

MAURO BATISTA ALBANO

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS EFEITOS DO CORTICOESTERÓIDE NA
CARTILAGEM HIALINA DO JOELHO DE COELHOS UTILIZANDO AS
COLORAÇÕES HEMATOXILINA-EOSINA E SAFRANINA O.**

**Dissertação apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em
Clínica Cirúrgica, Setor de
Ciências da Saúde, Universidade
Federal do Paraná, como
requisito parcial à obtenção do
grau de Mestre.**

**Orientador: Prof. Dr. Gabriel
Paulo Skroch**

**CURITIBA
2005**

Albano, Mauro Batista

Análise histológica dos efeitos do corticoesteróide na cartilagem hialina do joelho de coelhos utilizando as colorações heamtoxilina-eosina e safranina O / Mauro Batista Albano. – Curitiba, 2005.

ix, 41 f., il., tabs.

Orientador: Gabriel Paulo Skroch.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica.

1. Corticosteróides - Injeções intra-articulares. 2. Cartilagem hialina. I. Skroch, Gabriel Paulo. II. Título.

CDD 615.4
NLM WK 755

À minha filha Fabiana de quem subtraí momentos de convivência da melhor fase de nossas vidas na esperança de que um dia possamos colher juntos os frutos advindos deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Mario Massatomo Namba que me incentivou a executar esta pesquisa e que muito tem contribuído para o meu desenvolvimento profissional.

Ao Dr. Xavier S. Grahels que de certa forma impulsionou-me na execução deste trabalho e muito contribuiu com seu conhecimento em cunicultura.

Ao professor Dr. Oswaldo Malafaia que um dia disse que o agradeceria pela opinião dada na fase de projeto desta dissertação e que hoje 3 anos após vejo que me foi de grande valia.

Ao Dr. Sérgio O. Ioshii que por seu extenso conhecimento em histologia ajudou-me de forma decisiva para que o trabalho chegasse ao seu final.

Ao Dr. José Vicente Pansini por sua prestimosa colaboração.

Ao meu irmão Dr. Marlon S. G. Albano que muito me auxiliou em suas horas de folga para a execução da parte experimental.

Meu especial agradecimento a minha esposa a bibliotecária Selma Regina Ramalho Conte que muito contribuiu em todas as fases do meu trabalho, pessoal e profissionalmente.

A minha mãe que foi o princípio de tudo e que muito contribuiu para minha formação acadêmica.

Ao orientador e amigo Dr. Gabriel P. Skroch pelo apoio que obtive durante os anos de minha especialização e agora por sua valiosa contribuição sem a qual esta pesquisa não se tornaria uma dissertação.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
4 RESULTADOS.....	17
4.1 ANALISE ESTATÍSTICA.....	29
5 DISCUSSÃO.....	32
6 CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS.....	38

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - FOTOGRAFIA DA APLICAÇÃO INTRA-ARTICULAR DE CORTICOESTERÓIDE NA SOLDRA CAUDAL DIREITA	12
FIGURA 2 - FOTOGRAFIA DA APLICAÇÃO DE CORTICOESTERÓIDE NA SOLDRA CAUDAL (VISTA MEDIAL).....	12
FIGURA 3 - FOTOGRAFIA DO PLANALTO TIBIAL DE ESPÉCIME PERTENCENTE AO GRUPO VI.....	14
FIGURA 4 - MICROSCÓPIO OLYMPUS BX 50 E COMPUTADOR.....	14
FIGURA 5 - MÉTODO DE AVALIAÇÃO DE INTENSIDADE DA COLORAÇÃO.....	15
FIGURA 6 - TABELA GERADA COM MEDIDAS DE ÁREA E DENSIDADE ÓPTICA.....	16
FIGURA 7 - FOTOGRAFIA DE PLANALTO TIBIAL DEMONSTRANDO CARTILAGEM SEM LESÕES MACROSCÓPICAS (GRUPO III CONTROLE).....	17
FIGURA 8 - FOTOGRAFIA DE PLANALTO TIBIAL COM MENISCOS, EVIDENCIANDO GRANULAÇÕES NA CARTILAGEM APÓS A OITAVA INFILTRAÇÃO.....	17
FIGURA 9 - FOTOGRAFIA DE PLANALTO TIBIAL APÓS A SEXTA INFILTRAÇÃO COM CORTICOSTERÓIDE.....	18
FIGURA 10 - FOTOGRAFIA DE PLANALTO TIBIAL APÓS A OITAVA INFILTRAÇÃO COM CORTICOESTERÓIDE, EVIDENCIANDO GRANULAÇÕES GROSSEIRAS.....	18
FIGURA 11 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM HEMATOXILINA E EOSINA. ESPÉCIME PERTENCENTE AO GRUPO II CONTROLE.....	19
FIGURA 12 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM HEMATOXILINA E EOSINA. ESPÉCIME PERTENCENTE AO GRUPO III CONTROLE.....	19
FIGURA 13 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM HEMATOXILINA E EOSINA. ESPÉCIME PERTENCENTE AO GRUPO IV (UMA APLICAÇÃO DE CORTICOESTERÓIDE).....	20
FIGURA 14 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM HEMATOXILINA E EOSINA. ESPÉCIME PERTENCENTE AO GRUPO V (DUAS APLICAÇÕES DE CORTICOESTERÓIDE).....	20
FIGURA 15 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM HEMATOXILINA E EOSINA DE ESPÉCIME PERTENCENTE AO GRUPO VI (QUATRO APLICAÇÕES DE CORTICOESTERÓIDE).....	21
FIGURA 16 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM HEMATOXILINA E EOSINA PERTENCENTE AO GRUPO VII (SEIS APLICAÇÕES DE CORTICOESTERÓIDE).....	21

