

Análise fotolorimétrica computadorizada dos efeitos da betametasona intra-articular sobre a concentração de proteoglicanos da matriz cartilaginosa de joelhos leporinos: influência do número de injeções intra-articulares

Computerized photolorimetric analysis of the effects of intraarticular betamethasone on the proteoglycan concentration of leporine knee cartilage matrix: influence of the number of intraarticular injections

MAURO BATISTA ALBANO¹; GABRIEL PAULO SKROCH²; SÉRGIO OSSAMU IOSHII³; XAVIER SOLER GRAHELS⁴; PAULO GILBERTO CIMBALISTA DE ALENCAR⁴; JORGE EDUARDO FOUTO MATIAS²

R E S U M O

Objetivo: Analisar os efeitos da injeção repetida de betametasona na concentração de proteoglicanos da cartilagem articular do joelhos normais de coelhos californianos de ambos os sexos. **Métodos:** Os animais foram randomizados em oito grupos de dez animais cada. Três grupos controle (injeção ou não de solução salina isotônica) e cinco grupos de estudo - doses terapêuticas, repetidas ou não, de betametasona injetadas no joelho direito de cada coelho, com intervalos semanais. Após oito dias da última injeção prevista, cortes histológicos da cartilagem das áreas de apoio dos platôs tibiais foram corados com hematoxilina e eosina para análise por microscopia óptica, e com safranina O para a pesquisa da quantidade de proteoglicanos. A intensidade da coloração da safranina O foi quantificada em aparelho de histomorfometria, composto por microscópio Olympus BX 50 e microcomputador com software Image Pro-plus 4.5.0. **Resultados:** Não houve diferenças nos animais que tiveram seus joelhos injetados com betametasona uma, duas e quatro vezes quando comparados com os grupos controle. Nos animais que receberam seis e oito aplicações a intensidade da coloração com safranina O reduziu-se significativamente ($p < 0,05$) quando comparada tanto com grupos controle quanto com os outros de estudo. **Conclusão:** Foi possível demonstrar redução da concentração de proteoglicanos na matriz cartilaginosa articular dependente do efeito deletério cumulativo das repetidas injeções intra-articulares de betametasona.

Descritores: Articulação do joelho. Proteoglicanos. Corticosteróides. Coelhos.

INTRODUÇÃO

A grande mudança no tratamento conservador de lesões articulares ocorreu pela introdução de injeções de corticoesteróides e seus análogos. Entretanto, o rápido alívio dos sintomas, bem como restauração dos níveis funcionais articulares, acabaram por levar ao uso indiscriminado destas drogas. Relatos de casos de artropatias de Charcot, necroses ósseas e aumento na degradação da cartilagem articular estiveram em evidência nos anos que se seguiram a introdução desta forma de tratamento^{1,2}.

Experimentalmente, o corticoesteróide ocasiona lesões no tecido cartilaginoso por induzir a redução de proteoglicanos, fato este que tem papel chave na degradação da cartilagem articular. Em contrapartida, pesquisas em modelos animais tem evidenciado efeito condroprotetor³⁻⁶. A aplicação intra-articular de

corticoesteróides em doses baixas bloqueia os efeitos deletérios gerados por processos inflamatórios, evitando a degradação da cartilagem. A aplicação intra-articular de corticoesteróide permanece controversa quanto à segurança e eficácia⁷.

A cartilagem articular por sua importância para os movimentos ganhou destaque na ortopedia. Inúmeros tratamentos medicamentosos com suplementação de elementos que entram na composição da matriz, tanto por administração oral como através de infiltrações, estão atualmente em evidência⁸.

Com o objetivo de avaliar os efeitos da associação de corticoesteróides de curta e longa duração na cartilagem hialina normal, realizou-se este estudo aplicando esta associação de medicamentos em joelhos de coelhos, com dosagem proporcional à empregada na prática clínica.

Estudo realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

1. Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná - UFPR -BR; 2. Professores Adjuntos do Departamento de Cirurgia da UFPR-BR; 3. Professor Adjunto do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Paraná UFPR- BR; 4. Médicos Ortopedistas do Serviço de Ortopedia e Traumatologia do Hospital de Clínicas da UFPR-ABR.

MÉTODOS

Oitenta coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) californianos adultos de ambos os sexos pesando entre 2.950 e 3.300g (média de 3.200g) foram divididos em oito grupos de 10 animais, mantidos em gaiolas para a espécie, e alimentados com ração agrária ecológica.

