorfometria de órgãos em ratas prenhes.

Resumo

Dexametasona é utilizada nos processos anti-inflamatórios, imunossupressores e em casos de gestação com risco de prematuridade. Porém, doses supra-fisiológicas de dexametasona podem afetar a embriogênese. A melatonina tem demonstrado prevenir efeitos deletérios dos glicocorticóides. Assim, avaliamos a influência da melatonina sobre efeitos sistêmicos da dexametasona em ratas prenhes por meio dos seguintes parâmetros: 1. Hemograma e perfil glicídico; 2. Níveis de progesterona e 3. Histomorfometria e histoquímica. Foram utilizadas 20 ratas divididas nos grupos: **I** – ratas prenhes sem tratamento (Controle); **II** – ratas prenhes tratadas com dexametasona

(0,8mg/kg); **III** - ratas prenhes tratadas com melatonina (0,5 mg/Kg); **IV**: ratas prenhes tratadas com dexametasona e melatonina. Todos os tratamentos foram iniciados 10 dias após confirmação do acasalamento até o final da gestação. O sangue foi coletado no 7^o, 14^o e 21^o dia. Após, constatado variação no hemograma nas ratas do grupo II, realizou-se novas coletas aos 14, 16, 18 e 20 dias nos grupos I e II. A dosagem de carboidratos foi realizada pelo método antrona para a leitura em microplaca. A progesterona foi dosada pelo método ELISA. O fígado rins e adrenais foram analisados histoquímica e morfometricamente e as hemácias, morfometricamente. Os resultados mostraram uma proteção da melatonina para os parâmetros sanguíneos e hormonais. O tratamento com dexametasona causou redução progressiva do número total de hemácias e anisocitose, neutrofilia, linfopenia e eosinopenia, além da redução dos níveis plasmáticos de carboidratos no 21^o dia, e da progesterona aos 14 e 21 dias de gestação. Não se evidenciaram alterações morfométricas e histoquímicas nos órgãos. A dexametasona na dosagem de 0,8 mg/Kg aplicada a partir do terço médio da gestação produz alterações hematológicas, bioquímicas e hormonais em ratas, porém, não afeta o fígado, rins e adrenais. Estes efeitos foram prevenidos pela melatonina.

PALAVRAS-CHAVE: Melatonina, glicocorticóide, hemograma, gestação, ratas.

Effect of dexamethasone and melatonin exogenous on blood parameters, progesterone, total carbohydrates and histomorphometry of organs in pregnant rats.

Abstract

Dexamethasone is used in cases anti-inflammatory, immunosuppressive and in cases of pregnancy with risk of prematurity. However, higher doses of dexamethasone can affect embryogenesis. Melatonin has been shown to prevent deleterious effects of glucocorticoids. We evaluated the influence of melatonin on systemic effects of dexamethasone to pregnant rats through the following parameters: 1. Hemogram and glucose profile, 2. Levels of progesterone and 3. Histomorphometry and histochemistry. We used 20 rats divided into two groups: I - pregnant rats untreated (control), II - pregnant rats treated with dexamethasone (0.8 mg / kg); III - pregnant rats treated with melatonin (0.5 mg / kg) IV: pregnant rats treated with dexamethasone and

melatonin. All treatments were initiated 10 days after confirmation of pregnancy. Blood was collected in the 7th, 14th and 21st days. After, observed variation in the blood count in the rats of group II, there was new collections at 14, 16, 18 and 20 days in groups I and II. Determination of carbohydrate was accomplished by anthrone method for reading plate. Progesterone was measured by ELISA. The liver kidneys and adrenals were examined histochemically and morphometrically and erythrocytes morphometrically. The results showed a protection of melatonin to blood metabolites and hormones. Treatment with dexamethasone caused a gradual reduction in the total number of red blood cells and anisocytosis, neutrophilia, lymphopenia and eosinopenia. Plasma levels of carbohydrates reduced on day 21 and progesterone at 14 and 21 days of gestation. No evidence of morphological and histochemical changes in the organs. Dexamethasone at a dosage of 0.8 mg / kg applied from the middle third of pregnancy produces hematological, biochemical and hormonal in rats, however, does not affect the liver, kidneys and adrenals. These effects were prevented by melatonin.

KEY-WORDS: Melatonin, glucocorticoid, hemogram, pregnancy, rats.

1. Introdução

A dexametasona é um glicocorticóide sintético e apresenta-se como um potente anti-inflamatório e imunossupressor (Bavaresco; Bernardi; Battastini, 2005). A aplicação pré-natal de dexametasona tem sido utilizada em casos de gestação com risco de prematuridade por acelerar o desenvolvimento de tecidos-alvos no feto, possibilitando um aumento na probabilidade de sobrevivência do prematuro (Okajima et al., 2001). Doses suprafisiológicas de dexametasona, no entanto, podem propiciar complicações como: osteoporose, osteonecrose, insuficiência da glândula supra-renal, imunodepressão, hiperglicemia, hipertensão arterial sistêmica, anormalidades hidreletrolíticas e possível risco de úlceras pépticas (Rhodus et al., 2006).

O tratamento com dexametasona pode afetar ainda a embriogênese (Hansen et al., 1999). Alguns órgãos como o pâncreas, o fígado e os rins podem apresentar alterações morfofuncionais atribuídas a corticoterapia (Bruder; Ping; Raff, 2006). A dexametasona exerce influência sobre a distribuição de células sanguíneas através da inibição da expressão de citocinas (Haynesworth; Baber; Caplan, 1996), redução drástica do

número linfócitos T, elevação acentuada de neutrófilos, além de uma redução acentuada dos linfócitos B, células NK (natural killer) e monócitos (Dhabhar, et al., 1996).

A glândula pineal é um órgão endócrino, formado por células com função neurosecretora, os pinealócitos, e pelas células intersticiais semelhantes às células da glia. A melatonina, uma indolamina, é o mais bem estudado dos produtos pineais (Carrillo-vicco et al., 2004). Segundo Aoyama; Mori; Mori (1986) a administração de hormônio melatonina da pineal em ratas fêmeas jovens preveniu os efeitos deletérios como diminuição do ganho de peso corporal, atrofia do timo e das adrenais, glicosúria, elevação do nível de açúcar no sangue, triglicerídeos e colesterol total causados por três diferentes glicocorticóides: dexametasona, prednisolona e hidrocortisona.