FIGURA 17 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM HEMATOXILINA E EOSINA. DE ESPÉCIME PERTENCENTE AO GRUPO VIII (OITO APLICAÇÕES DE CORTICOESTERÓIDE).....	22
FIGURA 18 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM SAFRANINA O. ESPÉCIME PERTENCENTE AO GRUPO II CONTROLE	22
FIGURA 19 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM SAFRANINA O. ESPÉCIME PERTENCENTE AO GRUPO IV (UMA APLICAÇÃO DE CORTICOESTERÓIDE).....	23
FIGURA 20 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM SAFRANINA O. ESPÉCIME PERTENCENTE AO GRUPO V (DUAS APLICAÇÕES DE CORTICOESTERÓIDE).....	23
FIGURA 21 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM SAFRANINA O. ESPÉCIME PERTENCENTE AO GRUPO VI (QUATRO APLICAÇÕES DE CORTICOESTERÓIDE).....	24
FIGURA 22 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM SAFRANINA O. ESPÉCIME PERTENCENTE AO GRUPO VII (SEIS APLICAÇÕES DE CORTICOESTERÓIDE).....	24
FIGURA 23 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM SAFRANINA O. ESPÉCIME PERTENCENTE AO GRUPO VIII (OITO APLICAÇÕES DE CORTICOESTERÓIDE).....	25
GRÁFICO 1 - DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA (GRUPO I CONTROLE).....	25
GRÁFICO 2 - DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA (GRUPO II CONTROLE).....	26
GRÁFICO 3 - DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA (GRUPO III CONTROLE).....	26
GRÁFICO 4 - DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA (GRUPO IV CORTICOESTERÓIDE).....	27
GRÁFICO 5 - DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA (GRUPO V CORTICOESTERÓIDE).....	27
GRÁFICO 6 - DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA (GRUPO VI CORTICOESTERÓIDE).....	28
GRÁFICO 7 - DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA (GRUPO VII CORTICOESTERÓIDE).....	28
GRÁFICO 8 - DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA (GRUPO VIII CORTICOESTERÓIDE).....	29
GRÁFICO 9 - APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS DE MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DA DENSIDADE ÓPTICA DE CADA UM DOS GRUPOS.....	31
TABELA 1 - POTÊNCIAS RELATIVAS E DOSES EQUIVALENTES DOS CORTICOESTERÓIDES REPRESENTATIVOS.....	5
TABELA 2 – DISTRIBUIÇÃO DAS DOSES DE MEDICAMENTO E PLACEBO NOS DIFERENTES GRUPOS	13
TABELA 3 - ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS GRUPOS LEVANDO-SE EM CONTA O VALOR DE p.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	= ácido desoxirribonucleico
Kg	= quilograma
mg	= miligrama
ml	= mililitro
mM	= milimolar
mRNA	= ácido ribonucleico mensageiro
Na	= sódio
pg	= picograma
µg	= micrograma
µM	= micromol

RESUMO

Nos últimos cinquenta anos aplicações intra-articulares de corticoesteróides tem sido utilizadas no tratamento de patologias articulares. Entretanto, existem controvérsias relacionadas à utilização deste método de tratamento. Efeitos adversos na cartilagem estão associados à redução de proteoglicanos na matriz. Recentemente trabalhos experimentais têm demonstrado que na vigência de processos inflamatórios, baixas doses de corticoesteróides injetados na articulação reduzem a degradação da cartilagem. O objetivo deste experimento foi analisar os efeitos da associação de corticoesteróides de curta e de longa duração na cartilagem articular normal. Oitenta coelhos californianos de ambos os sexos foram divididos de modo aleatório em oito grupos de dez animais. Três grupos foram utilizados como controle e cinco grupos receberam doses farmacológicas de corticoesteróides injetados no joelho direito de cada coelho, com intervalo semanal. A dosagem escolhida para análise corresponde, com base no peso corporal, à utilizada na prática clínica. Todos os animais foram sacrificados oito dias após a última aplicação e os joelhos foram dissecados e encaminhados para estudo na Anatomia patológica do Hospital de Clínicas da UFPR. Cortes histológicos da cartilagem das áreas de apoio dos platôs tibiais foram corados com hematoxilina e eosina para análise por microscopia óptica. Lâminas coradas com safranina O das mesmas áreas foram utilizadas para a pesquisa da quantidade de proteoglicanos. A intensidade da coloração da safranina O foi quantificada em um aparelho de histomorfometria, composto por um microscópio Olympus BX 50, de onde as imagens capturadas eram transferidas para um microcomputador e analisadas pelo software Image Pro-plus 4.5 da Media Cybernetics. Os resultados obtidos não mostraram diferenças nos animais que tiveram seus joelhos aplicados com corticoesteróides uma, duas e quatro vezes quando comparados com os grupos controle. Nos animais que receberam seis e oito aplicações de corticoesteróides a intensidade da coloração com safranina O estava reduzida significativamente ($p < 0,05$). Na microscopia óptica não houve diferenças observáveis.

ABSTRACT

For the past five decades intra-articular injections of corticosteroids have been used in the treatment of joint diseases. However, controversy exists over the use of this treatment method. Potential adverse effects on articular cartilage have been associated with loss of proteoglycans from articular matrix. More recently studies have shown that low doses of intra-articular corticosteroids reduce cartilage degeneration on diseased joints. The objective of this study was to determine the effects of the association of long acting with short acting corticosteroids on the normal articular cartilage. Eighty californian rabbits, both female and male, were randomly divided into eight groups of ten animals. Three groups were the controls and five experimental groups received pharmacological doses of corticosteroids injected on the right knee at weekly intervals. The dosage of the drug selected for these experiments corresponded, on a body weight basis, to the one used clinically. All animals were killed eight days after the last injection and the tibial plateaus were dissected. The plateaus were sent to the Patological Anatomy Department from Hospital de Clínicas-UFPR . Articular cartilage sections from weight bearing surfaces were stained with hematoxylin and eosin for the light microscopy analyses. Safranin O stained sections were evaluated for the proteoglicans content. The intensity of the safranin O staining was quantitated as follows: the images was captured from microscope Olympus BX 50 and saved in a microcomputer. The captured pictures were analysed by the software Image Pro-plus 4.5 from Media Cybernetics. The results obtained showed no differences in injected animals receiving one, two and four corticosteroids injections when compared with normal controls. In animals receiving six and eight corticosteroids injections the safranin O staining intensity decreased significantly ($P < 0,05$) when compared with the control group and the other corticosteroids injection groups. No structural differences were observed on light microscopy.

1 INTRODUÇÃO

Thorn citado por Hollander, aparentemente foi o primeiro a utilizar a aplicação de corticoesteróide no joelho de uma paciente com artrite reumatóide em 1950 (HOLLANDER et al.1951). HOLLANDER, JESSAR e BROWN JR (1961) relataram 100 mil aplicações após dez anos do uso desta substância em articulações, bursas e tendões de 4 mil pacientes com a ocorrência de apenas 14 infecções. Houve casos de até 142 infiltrações em um mesmo paciente, sem a ocorrência de efeito nocivo.

MANKIN e CONGER (1966a) relataram que a grande mudança no tratamento conservador de patologias articulares ocorreu pela introdução do tratamento com injeções de corticoesteróides e seus análogos.