A dosagem da medicação a ser aplicada foi calculada tomando-se como base um peso médio de 65kg para humanos. Os coelhos apresentavam peso correspondente a 1/20 do peso corpóreo humano. Cada ampola do medicamento contendo 1 mL da solução de corticoesteróide composto por dipropionato de betametasona e fosfato dissódico de betametasona foi diluída em 9 mL de solução salina isotônica 0,9%. Desta solução utilizou-se 0,5 mL (0,25 mg de dipropionato e 0,1 como fosfato) para infiltração, correspondendo a 1/20 da dose utilizada em aplicações intra-articulares em joelhos humanos. As infiltrações foram realizadas semanalmente, de acordo com cada grupo de estudo como descrito na tabela 1.

Para as aplicações foram utilizadas luvas, agulhas e seringas descartáveis de vacina com capacidade de 1 mL com graduação decimal. A pele da soldra caudal direita dos animais foi preparada com clorhexidine e solução de álcool 70%, sem necessidade de se realizar tricotomia.

Todos os coelhos foram submetidos à eutanásia oito dias após a última infiltração programada para o grupo a que pertencia; o controle sem infiltração foi sacrificado ao final do experimento. Para a eutanásia os animais foram primeiramente anestesiados com Ketamina 100mg/kg e Xilazina 8mg/kg intramuscular e posteriormente submetidos à injeção intracardíaca de 10mL de cloreto de potássio à 19,1%.

Os joelhos foram dissecados separando-se os platôs tibiais, coletados em recipientes individuais com formol a 10% e encaminhados ao laboratório de anatomia patológica.

Os platôs tibiais foram descalcificados e cortados no plano sagital nos compartimentos medial e lateral e inclusos em parafina. Após a microtomia foram obtidas quatro lâminas das áreas de apoio dos platôs, duas do medial e duas do lateral. Utilizou-se a safranina O para coloração de uma lâmina do platô medial e outra do lateral, o mesmo procedimento foi realizado com a coloração de hematoxilina e eosina. As lâminas coradas com a safranina O foram levadas para análise em um aparelho de histomorfometria composto por microscópio Olympus BX 50 ligado a um computador que utilizava o software Image Pro-plus versão 4.5[®] da Media Cybernetics.

A intensidade da coloração pela safranina O foi mensurada em cada lâmina com iluminação padrão, utilizando aumento de dez vezes. A imagem capturada pelo aparelho era analisada pelo software que quantificava os pixels da coloração (Figura 1).

Para a análise estatística, a variável de interesse foi a densidade óptica. Testou-se a hipótese nula de densidade óptica média iguais em todos os grupos, versus a hipótese alternativa de pelo menos um dos grupos com densidade óptica média diferente dos demais. Para tanto, adotou-se a análise de variância com um fator e o teste LSD para comparações múltiplas. Para avaliação da homogeneidade das variâncias, considerou-se o teste de Cochran e para avaliação da normalidade dos dados dentro dos grupos, considerou-se o teste de Shapiro-Wilks.

Tabela 1 – Grupos do estudo de acordo com tipo e volume da solução injetada, número e intervalo das aplicações.

Grupo	Substância aplicada	Número de aplicações	Volume aplicado	Intervalo
1	Solução salina 0,9%	0	0,5mL	—
2	Solução salina 0,9%	1	0,5mL	—
3	Solução salina 0,9%	8	0,5 mL	Semanal
4	Betametasona Dipropionato 0,25mg Fosfato 0,1mg	1	0,5mL	—
5	Betametasona Dipropionato 0,25mg Fosfato 0,1mg	2	0,5mL	Semanal
6	Betametasona Dipropionato 0,25mg Fosfato 0,1mg	4	0,5mL	Semanal
7	Betametasona Dipropionato 0,25mg Fosfato 0,1mg	6	0,5mL	Semanal
8	Betametasona Dipropionato 0,25mg Fosfato 0,1mg	8	0,5mL	Semanal

RESULTADOS

Os platôs apresentaram-se normais nos Grupos 1, 2, 3, 4, 5 e 6. Notaram-se granulações esbranquiçadas presentes nos dois platôs em três casos do Grupo 7 e seis do Grupo 8. Nos três casos que apresentaram aumento de volume na ocasião da operação, havia granulações grosseiras mais acentuadas no platô medial próximo à inserção ligamentar.

Na análise histológica das lâminas coradas com hematoxilina e eosina não foram encontradas lesões teciduais nos grupos estudados.