Os estudos que tratam das alterações de alguns órgãos como fígado, rins e adrenais relacionadas ao uso de corticóides, apontam para a melatonina como um fator capaz de reduzir os danos causados por esses efeitos, uma vez que a melatonina exerce influência sobre os corticóides naturalmente produzidos pelas adrenais e sobre hormônios esteróides. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo relacionar a influência do uso de melatonina sobre os efeitos sistêmicos da dexametasona por meio dos seguintes parâmetros: 1. Hemograma e perfil glicídico; 2. Níveis de progesterona e 3. Histomorfometria do fígado, rins, adrenais e hemácias de ratas prenhes.

2. Materiais e Métodos

Foram utilizadas 20 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*) com 90 dias de idade, virgens, pesando $200\text{g} \pm 30\text{g}$, da linhagem Wistar, procedentes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE. As fêmeas foram confinadas em gaiolas e mantidas com alimentação e água “*add libitum*”, a uma temperatura de 22°C e iluminação artificial que estabeleceram um fotoperíodo de 12 horas luz/12 horas escuro. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética institucional, de nº. 23082.017195/2010.

As fêmeas dos grupos experimentais foram acasaladas e após a confirmação, foram separadas, ao acaso, em quatro grupos, cada um contendo cinco animais, a saber: **Grupo I** – ratas prenhes sem tratamento (Controle); **Grupo II** – ratas prenhes tratadas com dexametasona 10 dias após a confirmação do acasalamento, até o final da prenhez;

Grupo III - ratas prenhes tratadas com melatonina 10 dias após a confirmação do acasalamento, até o final da prenhez; **Grupo IV**: ratas prenhes tratadas com dexametasona e melatonina 10 dias após a confirmação do acasalamento, até o final da prenhez.

Para o experimento foi utilizado a formulação comercial Decadron® (fosfato dissódico de dexametasona) administrado por via intraperitoneal nas ratas dos grupos II e IV, na dose de 0,8mg/kg/animal (Vilaça Júnior et al., 2008), preferencialmente em horário das 17:00 às 18:00 horas, com redução progressiva da dose em 10% até obtenção da dose zero no último dia de administração.

A administração de melatonina foi realizada nas ratas dos grupos III e IV de acordo com o protocolo estabelecido por Kim et al. (1998). A melatonina foi dissolvida diariamente em solução de etanol-salina (0,1 mL de etanol e 0,3 mL de solução salina) e administrada imediatamente por via intraperitoneal entre as 17:00 e 18:00 horas (Subramanian et al., 2007). A dose de melatonina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA) administrada foi de 0,5 mg/Kg. Como placebo foi administrado às ratas do grupo I a mesma concentração de solução salina e etanol (3:1) em pH fisiológico.

Foram realizadas coletas nas fêmeas no 7^o, 14^o e 21^o dia de prenhez. A coleta foi realizada através da punção da veia caudal lateral com uso de cateter (24G) mediante contenção mecânica (Fluttert; Dalm; Oitzl, 2000). Para subsequente obtenção do plasma parte das amostras foram submetidas à centrifugação a uma temperatura de 4°C com a velocidade de 3000rpm durante 10 minutos. O plasma obtido foi acondicionado à temperatura de -20°C. Após a última coleta, as fêmeas foram anestesiadas com xilazina (20 mg/kg) e quetamina (10 mg/kg), por via intraperitoneal. Foi realizada a abertura da cavidade abdominal para remoção total do fígado, rins e adrenais. Após a coleta dos órgãos foi realizada a eutanásia utilizando-se câmara de CO₂ seguindo as recomendações da resolução do CFMV n° 714, de 20 de julho de 2002.

Para a contagem total de eritrócitos, alíquotas de sangue total foram diluídas em solução de Hayem na proporção de 1:40 e contadas em câmara de Neubauer. Na seqüência, os resultados foram submetidos à fórmula: $Hm \times 5 \times 400 \times 10$, onde: Hm é o número total de hemácias contadas (em 1/5 mm²), 5 é o fator de conservação para 1 mm², 400 é o fator de conservação da diluição e 10 é o fator de conservação para 1 mm³ (profundidade da lâmina). Para a contagem total de leucócitos as alíquotas foram diluídas em solução de Turk na proporção de 1:20 e contadas na câmara de Neubauer. O

resultado foi submetido à seguinte fórmula: leucócitos/mm³ de sangue= Lc x 20 x 10/ 4, onde Lc é o número total de leucócitos contados em 4 mm², 4 é o fator de conservação para 1 mm³, 20 de diluição utilizada e 10 para 1 mm³ (profundidade da lâmina). A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada utilizando-se a técnica do esfregaço sanguíneo corado pelo Kit Panótico Rápido LB – Laborclin Ltda, Após a secagem, os esfregaços foram analisados ao microscópio óptico com objetiva de imersão (100x), sendo contadas 100 células através de movimentos de ziguezague sobre a lâmina em um único sentido. Os diferentes elementos foram contabilizados através da utilização de um contador eletrônico.

Para obtenção do volume do hematócrito um tubo de micro-hematócrito foi preenchido com sangue até aproximadamente $\frac{3}{4}$ de sua capacidade e submetido à centrifugação (centrifuga Sigma modelo 1-15) a 6000 rpm por 5 minutos. A altura da coluna de hemácias e leucócitos foi medida como porcentagem da coluna de sangue total em cartão especial para leitura de hematócrito. Após constatado variação no hemograma nas ratas do grupo II, realizou-se novas coletas aos 14, 16, 18 e 20 dias nos grupos I e II para averiguar em que momento essas variações tinham início e como elas se comportavam ao longo desse intervalo.