O rápido alívio dos sintomas, bem como uma 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 (CHANDLER et al., 1959; ZACHARIAE, 1965; KELMAN et al., 1990; PARIKH et al., 1993). O mecanismo pelo qual o corticoesteróide ocasiona lesões no tecido cartilaginoso foi amplamente estudado experimentalmente, em animais e cultura de tecidos, mostrando que a redução de proteoglicanos tem papel chave na degradação da cartilagem articular.

Em contrapartida, um efeito condroprotetor foi evidenciado por BUTLER et al. (1983), PELLETIER et al. (1994, 1995), VERSCHURE et al. (1994). A aplicação intra-articular de corticoesteróides em doses baixas bloqueiam os efeitos deletérios gerados por processos inflamatórios, evitando a degradação da cartilagem. A utilização de corticoesteróide sistêmico ou intra-articular na vigência de infecção tem evitado uma maior agressão ao tecido cartilaginoso bem como uma recuperação mais rápida do ponto de vista funcional em animais (SAKINIENE; BREMELL; TARKOWSKI, 1996; STRICKER et al.1996; WYSENBECK, 1996).

Decorridos 55 anos de sua introdução, a aplicação de corticoesteróide intra-articular permanece controversa, ainda há dúvidas relacionadas ao mecanismo de ação, segurança e eficácia. 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 em evidência. Não há dúvidas que pela complexidade e baixo poder de regeneração da cartilagem articular qualquer tratamento que possa evitar sua degradação adquire importância.

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

2 REVISÃO DA LITERATURA

A cartilagem hialina que reveste as extremidades ósseas nas articulações diartrodiais possui características físico-químicas especiais que garantem uma mobilidade com baixo atrito e durabilidade que não foi alcançada por nenhuma das próteses existentes. Este tecido complexo varia em espessura, densidade celular, composição da matriz e propriedades mecânicas na mesma articulação, entre articulações e entre espécies. Entretanto os componentes são os mesmos em todas as articulações sinoviais (BUCKWALTER; MANKIN, 1997a).

A cartilagem hialina não possui vasos sanguíneos, vasos linfáticos ou nervos. Quando comparados com outros tecidos o seu potencial de reparação e o metabolismo são baixos. A sua complexa estrutura consiste de um tipo único de células, os condrócitos e matriz extracelular. Os condrócitos são responsáveis pela síntese dos inúmeros componentes da matriz, bem como por substâncias que a degradam. Comparativamente estas células podem ser metabolicamente mais ativas do que um macrófago. Possuem uma taxa glicolítica similar às células de outros tecidos vascularizados. Estas células variam em tamanho, forma e atividade metabólica nas diferentes camadas do tecido. Todas contêm as organelas para a síntese de matriz incluindo o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi. Frequentemente possuem filamentos intracitoplasmáticos, lipídeos, glicogênio e vesículas secretoras. Algumas células possuem cílios estendendo-se a matriz. Os condrócitos envolvem-se de matriz extracelular e não mantêm contacto célula-célula. Na cartilagem de adultos os condrócitos raramente se dividem. Com a idade a densidade de condrócitos declina principalmente nas camadas superficiais, sua capacidade de resposta é menor para inúmeros fatores, aumentando a probabilidade de degeneração.

A matriz é composta por líquido tissular e uma rede estrutural de moléculas que conferem ao tecido forma e estabilidade. O líquido tissular é composto por água, gases, pequenas proteínas, metabólitos e alta concentração de cátions para contrabalançar os proteoglicanos carregados negativamente. As macromoléculas estruturais respondem por 20% do peso total do tecido, deste percentual o colágeno corresponde a 60%, proteoglicanos 25% a 35% e proteínas não colágenas e glicoproteínas de 15% a 20%. A cartilagem articular contém múltiplos tipos

geneticamente distintos de colágeno, especificamente tipos II, VI, IX, X e XI. A organização destas fibrilas em uma forte rede que se estende por todo o tecido confere sua forma e resistência tênsil. O colágeno tipo II possui uma vida média de trezentos dias e está presente em maior quantidade na cartilagem articular normal. Nos processos artríticos o metabolismo e degradação do colágeno estão elevados. As metaloproteases têm sido implicadas na degradação do agrecano e colágeno tipo XI. O colágeno tipo XI, embora seja responsável por um pequeno percentual do colágeno total, influencia a espessura das fibras no interior da matriz, ligando-se entre si e com o colágeno tipo II, mantendo a rede fibrilar. O colágeno tipo X associa-se ao colágeno tipo II e é abundante no tecido pericelular de condrócitos na zona hipertrófica o que sugere um papel na manutenção da cartilagem a longo prazo. A transcrição do colágeno tipo X só foi encontrada em condrócitos na região da cartilagem calcificada. Contrastando com a meia-vida longa do colágeno as trocas de proteoglicanos são rápidas na cartilagem normal. A perda dos proteoglicanos nos processos inflamatórios é dada pela maior atividade das enzimas proteinases, metaloproteases e agrecanase (BRAY; FRANK; MINIACI, 1996; BUCKWALTER; MANKIN, 1997a, 1997b; CHAMBERS et al., 2002; ATTUR, 2002).

Estudos de fatores reguladores do metabolismo de carboidratos, denominados glicocorticoesteróides, culminaram com a síntese da cortisona. Logo após a cortisona sintética se tornar disponível, estudos demonstraram o dramático efeito dos glicocorticoesteróides e do hormônio adreno-cortico-trófico no tratamento da artrite reumatóide. Os corticoesteróides interagem com proteínas receptoras específicas nos tecidos alvos, com a finalidade de regular a expressão de genes responsivos, mudando os níveis e a disposição das proteínas sintetizadas. A maior parte dos efeitos dos corticoesteróides torna-se aparente após várias horas. Algumas ações mediadas por receptores na membrana celular são imediatas. Embora estas substâncias atuem predominantemente aumentando a expressão dos genes, existem exemplos bem documentados onde os corticoesteróides reduzem a transcrição dos genes alvos. Entre os genes regulados negativamente estão aqueles que codificam inúmeras citocinas, moléculas reguladoras que desempenham funções importantes nas redes inflamatória e imunológica (GOODMAN & GILMAN, 1996).

A seguir estão relacionados as potências relativas e doses equivalentes dos corticoesteróides representativos (tabela 1).