A avaliação da intensidade de coloração dos cortes histológicos corados pela safranina "O" pelo aparelho de histomorfometria gerou resultados que foram dispostos em médias de densidade óptica fornecidas pelo software. Foram comparados grupo a grupo sempre observando o nível de significância de 5%. Houve diferença estatisticamente significativa entre os Grupos 7 e 8 comparados com o Grupo 3 controle e os Grupos 4, 5 e 6, demonstrando decréscimo da quantidade de proteoglicanos a medida que se aumentou o número de aplicações, como pode ser visualizado na figura 2.

DISCUSSÃO

A intenção de avaliar os efeitos do corticoesteróide composto partiu do princípio de que não foram encontrados na literatura trabalhos que testassem a associação composta por dipropionato de betametasona e fosfato dissódico de betametasona⁸. Esta associação de corticoesteróides poderia resultar em maior supressão da síntese protéica na matriz cartilaginosa levando a degeneração mais precoce com menor número de infiltrações do que os evidenciados na literatura com drogas simples.

No mercado este medicamento se encontra disponível sob diferentes nomes comerciais, mas com a mesma composição e dosagem. Os corticoesteróides menos solúveis são os mais utilizados nas infiltrações por permanecerem por até três semanas no interior das articulações e reduzirem os efeitos sistêmicos⁹. A somatória de um corticoesteróide de curta duração e rápido início de ação ao corticoesteróide de longa duração minimiza os efeitos de respostas inflamatórias similares às da gota e pseudogota desencadeadas pela fagocitose dos cristais de corticoesteróides pelos leucócitos.

A betametasona é corticoesteróide muito potente do ponto de vista anti-inflamatório, com efeito proporcional maior do que diversos outros corticoesteróides. Como não se tinha paralelo de segurança avaliando quando esta composição passa a causar danos na cartilagem, optou-se por verificar o número máximo de uma dose semelhante à utilizada em humanos, que causasse redução nos proteoglicanos da matriz resultando em fragilidade estrutural.

O aparecimento de lesões induzidas pelo corticoesteróide em cartilagens articulares de coelho é muito frequente¹⁰ e a maioria dos trabalhos demonstrando altera-

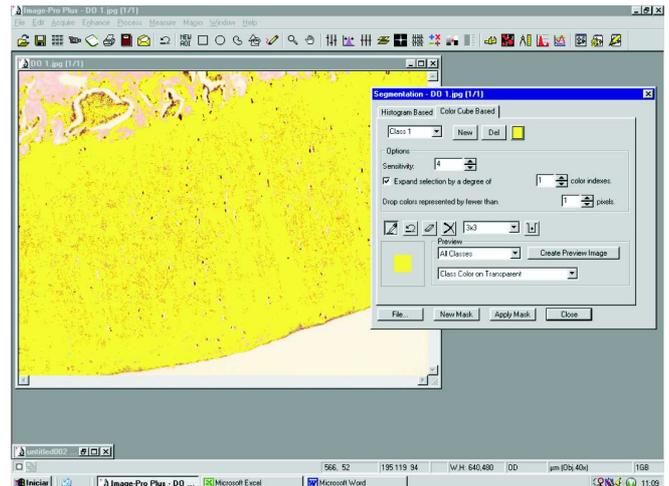


Figura 1 – Tela do software (Image Pro-Plus 4.5) utilizado na avaliação de intensidade da coloração de safranina O.

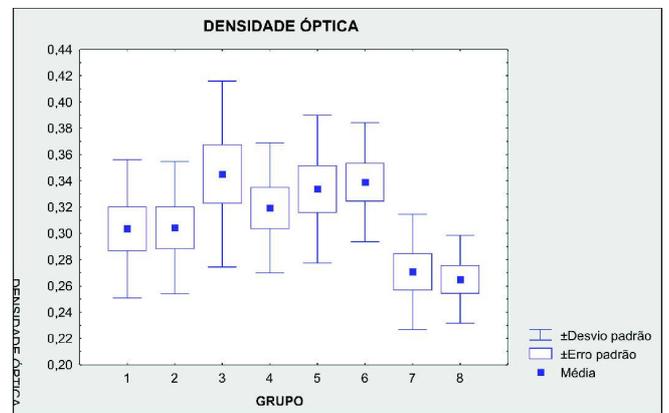


Figura 2 - Médias de densidade óptica da safranina O de cada um dos grupos

Comparações com $p < 0,05$:

G3 x G7=0,0018; G3 x G8=0,0008;

G4 x G7=0,0378; G4 x G8=0,0207;

G5 x G7=0,0076; G5 x G8=0,0037;

G6 x G7=0,0040; G6 x G8=0,0019.