Para análise de carboidratos totais amostras de plasma foram submetidas à desproteinização, realizada com ácido tricloroacético a 5% (TCA 5%) numa proporção de 1:10, diluídas e centrifugadas a velocidade de 3000rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi mantido à temperatura de 4°C. Para a preparação da curva de calibração foi utilizada uma solução estoque de glicose em água destilada na concentração 1g/L. Foram realizadas sucessivas diluições e as concentrações utilizadas foram: 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125 e 0.01562g/L. Como branco utilizou-se água destilada. Para a dosagem de carboidratos totais do sangue foi utilizado o protocolo adaptado de Laurentini; Edwards (2003). As amostras e padrões foram submetidos à leitura do comprimento de onda de 620nm em leitora de microplaca (Anthos 2010 Microplate Absorbance Reader, Biochrom Ltd, Cambridge, UK).

Os níveis do hormônio progesterona foram dosados utilizando-se o método enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), através de KIT's comerciais.

O fígado, rins e adrenais coletados foram fixados em Formol 10% tamponado por 24 horas, desidratados em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol e impregnados para inclusão em parafina. Em seguida, os cortes foram submetidos à

técnica de coloração pela Hematoxilina-Eosina (HE). Para histoquímica do fígado e adrenais empregou-se os corantes Ácido periódico de Schiff (PAS) e Impregnação argêntica.

O estudo morfométrico do fígado foi realizado segundo a metodologia descrita por Engelman et al. (2001), utilizando uma quadrícula com 100 pontos-teste, colocada sobre os cortes das preparações histológicas coradas pelo HE. A contagem foi feita em cinco lâminas por grupo. Para morfometria dos rins foram utilizadas cinco lâminas de cada grupo e analisados 10 glomérulos em cada lâmina. As medidas foram restritas aos glomérulos que demonstraram, num único corte, os pólos vascular e urinário. A captura da imagem foi efetuada por meio de câmera de Vídeo Sony[®], acoplada ao microscópio Olympus[®] Bx50. A morfometria foi realizada através de aplicativo Morfometria de Linhas, calibrado em micrômetros, associado ao programa Optimas[®] 6.2 para Windows. Para a obtenção da área glomerular o cursor foi posicionado na área central deste, estabelecendo-se, a partir daí, uma linha circular externa, coincidente com os limites do tufo glomerular. Foi utilizada a mesma metodologia para a mensuração da cápsula de Bowman (Akaoka; White; Raafat, 1994). Lâminas contendo corte das adrenais foram avaliadas quanto à área da zona da cortical e medular, utilizando-se a mesma metodologia para a morfometria dos glomérulos renais citada anteriormente.

Para morfometria das hemácias no período de 14 e 21 dias de gestação dos grupos experimentais, foram utilizadas 15 lâminas/grupo/período, sendo mensuradas 100 células por lâmina por meio de régua milimetrada.

Análise Estatística

Os dados obtidos dos parâmetros hematológicos, carboidratos totais, níveis hormonais, bem como os dados morfométricos das hemácias, adrenais, fígado e rins foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, onde as médias obtidas foram comparadas pelo teste de Wilcoxon Mann-Whitney ($p < 0,05$). As amostras para as análises hematológicas, carboidratos totais e níveis hormonais foram tomadas em triplicatas.

3. Resultados

3.1. Parâmetros hematológicos

Nas tabelas 1, 2 e 3 estão sumarizadas as médias e desvio-padrão do hematócrito, número total de hemácias, número total de leucócitos e contagem diferencial dos leucócitos, das matrizes, no 7^o, 14^o e 21^o dias de gestação, respectivamente. No 7^o dia de gestação não houve alteração significativa nos parâmetros analisados nos grupos experimentais (Tabela 1). No entanto, aos 14 dias de gestação houve aumento significativo do volume de hematócrito e redução do número total de hemácias e leucócitos. A contagem diferencial dos leucócitos revelou uma significativa neutrofilia, linfopenia e eosinopenia nas matrizes tratadas com dexametasona, em relação aos outros grupos experimentais (Tabela 2). No terço final da gestação as fêmeas do grupo tratado com dexametasona apresentaram redução dos valores de hematócrito, redução do número total de hemácias e leucócitos, além de neutrofilia, linfopenia e eosinopenia (Tabela 3). Após ter constatado variação significativa no hematócrito e na contagem total de hemácias e leucócitos nas ratas tratadas apenas com dexametasona nos intervalos de 14 e 21 dias, foram feitas novas análises aos 14, 16, 18 e 20 dias de prenhez nas ratas dos grupos I e II. De acordo com análise estatística verificou-se que no grupo II, em relação ao grupo controle, o valor do hematócrito apresentou-se elevado aos 14 dias, normalizando-se aos 16 e 18 dias, porém reduzindo significativamente no 20^o dia. Já as hemácias e leucócitos diminuíram progressivamente ao longo dos intervalos analisados, bem como os linfócitos e eosinófilos, porém os neutrófilos aumentaram progressivamente (Tabelas 4, 5, 6 e 7). Como intuito de verificar uma possível anisocitose realizou-se medição do diâmetro das hemácias de todos os grupos experimentais. As fêmeas do grupo II apresentaram hemácias com diâmetro significativamente menor em relação aos outros grupos (Tabela 8).

3.2. Níveis plasmáticos de carboidratos totais e progesterona

Os níveis séricos de glicose nas matrizes no 7^o e 14^o dia de prenhez não apresentaram variação significativa, porém houve diminuição no grupo II em relação aos outros grupos experimentais no 21^o de gestação (Tabela 9). A dosagem dos níveis séricos de progesterona revelou uma diminuição significativa desse hormônio aos 14 e 21 dias de prenhez nas ratas do grupo tratado com dexametasona (Tabela 10).

3.4. Morfometria e histoquímica dos órgãos

De acordo com a análise estatística não houve influência dos tratamentos sobre os parâmetros morfométricos no fígado, rins e adrenais (Tabela 11). Também não foram evidenciadas alterações histoquímicas nesses órgãos (Fig. 1).

4. Discussão

Os corticóides atuam sobre o efeito da circulação de leucócitos; interferindo no mecanismo da imunidade linfocitária; modulando os mediadores da inflamação e modificando as proteínas, carboidratos e o metabolismo de gorduras. Seus efeitos sobre os componentes do sistema imune são: em relação aos neutrófilos = neutrofilia, depressão da quimiotaxia, depressão da marginação, depressão da fagocitose, depressão da reação de citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpo, depressão da atividade bactericida; linfócitos = depressão da proliferação, depressão da resposta das células T, prejuízos aos mediadores citotóxicos de células T, depressão da produção de IL-2, depressão da produção de linfocinas (Dell'aqua Junior, 2004).