TABELA 1 - POTÊNCIAS RELATIVAS E DOSES EQUIVALENTES DOS CORTICOESTERÓIDES REPRESENTATIVOS

Composto	Potência anti-inflamatória	Potência de retenção de Na ⁺	Duração de ação	Dose equivalente
Cortisol	1	1	Curta	20
Cortisona	0.8	0.8	Curta	25
Fludrocortisona	10	125	Curta	#
Prednisona	4	0.8	Intermediária	5
Prednisolona	4	0.8	Intermediária	5
6 α -metilprednisolona	5	0.5	Intermediária	4
Triamcinolona	5	0	Intermediária	4
Betametasona	25	0	Longa	0.75
Dexametasona	25	0	Longa	0.75

FONTE: **GOODMAN & GILMAN as bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 1996. p.1088.

A aplicação intra-articular de corticoesteróides bloqueia os efeitos deletérios gerados por processos inflamatórios, evitando a degradação da cartilagem pela supressão de enzimas como as metaloproteases, estromelina, colagenase e agrecanase, diretamente ou através da inibição de fatores que estimulam a formação destas substâncias (PELLETIER; MARTEL-PELLETIER; MALEMUD, 1988; PELLETIER et al. 1994, 1995). A dosagem de corticoesteróide necessária para o bloqueio das metaloproteases é menor do que a requerida para a redução da síntese de proteoglicanos. As metaloproteases desempenham um papel de importância na degradação da matriz cartilaginosa e na perpetuação do processo. Experimentos *in vitro* sugerem um papel estimulador das citocinas como a interleucina-1 e fator de necrose tumoral que foram identificados na sinovial e cartilagem articular inflamadas. A interleucina-1 é bloqueada através da inibição da transcrição gênica e da redução da estabilidade do mRNA interleucina-1 β . Estes efeitos são alcançados com doses maiores do que as necessárias para a inibição da estromelina. Oncoproteínas como a c-Fos e a c-Myc que são importantes para a máxima estimulação da produção das metaloproteases. A oncoproteína c-Fos faz parte de um complexo heteromérico denominado proteína ativadora 1, estimulador

da formação de metaloproteases. A oncoproteína c-Myc, muito conhecida pelo seu envolvimento na proliferação celular, foi encontrada em quantidades maiores em articulações com osteoartrose. Há evidências *in vivo* que o corticoesteróide reduz a síntese destas oncoproteínas. Um mecanismo direto bloqueando produção da síntese protéica tanto translacional como transcricional pode ocorrer (GOODMAN & GILMAN, 1996; MACLEOD et al., 1998; PELLETIER; MARTEL-PELLETIER, 1989; PELLETIER et al., 1994, 1995).

MANKIN e CONGER (1966a) realizaram estudo demonstrando o efeito do acetato de hidrocortisona intra-articular, em doses de 0.16 mg/kg e 1.6 mg/kg, na incorporação de glicina H3 na cartilagem articular de coelhos. Os dados obtidos permitiram concluir que o cortisol causa uma rápida e profunda depressão na utilização da glicina para aproximadamente 1/3 dos valores normais em seis horas. A recuperação é lenta e ocorreu em três dias para as menores doses e quase duas semanas para as maiores doses. O significado destas observações leva à conclusão de que a incorporação da glicina H3 pode ser equiparada com a síntese protéica e que o cortisol causa um decréscimo na síntese de matriz durante o período do efeito. A importância do estudo reside na demonstração da capacidade de uma forma menos solúvel do corticoesteróide permanecer essencialmente intra-articular com efeito sistêmico notado após a aplicação de doses maiores.

MANKIN e CONGER (1966b) estudaram o efeito do cortisol, administrando uma dose de 3 mg/kg na cartilagem articular de coelhos imaturos. No intervalo de 24 horas a glicina injetada teve sua incorporação avaliada. Os dados demonstraram que o cortisol deprime a incorporação de glicina C na cartilagem de ambos os joelhos em duas horas, com um efeito maior no joelho infiltrado. Após seis horas o efeito era similar em ambos os joelhos e em dez horas o nível de incorporação já havia sido recuperado.

UITTO e MUSTAKALLIO (1971) estudaram o efeito da hidrocortisona, fluocinolona, fluclorolona, betametasona e acetato de flupredniliden na biossíntese de colágeno. A biossíntese de colágeno, principal proteína fibrilar do tecido conjuntivo, segue os princípios básicos da síntese protéica. Entretanto o colágeno é composto por uma grande quantidade de hidroxiprolina e aminoácidos derivados da hidroxilação da prolina, prontamente incorporada no polipeptídeo precursor do colágeno chamado de protocólágeno. Consequentemente a formação da

hidroxiprolina radioativa pode ser obtida como um indicador da formação do colágeno. A síntese protéica total pode ser estimada pela incorporação global do C14 nas proteínas não dialisáveis. A hidroxilação dos resíduos da prolina é catalisada por uma enzima protocolageno prolina hidroxilase. Esta enzima está elevada quando a síntese de colágeno ocorre. Neste estudo a formação de colágeno foi estudada na tíbia do embrião de galinha. Quando administrado *in vivo* todas as preparações de corticoesteróide utilizadas reduziram a formação de C14 hidroxiprolina. Não houve uma diferença significativa no grau de inibição da síntese protéica com o uso das diferentes formulações do corticoesteróide. *In vitro* há necessidade de maiores concentrações de corticoesteróide para inibir a síntese protéica e nesta condição a betametasona demonstrou um efeito superior. A conclusão do estudo sugere que o corticoesteróide inibe a biossíntese do colágeno interferindo na formação do polipeptídeo precursor do colágeno. Este efeito é provavelmente o resultado de um bloqueio na síntese protéica global.

SHAW e LACEY (1973) estudaram o efeito dos corticoesteróides na cartilagem articular em joelhos de coelho normais e com artrite provocada pela papaína. Observaram que nos animais tratados com corticoesteróide não houve recuperação deste tecido.