ção degenerativa na cartilagem devido à ação dos corticoesteróides foi observada neste tipo de animal⁴⁻⁶. Na articulação os efeitos da redução de proteoglicanos são determinantes no aparecimento das lesões induzidas pelo corticoesteróide. A resultante fragilidade estrutural leva a falência da cartilagem em áreas de apoio. Estes elementos apresentam meia-vida curta em torno de oito dias. A síntese de colágeno é afetada intensamente; entretanto como a sua durabilidade é maior não se observa redução in vivo devido à duração dos experimentos.

Adotou-se a dosagem em miligramas por quilograma visto que a proporcionalidade por superfície corporal utilizada para alguns medicamentos gera dose elevada, que por si só tem potencial lesivo para as células, como demonstrado em cultura de tecidos¹¹.

O corante safranina O estabelece ligação estequiométrica com os poliânions, ou seja, uma molécula de safranina O liga-se a cada carga negativa do sulfato de condroitina e do sulfato de queratina, e não se liga ao

colágeno. Deste modo pode-se afirmar que as alterações evidenciadas na intensidade de coloração são decorrentes da redução de proteoglicanos mais especificamente de sulfato de queratina e sulfato de condroitina. A avaliação da intensidade de coloração realizada com auxílio de um aparelho de histomorfometria permite mensuração mais objetiva dos dados, eliminando possíveis discordâncias subjetivas entre observadores.

Os resultados obtidos mostram ausência de efeitos adversos com a aplicação de corticoesteróide composto, demonstráveis pelo método colorimétrico com uma, duas e quatro infiltrações em cartilagem normal. Entretanto deve-se levar em consideração a duração do experimento que avaliou os animais com oito dias posteriormente à última infiltração. A utilização de um corticoesteróide de maior permanência no interior da articulação ocasiona acúmulo de medicamento à medida que novas infiltrações vão sendo realizadas em intervalo de tempo menor que o necessário para o desaparecimento do medicamento. Portanto, parte-se de uma dose inicial conhecida que é verdadeira apenas para o grupo infiltrado uma vez. Nos demais grupos ela é de difícil determinação devido à lenta absorção. Observou-se redução da intensidade de coloração com safranina O na matriz cartilaginosa de coelhos infiltrados seis e oito vezes com intervalos semanais (Figura 2). Em três animais do grupo infiltrado oito vezes e que apresentavam aumento de volume articular, a cultura do líquido sinovial foi negativa. Na macroscopia dos platôs destes animais havia maior acúmulo de pequenas rugosidades localizadas no platô medial próximo à inserção ligamentar.

Neste estudo, embora os coelhos pudessem se movimentar nas gaiolas, não realizaram exercícios físicos. Em ratos que tiveram seus joelhos infiltrados com corticoesteróide e foram induzidos a prática de exercício, houve degradação mais intensa no tecido cartilaginoso¹². Há poucos estudos demonstrando os efeitos da associação de exercícios e corticoesteróides intra-articulares.

A associação de corticoesteróides de curta e de longa duração não mostrou dados diferentes dos obtidos na literatura visto que a redução de proteoglicanos na matriz ocorreu em tempo e número de infiltrações semelhantes às observadas com administração de drogas simples. Não observou-se lesão celular, embora o intervalo de aplicações de corticoesteróide na articulação fosse pequeno para o tipo da substância empregada concordando com as observações de outros pesquisadores^{13,14}.

Fica claro pelo presente estudo que uma infiltração com corticoesteróide na articulação não acarreta lesões celulares e ou na matriz. Entretanto, o uso local intra-articular repetitivo, sem o devido e necessário intervalo, leva à lesão da superfície cartilaginosa articular por redução do teor de proteoglicanos no local. Novos estudos levando em conta a potência do corticoesteróide bem como intervalo de tempo satisfatório para a recuperação do tecido cartilaginoso devem ser realizados.

Em conclusão, os níveis articulares de corticoesteróide que levam a efeitos condroprotetores podem ser menores do que a dose utilizada normalmente para infiltrações. A busca por uma dosagem menor que não afete a síntese protéica intensamente e bloqueie processos inflamatórios é mandatória para o tratamento com este medicamento.