Cupolilo et al. (2007) realizaram experimentos com camundongos fêmeas (*Swiss Webster*), administrando doses imunossupressoras (5 mg/Kg) e antiinflamatórias (1,5 mg/Kg) de dexametasona via intraperitoneal, durante 12 dias. Estes autores observaram redução no número global de leucócitos em ambos os grupos (embora mais acentuada no grupo que recebeu dose imunossupressora). Em nossos estudos, encontramos resultados semelhantes, ocorrendo ao 14º dia de gestação uma redução do número total de leucócitos, além de neutrofilia, linfopenia e eosinopenia nas ratas do grupo II, em relação aos outros grupos experimentais. No terço final (21º dia) da gestação esses resultados foram mantidos. Isso revela que a administração contínua a partir do décimo dia até o fim da gestação, mesmo com a redução progressiva da dose, possui efeitos imunossupressores. Segundo Giglio; Alippi; Bozzini (1980) a administração de dexametasona induz uma redução característica da síntese de eritropoetina, além de reduzir também a eritropoese. No presente trabalho, ao 14º e 21º dia de gestação observou-se uma redução significativa no número de hemácias nas ratas do grupo II, o que pode está associado à redução da eritropoese. Além disso, verificou-se uma anisocitose do tipo micrócito nas hemácias das fêmeas do grupo II, sugerindo um quadro de anemia, ao passo que nos demais grupos essa característica manteve-se normal, inclusive no grupo IV.

Os glicocorticóides também provocam alterações como redução da volemia e aumento da osmolaridade do sangue, pois interferem nos mecanismos de reabsorção de íons (Seckl, 2004). Em nosso trabalho observamos um aumento no hematócrito nas ratas do grupo II ao 14º dia de prenhez que pode sugerir uma disfunção renal (desequilíbrio de sódio, potássio, cloro e outros eletrólitos) em razão da presença da dexametasona levando a um quadro de desidratação que é a causa mais comum de aumento do hematócrito. Já no 21º dia de prenhez, o hematócrito das ratas do grupo II sofreu uma diminuição significativa em relação aos outros grupos experimentais, sugerindo um quadro de anemia.

A melatonina quando associada à dexametasona exerceu um efeito protetor em todos os parâmetros sanguíneos analisados. Segundo Maestroni (1998) a hematopoese é aparentemente influenciada pela ação da melatonina. Além disso, estudos realizados por Lissoni et al., (2003) em pacientes com câncer metastático de pulmão submetidos a uma terapia com quimioterápicos contendo cisplatina, conhecida por induzir a anemia, observaram que os níveis de hemoglobina eram maiores quando os pacientes eram tratados concomitantemente com melatonina. Segundo Srinivasan et al. (2005), a melatonina é benéfica tanto a resposta imune celular quanto a humoral. Ela estimula a produção de citocinas e a produção de células progenitoras de granulócitos, macrófagos, células NK e algumas células T auxiliares (CD4+). Isso explica o efeito imunoprotetor exercido pela melatonina quando administrada nas ratas do grupo IV.

Santos; Rafacho; Bosqueiro (2007) administraram dexametasona (1mg/kg), em diferentes períodos (24h, 72h e 120h), em ratos machos com 90 dias de idade e observaram que os efeitos dos glicocorticóides sobre o metabolismo são particularmente dependentes da dose e do tempo de administração. Estes autores observaram que ocorreu um aumento dos níveis circulantes de insulina plasmática após 24 horas de administração da droga juntamente com pequena elevação das concentrações de glicose sanguínea e estes níveis de glicose acentuaram-se nos ratos tratados com dexametasona por 120 horas, estabelecendo-se um quadro de resistência a insulina. Em nosso estudo, porém, os níveis séricos de glicose nas ratas tratadas com dexametasona, ao 14º dia de prenhez, não apresentou variação significativa, e ao 21º dia de prenhez ocorreu uma diminuição desses níveis. Uma vez que foi realizada a redução progressiva diária da dose administrada, pode ter ocorrido uma resposta adaptativa das células β pancreáticas, pois segundo Holness; Sudgen (1997) durante a gestação ocorrem adaptações no metabolismo de carboidratos, culminando com um progressivo estado de resistência a

insulina, que impedem a metabolização da glicose materna. Esse quadro promove o aumento de glicose no início da gestação (Ericsson et al., 2007). No entanto, a administração de dexametasona durante o terço final (14º ao 19º dia) estimula a secreção de insulina suprimindo a produção endógena de glicose levando a redução dos seus níveis séricos.

Os níveis séricos de progesterona mostraram-se reduzidos aos 14 e 21 dias de prenhez apenas nas ratas do grupo II. Segundo estudos realizados por Wang; Riley; Behrman (1993), a aplicação de dexametasona até 12 dias aumenta significativamente o nível de progesterona, em até 16 dias os níveis séricos desse hormônio são reduzidos em cerca de 50% e, completamente deprimidos após 19 dias de tratamento. No tratamento dexametasona associado com melatonina (grupo IV), verificou-se um efeito protetor da melatonina mantendo normal os níveis séricos de progesterona. Segundo Tamura et al. (2008), a melatonina, dentre outras funções, estimula a secreção da progesterona, o que reduz a contratilidade uterina e evita a rejeição imunológica do trofoblasto. Estudos realizados por Dair et al. (2008) demonstraram que as taxas de implantação e níveis séricos de progesterona estavam diminuídos em ratos pinealectomizados e que a elevação da melatonina na fase lútea pode induzir a produção de progesterona pelas células luteínicas, o que é necessário para uma gravidez bem sucedida.

A não alteração dos parâmetros morfométricos e histoquímicos no fígado, rins e adrenais, podem está relacionada ao tempo de atividade da dexametasona, pois segundo Pauli et al. (2005) esse glicocorticóide apresenta uma meia vida que varia entre 36 e 54 horas. Outro fato pode está relacionado ao desmame efetuado nas ratas tratadas com dexametasona.