BEHRENS, SHEPARD e MITCHELL (1975) relataram múltiplas lesões amareladas visíveis macroscopicamente no platô tibial e côndilo femoral em áreas de apoio em 50% dos coelhos infiltrados com 25 mg de acetato de hidrocortisona nos 2 joelhos entre 8 e 12 vezes com intervalos semanais. Estas lesões microscopicamente apresentavam-se como cistos preenchidos com *debris* tissulares. As fissuras que existiam em conjunção com os cistos estavam separadas destes por uma pseudo-cápsula indicando que as fissuras eram formadas por falhas das zonas superficial e média. Na microscopia eletrônica, em áreas que não suportam peso, os retículos endoplasmáticos, complexos de Golgi e mitocôndrias estavam diminuídos pela metade. Nas áreas de apoio do platô tibial e côndilo femoral os complexos de Golgi, mitocôndrias e retículo endoplasmático estavam na maioria das vezes ausentes. A incorporação de substâncias precursoras na síntese protéica estava diminuída nos coelhos tratados com corticoesteróide. A dosagem de DNA não demonstrou alteração significativa, o que indica que o corticoesteróide não tem um efeito maior na viabilidade celular. A redução das organelas encontra

paralelo na redução da síntese de matriz. A redução progressiva de proteoglicanos foi surpreendente, devido a sua meia-vida estar em torno de oito a dez dias. A concentração de colágeno não apresentou grande variação talvez devido a sua meia-vida longa, em torno de 300 dias. A síntese de colágeno estava reduzida mais intensamente do que a protéica.

BEHRENS, SHEPARD e MITCHELL (1976) demonstraram a recuperação do tecido cartilaginoso após 9 infiltrações com 25 mg de hidrocortisona com intervalos semanais. A capacidade de síntese celular aumentou sensivelmente nas primeiras seis semanas de recuperação. Os autores acreditam que a integridade bioquímica cartilaginosa pode ser readquirida.

BARKER e MARTINEK (1976) analisaram o efeito da hidrocortisona na ultra-estrutura da cartilagem articular em joelhos de coelhos. Foram utilizadas doses proporcionais e frequência similares às utilizadas no tratamento humano. Não observaram alterações na ultra-estrutura citológica.

HIGUCHI et al. (1980) estudaram a ultra-estrutura da cartilagem articular após a administração sistêmica de hidrocortisona em coelhos. Observaram que o tratamento sistêmico com hidrocortisona em doses diárias de 1 a 5 mg/kg por 12 semanas induziu degeneração celular.

BUTLER et al. (1983) avaliaram o efeito anti-osteoartrítico de drogas administradas na articulação de coelhos submetidos à meniscectomia lateral parcial e secção dos ligamentos sesamóide e colateral fibular. Os resultados obtidos mostraram que o corticoesteróide (triamcinolona) utilizado em dose única de 1 mg reduziu a desorganização e perda de condrócitos, bem como a incidência de osteófitos nos joelhos destes animais.

ISHIKAWA, OHIRA e SAKATA (1984) realizaram estudo comparativo dos efeitos da aplicação intra-articular, em joelhos de coelhos, do acetato de metilprednisolona e do diacetato de halopredone. Observaram que as duas substâncias ocasionaram lesões após repetidas infiltrações com intervalo semanal.

HAINQUE et al. (1987) estudaram os efeitos da dexametasona em condrócitos articulares de coelho e sua relação com receptores nucleares. Observaram que os condrócitos em cultura são alvo dos corticoesteróides. Os efeitos inibitórios do crescimento celular ocorrem como consequência de mais de um mecanismo de ação. Em adição ao controle direto no qual receptores celulares estão

envolvidos em menor amplitude, o efeito predominante ocorre provavelmente devido a inibições metabólicas múltiplas.

ITANI et al. (1992) verificaram o efeito da aplicação de hidrocortisona intramuscular em coelhos. A análise foi feita na cartilagem articular do joelho e na cartilagem da traquéia. Observaram redução do volume do retículo endoplasmático rugoso nas três camadas da cartilagem articular, notadamente mais acentuada nas camadas superficial e média. Na cartilagem traqueal a redução se mostrou uniforme. Não houve redução dos depósitos de glicogênio. O tamanho e densidade dos condrócitos não apresentaram variações.

PAPACHRISTOU, ANAGNOSTOU e KATSORHIS (1997) avaliaram o efeito da hidrocortisona 25, 50 e 100 mg injetada em articulações de coelho. Encontraram alteração na forma dos condrócitos, mudanças anormais no citoplasma e núcleo, levando a uma degeneração celular. Estas alterações notadas eram dose dependente.

FUBINI et al. (2001) realizaram estudo experimental em cultura de tecidos e concluíram que a metil-prednisolona alterou o fenótipo de diferenciação do condrócito articular sem a trans-diferenciação em fibroblastos. Houve supressão da produção do colágeno tipo II somente após o aumento da concentração média do corticoesteróide acima de 10^4 pg/ml. Uma dosagem de 0.1 mg/kg foi suficiente para reduzir os níveis de fibronectina. As propriedades funcionais da fibronectina não estão bem definidas, mas há indícios de que tenham um papel importante tanto na organização estrutural como nas propriedades biomecânicas da matriz cartilaginosa ou na regulagem do fenótipo condrocítico. A viabilidade celular caiu de 84% com uma concentração média de metil-prednisolona de 1×10^8 pg/ml para 4% em uma concentração média de metil-prednisolona de 1×10^9 pg/ml (2.0 mM). Uma infiltração de 80 mg (40 mg/ml) em uma articulação contendo 6 ml de líquido sinovial resulta em uma concentração de 10 mg/ml ou 25 mM que a depender do clearance da droga poderia manter-se em níveis muito acima dos 2.0 mM que são tóxicos para as células. Estes parâmetros podem variar em função do exercício e processos inflamatórios.

HORISAWA et al. (2002) avaliaram a ação de nano esferas de polímero DL Lático/Glicólico contendo fosfato sódico de betametasona, aplicadas em joelhos de coelhos, com artrite induzida por reação antigênica. Este sistema de carreamento

medicamentoso propiciou uma liberação prolongada da betametasona por um período de três semanas em baixa concentração. Obtiveram um efeito anti-inflamatório local prolongado sem lesões teciduais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi desenvolvido no biotério do curso de pós graduação da Universidade Federal do Paraná no período fevereiro a dezembro de 2002.

Oitenta coelhos, “*Oryctolagus cuniculus*”, californianos adultos de ambos os sexos pesando entre 2.950 e 3.300g, (média de 3200g) adquiridos de um criador de animais, foram divididos em 8 grupos de 10 animais e mantidos em gaiolas convencionais para coelhos contendo cada uma no máximo 5 animais. As gaiolas foram marcadas para identificação dos grupos. Os coelhos foram alimentados com ração agrária ecológica e água filtrada.