A B S T R A C T

Objective: To study the effects of repeated injections of betamethasone on proteoglycan concentration in the articular cartilage of normal knees of Californian rabbits of both sexes. **Methods:** Eighty animals were randomly divided into eight groups of ten animals each. Three control groups (saline solution injected or not) and five study groups — therapeutic doses, repeated or not, of betamethasone injected into the right knee of each animal at weekly intervals. After eight days from the last injection, sections of articular cartilage from tibial plateaus collected from weight-bearing surfaces were stained with hematoxylin and eosin for light microscopy analysis and with safranin O for the proteoglycan content assay. The staining intensity of safranin O was quantified by histomorphometry using an Olympus BX 50 microscope and a microcomputer with the Image Pro-plus 4.5.0 software. **Results:** Animals receiving one, two and four betamethasone injections showed no differences when compared to normal controls. Animals receiving six and eight injections had a significant decrease in safranin O staining intensity ($p < 0.05$) as compared to the control groups and the other study groups. **Conclusion:** A decrease in the concentration of articular cartilage proteoglycans dependent on repeated betamethasone injection was effectively demonstrated.

Key words: Joint knee. Proteoglycans. Adrenal cortex hormones. Rabbits.

REFERÊNCIAS

1. Chandler GN, Jones DT, Wright V, Hartfall SJ. Charcot's arthropathy following intra-articular hydrocortisone. *Br Med J.* 1959; 1(5127):952-3.
2. Zachariae L. Deleterious effects of corticosteroids administered topically, in particular intra-articularly. *Acta Orthop Scand.* 1965; 36(2):127-36.
3. Verschure PJ, van der Kraan PM, Vitters EL, van den Berg WB. Stimulation of proteoglycan synthesis by triamcinolone acetonide and insulin-like growth factor 1 in normal and arthritic murine articular cartilage. *J Rheumatol.* 1994; 21(5):920-6.
4. Pelletier JP, Mineau F, Raynauld JP, Woessner JF Jr., Gunja-Smith Z, Martel-Pelletier J. Intraarticular injection with methylprednisolone acetate reduces osteoarthritis lesions in parallel with chondrocyte stromelysin synthesis in experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1994; 37(3):414-23.
5. Pelletier JP, DiBattista JA, Raynauld JP, Wilhelm S, Martel-Pelletier J. The in vivo effects of intraarticular corticosteroid injections on cartilage lesions, stromelysin, interleukin-1, and oncogene protein synthesis in experimental osteoarthritis. *Lab Invest.* 1995; 72(5):578-86.
6. Stricker SJ, Lozman PR, Makowski AL, Gunja-Smith Z. Chondroprotective effect of bethamethasone in lapine pyogenic arthritis. *J Pediatr Orthop.* 1996; 16(2):231-6.

7. Habib G, Safia A. The effect of intra-articular injection of betamethasone acetate/betamethasone sodium phosphate on blood glucose levels in controlled diabetic patients with symptomatic osteoarthritis of the knee. *Clin Rheumatol.* 2009; 28(1):85-7. Epub 2008 Oct 14.
8. Bellamy N, Campbell J, Robinson V, Gee T, Bourne R, Wells G. Intraarticular corticosteroid for treatment of osteoarthritis of the knee. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006; 19(2):CD005328.
9. Caldwell JR. Intra-articular corticosteroids: guide to selection and indications for use. *Drugs.* 1996; 52(4):507-14.
10. Salter RB, Murray D. Effects of hydrocortisone on musculo-skeletal tissues. *J Bone Joint Surg Br.* 1969;51(1):195.
11. Fubini SL, Todhunter RJ, Burton-Wurster N, Vernier-Singer M, MacLeod JN. Corticosteroids alter the differentiated phenotype of articular chondrocytes. *J Orthop Res.* 2001; 19(4):688-95.
12. Gogia PP, Brown M, Al-Obaidi S. Hydrocortisone and exercise effects on articular cartilage in rats. *Arch Phys Med Rehabil.* 1993; 74(5):463-7.
13. Barker WD, Martinek J. An ultrastructural evaluation of the effect of hydrocortisone on rabbit cartilage. *Clin Orthop.* 1976; (115):286-90.
14. Papachristou G, Anagnostou S, Katsorhis T. The effect of intraarticular hydrocortisone injection on the articular cartilage of rabbits. *Acta Orthop Scand Suppl.* 1997;275:132-4.

Recebido em 15/09/2008

Aceito para publicação em 10/12/2008

Conflito de interesses: nenhum

Fonte de financiamento: nenhuma

Como citar este artigo:

Albano MB, Skroch GP, Ioshii SO, Grahels XS, Alencar PGC, Matias JEF. Análise fotolorimétrica computadorizada dos efeitos da betametasona intra-articular sobre a concentração de proteoglicanos da matriz cartilaginosa de joelhos leporinos: influência do número de injeções intra-articulares. *Rev Col Bras Cir.* [periódico na Internet] 2009; 36(3). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/rcbc>

Endereço para correspondência:

Mauro Batista Albano

albano_mauro@yahoo.com.br