5. Conclusão

A dexametasona na dosagem de 0,8 mg/Kg aplicada a partir do terço médio da gestação produz alterações hematológicas, bioquímicas e hormonais em ratas, porém, não afeta o fígado, rins e adrenais, quanto aos parâmetros morfométricos e histoquímicos. Estes efeitos foram prevenidos pela melatonina.

5. Referências

- AKAOKA, K.; WHITE, R. H.; RAAFAT, F. Human glomerular growth during childhood: a morphometric study. **J. Pathol.**, v. 173, p. 261-268, 1994.
- AOYAMA, H.; MORI, W.; MORI, N. Anti-Glucocorticoid Effects of melatonin in young rats. **Acta Pathol. Jpn.** v. 36. p. 423-428, 1986.
- BAVARESCO, L.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O. Glicocorticóides: Usos clássicos e emprego no tratamento do câncer. **Infarma.** v. 17, n. 7-9, p. 58-60, 2005.
- BRUDER, E. D.; PING, C. L.; RAFF, H. Metabolic consequences of hypoxia from birth and dexamethasone treatment in the neonatal rat: comprehensive hepatic lipid and fatty acid profiling. **Endocrinology.** v. 145, n. 11, p. 5364 – 5372, 2006.
- CARRILLO-VICO, A.; CALVO, J. R.; ABREU, P.; LARDONE, P. J.; GARCÍA-MAURIÑO, S.; REITER, R. J.; GUERRERO, J. M. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. **FASEB J.** v.18, n. 3, p. 537-539, 2004.
- CUPOLILO, S. M. N.; GOLLNER, A. M.; SOUZA, R. L. P.; TIAGO, D. A. G.; LIMA, V. B. R.; LIMA, T. S. Investigação de efeitos lesivos de doses antiinflamatórias e imunossupressoras de dexametasona sobre a mucosa gástrica em camundongos. **HU rev.**, v.33, n.1, p.17-22, 2007.
- DAIR, E. L.; SIMÕES, R. S.; SIMÕES, M. J.; ROMEU, L. R. G.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; HAIDAR, M. A.; BARACAT, E. C.; SOARES, J. M. Effects of melatonin on the endometrial morphology and embryo implantation in rats. **Fertility and Sterility.** v. 89, n.5, p.1299-1305, 2008.
- DELL'AQUA JUNIOR, J. A. Efeito da córtico-terapia e plasma seminal na resposta inflamatória e fertilidade de éguas submetidas à inseminação artificial. São Paulo, 2004, 120p. [Tese de Doutorado- Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho].
- DHABHAR, F. S.; MILLER, A. H.; MCEWEN, B. S.; SPENCER, R. L. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. **J. Immunol.** v. 157, n. 4, p. 1638-1644, 1996.
- ENGELMAN, M. F. B.; NETO, J. G.; ANDRADE, C. H. V.; HERNANDEZ, R.; GOULART, L. B. N. T. Estudo morfométrico do fígado de ratos submetidos a doses supra-fisiológica de tiroxina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v. 45, n.2, 2001.
- ERICSSON, A.; SALJO, K.; SJOSTRAND, E.; JANSSON, N.; PRASAD, P. D.; POWELL, T. L.; JANSSON, T. Brief hyperglycaemia in the early pregnant rat

increases fetal weight at term by stimulating placental growth and affecting placental nutrient transport. **J. Physiol.**, v. 581, n.3, p. 1323–1332, 2007.

FLUTTERT, M.; DALM, S.; OITZL, M. S. A refined method for sequential blood sampling by tail incision in rats. **Lab. Anim.**, v.34, p.372 - 378, 2000.

GIGLIO, M. J.; ALIPPI, R. M.; BOZZINI, C. E. Inhibition by dexamethasone of erythropoietin-induced amplification of the erythropoietin-responsive cell compartment. **Exp. Hematol.**, v.9, n.4, p.444-448, 1981.

HANSEN, D. K.; LABORDE, J. B.; WALL, K. S.; HOLSON, R. R.; YOUNG, J. F. Pharmacokinetic considerations of dexamethasone-induced developmental toxicity in rats. **Toxicol. Sci.** v. 48, p.230-239, 1999.

HAYNESWORTH, S. E.; BABER, M. A.; CAPLAN, A. I. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1. **J. Cell Physiol.** v. 166, n. 3, p. 585-592, 1996.

HOLNESS, M. J.; SUGDEN, M. C. Glucoregulation during progressive starvation in late pregnancy in the rat. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 272, n.4, p. E556-E561,1997.

KIM, Y. S.; JOO, W. S.; JIN, B. K.; CHO, Y. H.; BAIK, H. H.; PARK, C. W., Melatonin protects 6-OHDA- induced neuronal death of nigrostriatal dopaminergic system. **Neuroreport.**, v. 9, n.10, p. 2387- 2390, 1998.

LAURENTINI, A.; EDWARDS, C. A. A microtiter modification of the anthrone-sulfuric acid colorimetric assay for glucose-based carbohydrates. **Anal. Biochem.** v. 315, p. 413-415, 2003.

LISSONI, P.; MALUGANI, F.; BUKOVEC, R.; BORDIN, V.; PEREGO, M.; MENGO, S.; ARDIZZOIA, A.; TANCINI, G. Reduction of cisplatin-induced anemia by the pineal indole 5-methoxytryptamine in metastatic lung cancer patients. **Neuro. Endocrinol. Lett.** v. 24, n. 1-2, p. 83-85, 2003.

MAESTRONI, G. J.; The photoperiod transducer melatonin and the immune-hematopoietic system. **J. Photochem. Photobiol.** v.43, n. 3, p.186-192, 1998.

OKAJIMA, S.; MATSUDA, T.; CHO, K.; MATSUMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.;

FUJIMOTO, S. Antenatal dexamethasone administration impairs normal postnatal lung growth in rats. **Pediatric Research**. v. 49, n. 6, p. 777-781, 2001.

PAULI, J. R.; LEME, J.; CRESPILO, D.; MELLO, M. A. ; ROGATTO, G.; LUCIANO, E. Influência do treinamento físico sobre parâmetros do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal de ratos administrados com dexametasona. **Rev. Port. Cien. Desp.** n.2, v.5, p.143–152, 2005.