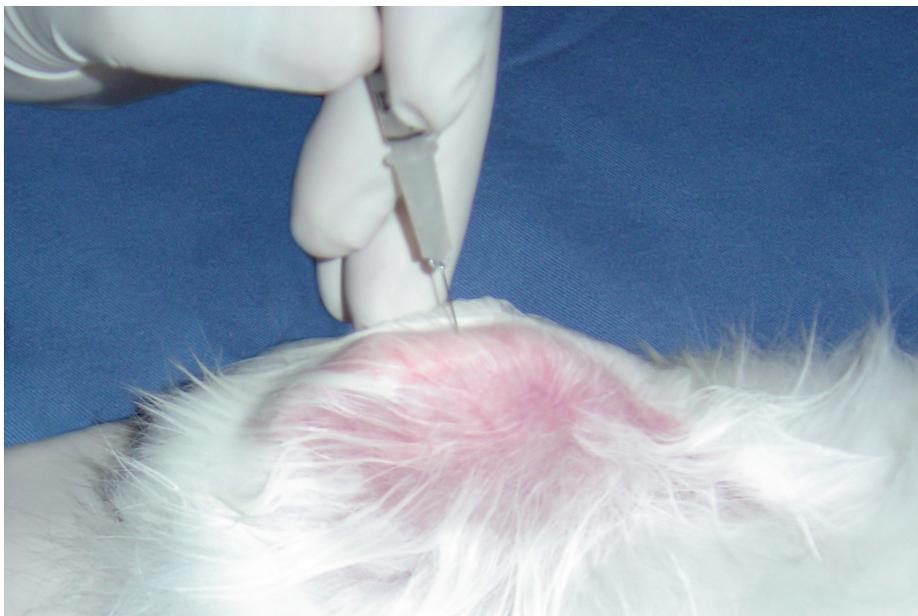
A dosagem da medicação a ser aplicada foi calculada tomando-se como base um peso médio de 65kg para humanos. Os coelhos apresentavam peso correspondente a 1/20 do peso corpóreo humano. Cada ampola do medicamento (Diprospan®) contendo 1 ml da solução de corticosteróide composto por dipropionato de betametasona e fosfato dissódico de betametasona foi diluída em 9 ml de solução salina isotônica 0,9%. Desta solução infiltrava-se na articulação 0,5 ml que continha 0,25mg de dipropionato e 0,1 como fosfato. Esta dose correspondia a 1/20 da utilizada em aplicações intra articulares nos joelhos de humanos.

Para as aplicações foram utilizadas luvas, agulhas e seringas descartáveis de vacina com capacidade de 1 ml com graduação decimal. A pele da soldra (ARCE e FLECHTMANN, 1989) caudal direita dos animais era preparada com clorhexidine e solução de álcool 70%, não houve necessidade de se realizar tricotomia, pois ao se umedecer o local da aplicação o tendão patelar, patela e a linha articular eram facilmente identificados (figs.1 e 2).

FIGURA 1 – FOTOGRAFIA DA APLICAÇÃO INTRA-ARTICULAR DE CORTICOESTERÓIDE NA SOLDRA CAUDAL DIREITA.



FIGURA 2 – FOTOGRAFIA DA APLICAÇÃO DE CORTICOESTERÓIDE NA SOLDRA CAUDAL (VISTA MEDIAL)



O intervalo adotado entre as aplicações para os grupos que receberam mais de uma dose do medicamento ou placebo foi semanal para comparação com a literatura (tabela 2).

TABELA 2 – DISTRIBUIÇÃO DAS DOSES DE MEDICAMENTO E PLACEBO NOS DIFERENTES GRUPOS.

Grupo	Substancia aplicada	Numero de aplicações	Volume aplicado	Intervalo
I	Solução salina 0,9%	0	0,5ml	-----
II	Solução salina 0,9%	1	0,5ml	Dose única
III	Solução salina 0,9%	8	0,5 ml	Semanal
IV	Betametasona Dipropionato 0,25mg Fosfato 0,1mg	1	0,5ml	Dose única
V	Betametasona Dipropionato 0,25mg Fosfato 0,1mg	2	0,5ml	Semanal
VI	Betametasona Dipropionato 0,25mg Fosfato 0,1mg	4	0,5ml	Semanal
VII	Betametasona Dipropionato 0,25mg Fosfato 0,1mg	6	0,5ml	Semanal
VIII	Betametasona Dipropionato 0,25mg Fosfato 0,1mg	8	0,5ml	Semanal

Todos os coelhos foram submetidos à eutanásia oito dias após a última infiltração programada para o grupo a que pertencia, o grupo controle sem infiltração ao final do experimento. Para a eutanásia os animais foram primeiramente anestesiados com Ketamina 100mg/kg e Xilasina 8mg/kg intra-muscular e posteriormente submetidos injeção intra cardíaca de cloreto de potássio 10ml . Os joelhos foram dissecados separando-se os platôs tibiais (fig. 3) e colocados em recipientes individuais com formol a 10%. Os frascos etiquetados para identificação dos grupos foram enviados ao serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UFPR.

FIGURA 3 – FOTOGRAFIA DO PLANALTO TIBIAL DE ESPÉCIME
PERTENCENTE AO GRUPO VI



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 o corante safranina O para coloração de uma lâmina do platô medial e outra do lateral, o mesmo procedimento foi realizado para coloração com hematoxilina e eosina. As lâminas coradas com hematoxilina e eosina foram analisadas pela microscopia óptica convencional pelo patologista, para averiguar se houve lesão tecidual.