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

SANTOS, C. L.; RAFACHO, A.; BOSQUEIRO, J. R. Efeitos da administração de dexametasona *in vivo* sobre glicemia, insulinemia e substratos circulantes são dependentes do tempo de tratamento. **Biosci. J.**, v. 23, n. 3, p. 101-110, 2007.

SECKL, J. R. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases: changing glucocorticoid action. **Curr. Opin. Pharmacol.** v.4, p. 597-602, 2004.

SRINIVASAN, V.; MAESTRONI, G. F.; CARDINALI, D. P.; ESQUIFINO, A. I.; PERUMAL, S. R.; MILLER, S. C. Melatonin, immune function and aging. **Immun. Ageing**. v. 29, n.2, p.17, 2005.

SUBRAMANIAN, P.; MIRUNALINI, S.; DAKSHAYANI, K. B.; PANDI-PERUMAL, S. R.; TRAKHT, I.; CARDINALI, D. P. Prevention by melatonin of hepatocarcinogenesis in rats injected with *N-nitrosodiethylamine*. **Journal of Pineal Research**. v. 43, p. 305–312, 2007.

TAMURA, H.; NAKAMURA, Y.; TERRON, M. P.; FLORES, L. J.; MANCHESTER, L. C.; TAN, D.; SUGINO, N.; REITER, R. J. Melatonin and pregnancy in the human. **Reproductive Toxicology**. v. 25, p.291-303, 2008.

VILAÇA-JÚNIOR, P. E. A.; TEIXEIRA, A. A. C.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; MORAES, E. F.; ARAÚJO, A. C. C.; MAIA, C. S. Morphological analysis of neonates of rats treated with dexamethasone in the initial phase of pregnancy. **Int. J. Morphol.** v. 26, n. 3, p. 523-527, 2008.

WANG, F.; RILEY, J. C. M.; BEHRMAN, H. R. Immunosuppressive levels of glucocorticoid block extrauterine luteolysins in the rat. **Biol. Reprod.**, v.49, p.66-73, 1993.

6. Anexos

Tabela 1. ¹Médias de hematócrito, contagem total e diferencial das células sanguíneas das ratas com 7 dias de gestação.

Grupos	I	II	III	IV	P
Ht (%)	52,73 ± 2,44a	49,66 ± 3,53 ^a	51,00 ± 1,90 ^a	48,80 ± 2,32a	0,1012
CTH (10⁶/μL)	4,76 ± 1,24a	4,44 ± 1,49 ^a	4,71 ± 1,24 ^a	4,88 ± 1,90a	0,1930
CTL (10³/μL)	2,63 ± 0,99a	2,68 ± 0,89 ^a	2,65 ± 0,53 ^a	2,70 ± 0,87a	0,2121
Neutrófilos (%)	13,60 ± 2,61a	14,13 ± 1,57 ^a	12,46 ± 1,80 ^a	14,63 ± 2,89a	0,4261
Linfócitos (%)	86,06 ± 4,68a	87,33 ± 5,03 ^a	84,13 ± 3,33a	82,54 ± 2,23a	0,0838
Eosinófilos (%)	1,45 ± 0,26a	1,49 ± 0,29 ^a	1,20 ± 0,18 ^a	1,34 ± 0,21a	0,5102
Monócitos (%)	0,53 ± 0,44a	0,40 ± 0,36 ^a	0,58 ± 0,31 ^a	0,49 ± 0,32a	0,7581
Basófilos (%)	0,13 ± 0,29a	0,06 ± 0,15 ^a	0,20 ± 0,13 ^a	0,18 ± 0,11a	0,7359

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P<0,05).

Tabela 2. Médias de hematócrito, contagem total e diferencial das células sanguíneas das ratas com 14 dias de gestação.

Grupos	I	II	III	IV	P
Ht (%)	42,93 ± 4,21a	52,60 ± 3,83b	40,73 ± 1,65a	38,20 ± 2,90a	0,0005
CTH (10⁶/μL)	4,66 ± 1,56a	3,86 ± 1,46b	4,86 ± 1,13a	4,72 ± 1,76a	0,0002
CTL (10³/μL)	2,64 ± 1,65a	1,81 ± 1,54b	2,62 ± 1,27a	2,49 ± 0,92a	0,0014
Neutrófilos (%)	31,73 ± 3,76a	40,93 ± 2,11b	33,80 ± 1,12a	29,66 ± 3,08a	0,0101
Linfócitos (%)	86,00 ± 4,04a	72,99 ± 5,56b	88,26 ± 6,82a	84,38 ± 4,44a	0,0270
Eosinófilos (%)	1,66 ± 0,13a	0,63 ± 0,14b	1,39 ± 0,11a	1,42 ± 0,12a	0,0441
Monócitos (%)	0,33 ± 0,23a	0,26 ± 0,27a	0,47 ± 0,14a	0,56 ± 0,12a	0,6010
Basófilos (%)	0,34 ± 0,18a	0,26 ± 0,12a	0,40 ± 0,16a	0,29 ± 0,17a	0,8580

[†]Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P<0,05).

Tabela 3. ¹Médias do hematócrito, contagem total e diferencial das células sanguíneas das ratas com 21 dias de gestação.

Grupos	I	II	III	IV	P
Ht (%)	43,13 ± 5,22a	28,66 ± 4,61b	45,33 ± 3,71a	39,00 ± 5,73a	0,0055
CTH (10⁶/μL)	4,07 ± 1,40a	2,96 ± 1,84b	3,94 ± 1,17a	4,18 ± 1,69a	0,0160
CTL (10³/μL)	2,68 ± 0,97a	1,80 ± 0,57b	2,57 ± 0,91a	2,66 ± 0,43a	0,0001
Neutrófilos (%)	46,60 ± 3,62a	55,06 ± 3,83b	44,79 ± 3,44a	43,78 ± 2,65a	0,0370
Linfócitos (%)	89,46 ± 6,14a	77,06 ± 5,30b	84,86 ± 5,44a	86,94 ± 6,76a	0,0196
Eosinófilos (%)	1,76 ± 0,18a	1,26 ± 0,16b	1,65 ± 0,14a	1,77 ± 0,11a	0,0368
Monócitos (%)	0,66 ± 0,10a	0,46 ± 0,19a	0,60 ± 0,22a	0,58 ± 0,18a	0,1115
Basófilos (%)	0,27 ± 0,15a	0,26 ± 0,12a	0,40 ± 0,16a	0,38 ± 0,13a	0,8322

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P<0,05).

Tabela 4. ¹Médias de hematócrito, contagem total e diferencial das células sanguíneas das ratas com 14 dias de gestação.

	I	II	P
Ht (%)	40,60 ± 2,96 ^a	51,00 ± 3,53 ^b	0,0079
CTH (10⁶/μL)	4,80 ± 1,60 ^a	3,81 ± 1,72 ^b	0,0195
CTL(10³/μL)	2,51 ± 1,29 ^a	1,76 ± 1,09 ^b	0,0324
Neutrófilos (%)	46,26 ± 3,29 ^a	53,59 ± 5,53 ^b	0,0317
Linfócitos (%)	91,80 ± 4,91 ^a	83,60 ± 5,59 ^b	0,0392
Eosinófilos (%)	1,56 ± 0,14 ^a	1,13 ± 0,18 ^b	0,0017
Monócitos (%)	0,66 ± 0,10 ^a	0,46 ± 0,16 ^a	0,4206
Basófilos (%)	0,39 ± 0,19 ^a	0,33 ± 0,21 ^a	0,4397

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P<0,05).

Tabela 5. ¹Médias de hematócrito, contagem total e diferencial das células sanguíneas das ratas com 16 dias de gestação.

	I	II	P
Ht (%)	41,66 ± 1,51 ^a	42,40 ± 2,30a	0,6905
CTH (10⁶/μL)	4,77 ± 0,70 ^a	3,64 ± 1,00b	0,0097
CTL (10³/μL)	2,50 ± 1,46 ^a	1,74 ± 1,20b	0,0059
Neutrófilos (%)	47,00 ± 2,82 ^a	55,25 ± 2,87b	0,0286
Linfócitos (%)	93,60 ± 4,39a	83,80 ± 4,81b	0,0195
Eosinófilos (%)	1,53 ± 0,17 ^a	1,06 ± 0,15b	0,0159
Monócitos (%)	0,63 ± 0,14 ^a	0,60 ± 0,19a	0,3053
Basófilos (%)	0,41 ± 0,24 ^a	0,32 ± 0,23a	0,4640

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P<0,05).

Tabela 6. ¹Médias de hematócrito, contagem total e diferencial das células sanguíneas das ratas com 18 dias de gestação.

	I	II	P
Ht (%)	43,80 ± 2,65 ^a	39,00 ± 1,58a	0,2222
CTH (10⁶/μL)	4,85 ± 1,51 ^a	3,58 ± 1,17b	0,0118
CTL (10³/μL)	2,56 ± 1,21 ^a	1,70 ± 0,97b	0,0112
Neutrófilos (%)	45,75 ± 3,50 ^a	54,00 ± 5,41b	0,0430
Linfócitos (%)	90,75 ± 4,85a	81,00 ± 6,37b	0,0186
Eosinófilos (%)	1,50 ± 0,18 ^a	1,00 ± 0,27b	0,0240
Monócitos (%)	0,58 ± 0,24 ^a	0,41 ± 0,15a	0,2364
Basófilos (%)	0,49 ± 0,21 ^a	0,42 ± 0,20a	0,9999

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P<0,05).

Tabela 7. ¹Médias de hematócrito, contagem total e diferencial das células sanguíneas das ratas com 20 dias de gestação.

	I	II	P
Ht (%)	42,80 ± 4,32 ^a	36,60 ± 3,05 ^b	0,0159
CTH (10⁶/μL)	4,88 ± 1,02 ^a	3,51 ± 1,84 ^b	0,0109
CTL (10³/μL)	2,61 ± 1,41 ^a	1,68 ± 1,15 ^b	0,0204
Neutrófilos (%)	49,75 ± 4,64 ^a	58,25 ± 1,70 ^b	0,0139
Linfócitos (%)	88,25 ± 1,70 ^a	80,75 ± 2,63 ^b	0,0031
Eosinófilos (%)	1,46 ± 0,17 ^a	1,00 ± 0,24 ^b	0,0079
Monócitos (%)	0,66 ± 0,47 ^a	0,50 ± 0,0,42 ^a	0,6230
Basófilos (%)	0,50 ± 0,42 ^a	0,41 ± 0,31 ^a	0,7601

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P<0,05).

Tabela 8. ¹Médias do diâmetro (μm) das hemácias das ratas com 14 e 21 dias de gestação.

Grupos	I	II	III	IV	P
14 dias	6,58 \pm 0,26a	5,77 \pm 0,05b	6,82 \pm 0,12a	6,75 \pm 0,07a	0,0082
21 dias	6,73 \pm 0,05a	5,49 \pm 0,14b	6,70 \pm 0,22a	6,81 \pm 0,18a	0,0085

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

Tabela 9. ¹Médias dos níveis séricos de carboidratos totais (mg/dL) dos grupos experimentais.

Grupos/Dias	I	II	III	IV	P
7^a	452,44 ± 50,51a	427,11 ± 82,27a	498,83 ± 29,57a	398,60 ± 67,35a	0,0845
14^a	314,61 ± 70,06a	359,15 ± 81,03a	427,95 ± 47,95a	318,03 ± 80,73a	0,0797
21^a	476,36 ± 47,20a	227,77 ± 53,69b	396,40 ± 53,53a	419,76 ± 49,29a	0,0029

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P<0,05).

Tabela 10. ¹Médias dos níveis séricos de progesterona (ng/mL) nas matrizes dos grupos experimentais.

Grupos/Dias	I	II	III	IV	P
7^a	662,93 ± 9,97a	659,36 ± 5,72a	666,19 ± 6,56a	667,08 ± 4,70a	0,8621
14^a	686,38 ± 8,45a	621,95 ± 4,15b	694,99 ± 4,49a	690,84 ± 3,86a	0,0078
21^a	697,66 ± 4,20a	632,94 ± 7,80b	699,15 ± 5,35a	695,29 ± 2,71a	0,0166

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P<0,05).