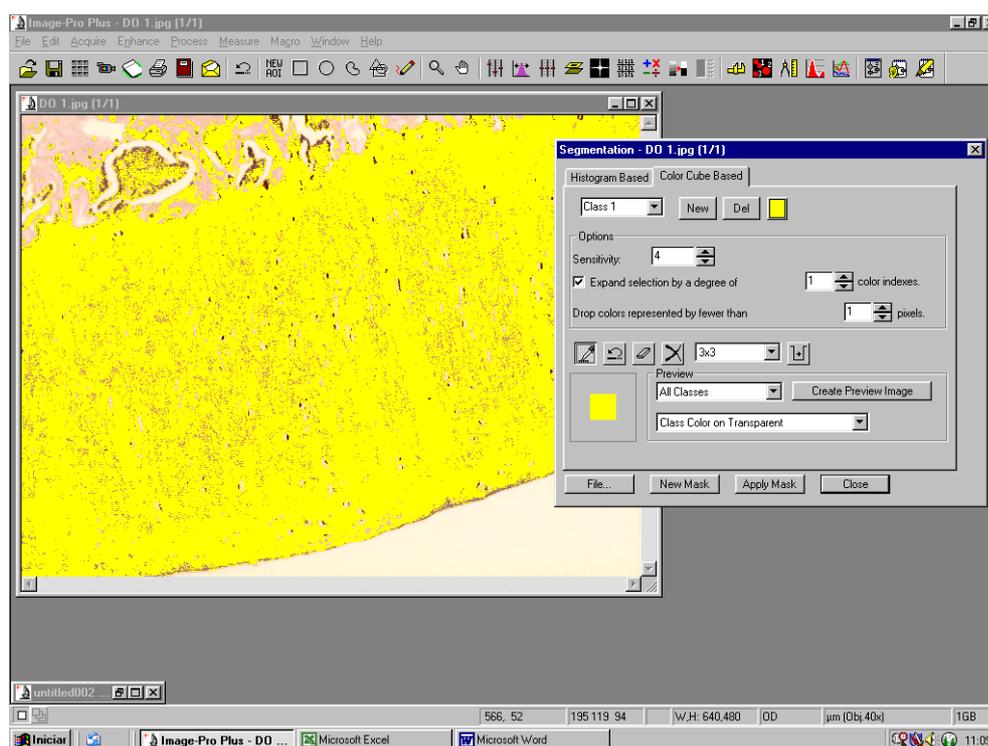
As lâminas coradas com a safranina O foram levadas para análise em um aparelho de histomorfometria composto por microscópio Olympus BX 50 ligado a um computador que utiliza o software Image Pro-plus versão 4.5 da Media Cybernetics (fig. 4).

FIGURA 4 - MICROSCÓPIO OLYMPUS BX 50 E COMPUTADOR



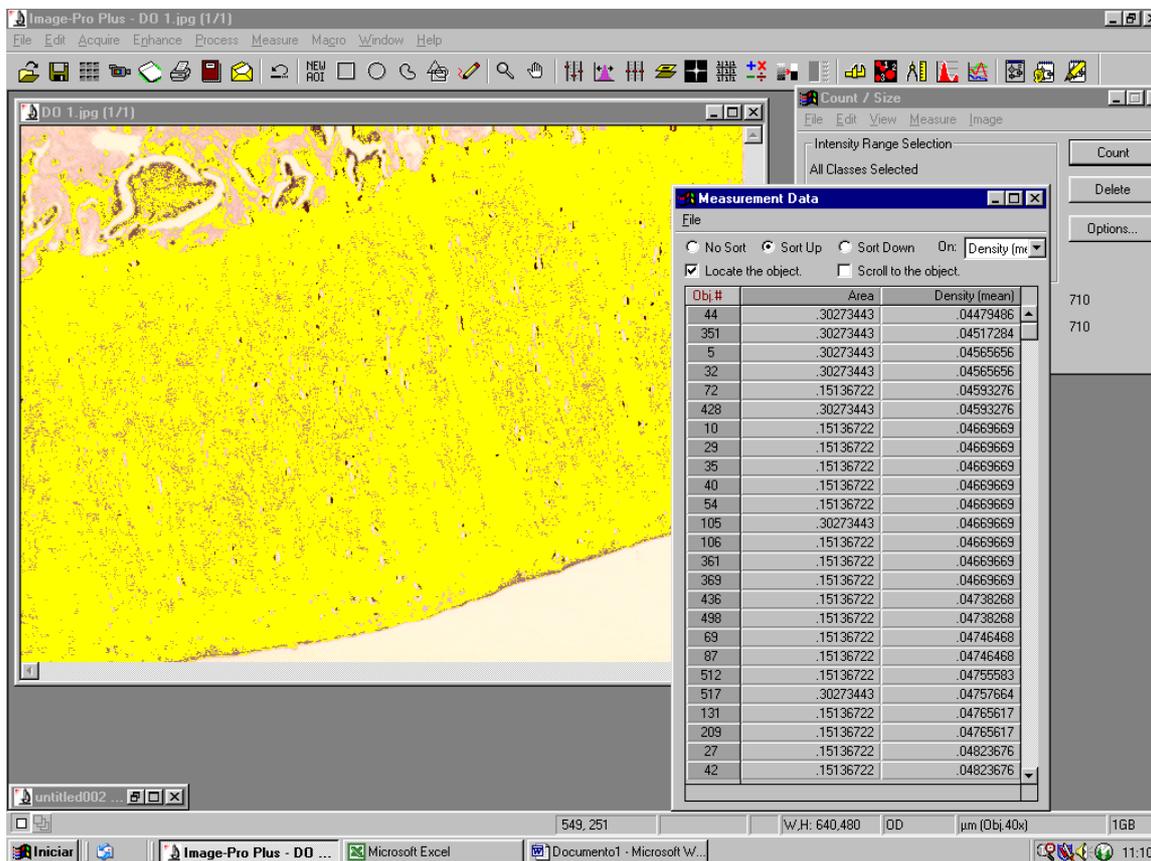
A intensidade da coloração pela safranina O foi mensurada em cada lâmina com iluminação padrão, utilizando um aumento de dez vezes. A imagem capturada pelo aparelho foi analisada pelo software que quantificava os pixels da coloração (fig. 5).

FIGURA 5 – MÉTODO DE AVALIAÇÃO DE INTENSIDADE DA COLORAÇÃO



Desta análise pelo software já se obtinha gráficos com as médias de densidade óptica de cada lâmina (fig. 6).

FIGURA 6 - TABELA GERADA COM MEDIDAS DE ÁREA E DENSIDADE ÓPTICA



Os resultados obtidos foram dispostos em tabelas e gráficos e analisados estatisticamente.

4 RESULTADOS

Os platôs tibiais apresentavam a superfície cartilaginosa brilhante e lisa sem sinais de erosões ou rugosidades nos grupos I, II, III, IV, V e VI (fig. 7).

Notavam-se granulações esbranquiçadas presentes nos dois platôs em três casos do grupo VII e seis do grupo VIII (fig. 8). Nos três casos que apresentaram aumento de volume na ocasião da cirurgia, havia granulações grosseiras mais acentuadas no platô medial próximo à inserção ligamentar (fig. 9).

FIGURA 7 - FOTOGRAFIA DE PLANALTO TIBIAL DEMONSTRANDO CARTILAGEM SEM LESÕES MACROSCÓPICAS (GRUPO III CONTROLE).



FIGURA 8 - FOTOGRAFIA DE PLANALTO TIBIAL COM MENISCOS, EVIDENCIANDO GRANULAÇÕES NA CARTILAGEM APÓS A OITAVA APLICAÇÃO DE CORTICOESTERÓIDE.