Tabela 11: *Média ± desvio padrão do percentual do parênquima lobular (PL), não lobular do fígado (PNL), área da cortical (AC) e Medular (AM) da adrenal, diâmetro (DG) e volume do glomérulo (VG), diâmetro (DCB) e volume (VCB) da cápsula de Bowman dos rins nos grupos experimentais.

Órgãos	Grupos				P
	GI	GII	GIII	GIV	
Fígado					
PL (%)	91,61 ± 5,75a	95,90 ± 1,68 ^a	96,27 ± 1,83a	93,52 ± 3,77a	0,2125
PNL (%)	8,38 ± 3,25a	4,10 ± 1,75 ^a	3,72 ± 1,28a	6,47 ± 3,68a	0,1918
Adrenal					
AC (µm²)	4030,97 ± 56,64a	3956,85 ± 166,88a	4077,25 ± 188,77a	3988,89 ± 153,35a	0,9192
AM (µm²)	1259,70 ± 67,92a	1270,44 ± 38,59a	1257,95 ± 50,41a	1260,91 ± 50,64a	0,2564
Rim					
DG (µm)	128,58 ± 14,53a	134,66 ± 12,86a	125,54 ± 18,42a	137,85 ± 12,52	0,0687
VG (µm³)	1271342,81 ± 280111a	11666049,00 ± 181883a	1088850,93 ± 236535a	1233284,67 ± 305569a	0,6435
DCB (µm)	146,40 ± 13,78a	138,63 ± 11,59a	144,93 ± 12,54a	147,33 ± 15,66a	0,2649
VCB (µm³)	1336238,24 ± 218257a	1513826,85 ± 239069a	1313852,17 ± 265163a	1375855,34 ± 252962a	0,1618

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P<0,05).

Figura 1. Micrografia do fígado das ratas dos grupos experimentais coradas com P.A.S. A – Grupo I; B – Grupo II; C – Grupo III e D – Grupo IV (Barras = 200µm) e pela Impregnação argêntica E – Grupo I; F – Grupo II; G – Grupo III e H – Grupo IV (Barras = 100µm).

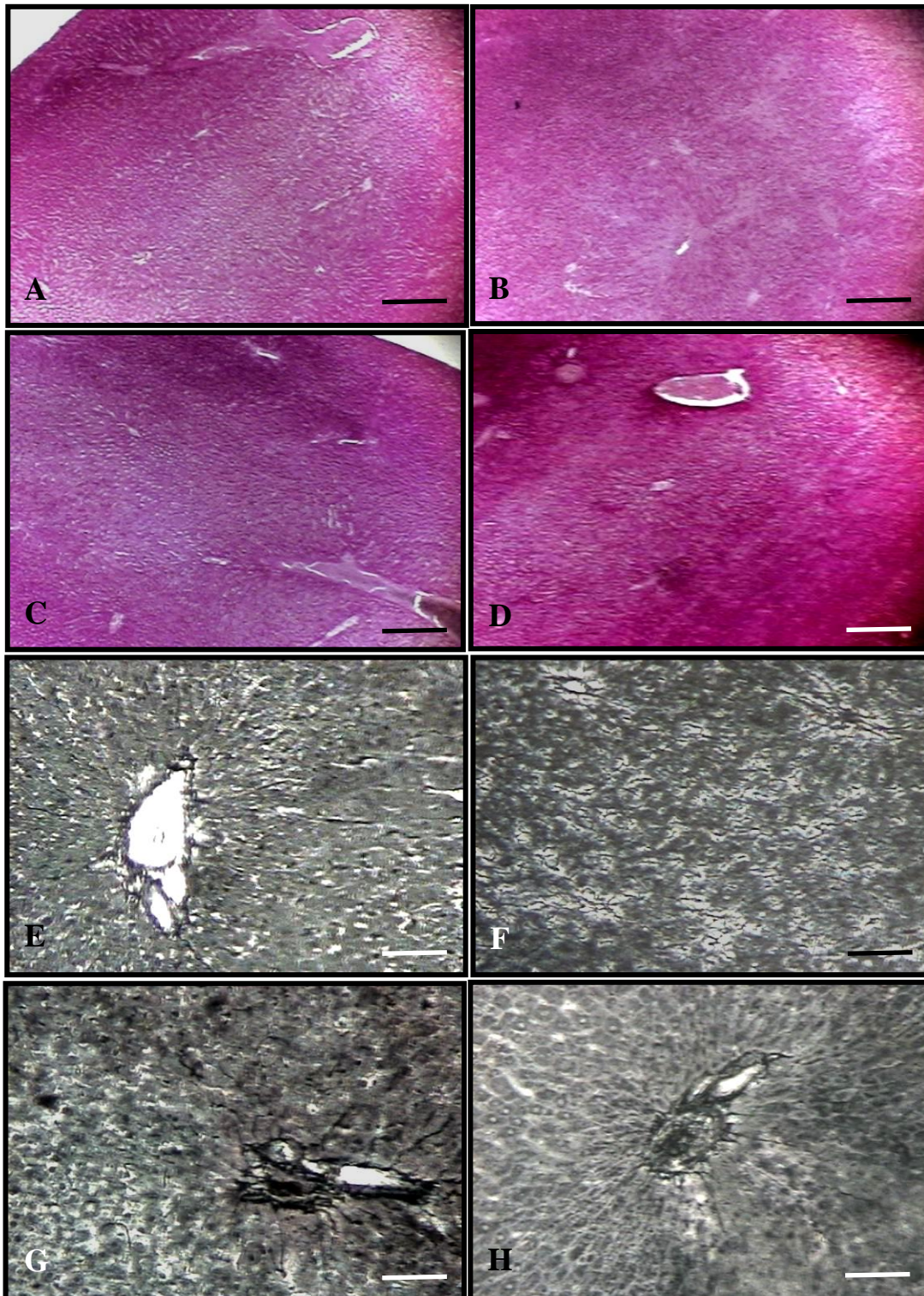


Figura 2. Micrografia da Adrenal das ratas dos grupos experimentais coradas com P.A.S. A – Grupo I; B – Grupo II; C – Grupo III e D – Grupo IV (Barras = 200µm) e pela Impregnação argêntica E – Grupo I; F – Grupo II; G – Grupo III e H – Grupo IV (Barras = 100µm).