FIGURA 9 - FOTOGRAFIA DE PLANALTO TIBIAL APÓS A SEXTA APLICAÇÃO DE CORTICOSTERÓIDE.



FIGURA 10 - FOTOGRAFIA DE PLANALTO TIBIAL APÓS A OITAVA APLICAÇÃO DE CORTICOSTERÓIDE, EVIDENCIANDO GRANULAÇÕES GROSSEIRAS .



A seguir estão alguns exemplos dos cortes histológicos obtidos dos diferentes grupos que foram corados com hematoxilina e eosina.

FIGURA 11 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM HEMATOXILINA E EOSINA. ESPÉCIME PERTENCENTE AO GRUPO II CONTROLE.

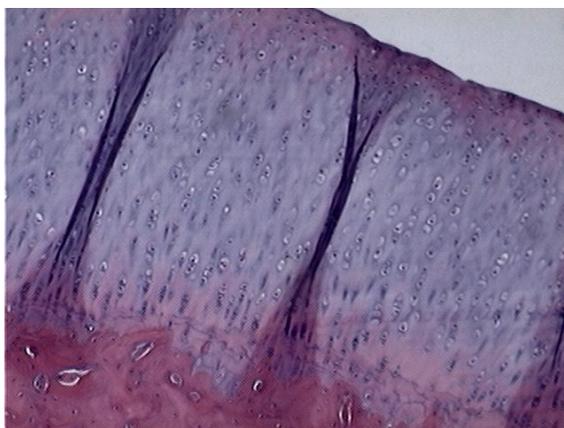


FIGURA 12 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM HEMATOXILINA E EOSINA. ESPÉCIME PERTENCENTE AO GRUPO III CONTROLE.

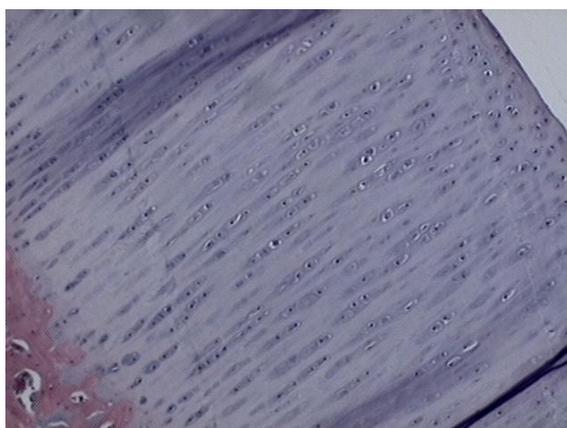


FIGURA 13 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM HEMATOXILINA E EOSINA. ESPÉCIME PERTENCENTE AO GRUPO IV (UMA APLICAÇÃO DE CORTICOESTERÓIDE).

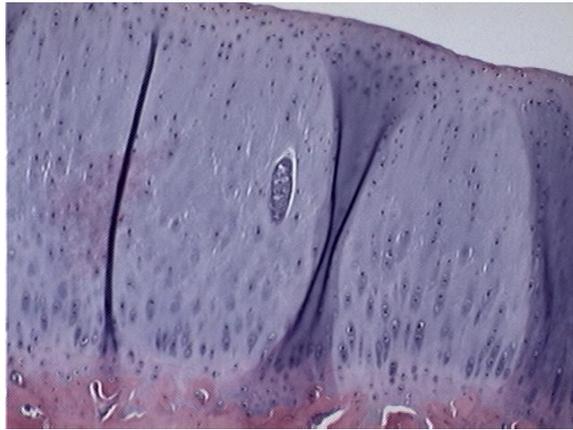


FIGURA 14 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM HEMATOXILINA E EOSINA. ESPÉCIME PERTENCENTE AO GRUPO V (DUAS APLICAÇÕES DE CORTICOESTERÓIDE).

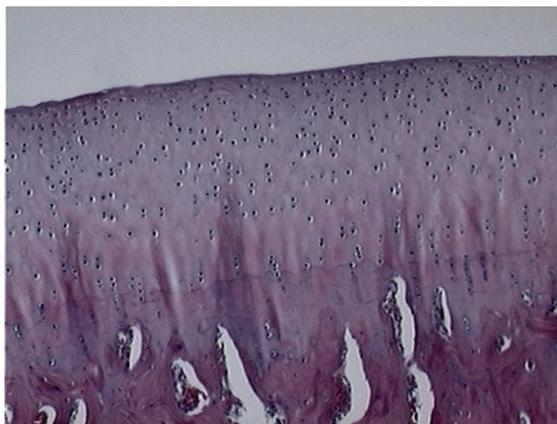


FIGURA 15 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM HEMATOXILINA E EOSINA DE ESPÉCIME PERTENCENTE AO GRUPO VI (QUATRO APLICAÇÕES DE CORTICOESTERÓIDE).

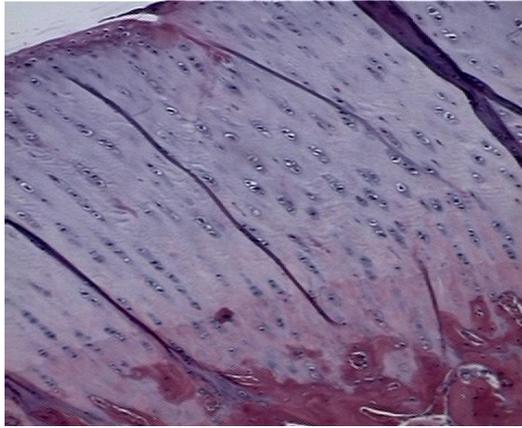


FIGURA 16 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM HEMATOXILINA E EOSINA PERTENCENTE AO GRUPO VII (SEIS APLICAÇÕES DE CORTICOESTERÓIDE).

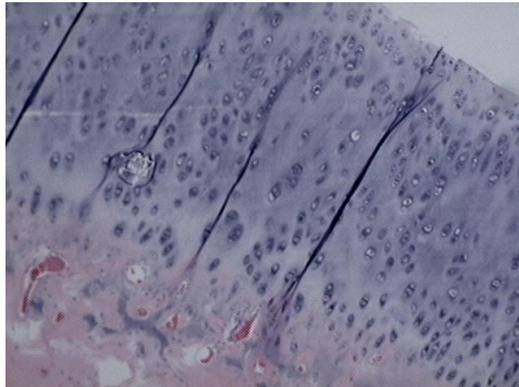
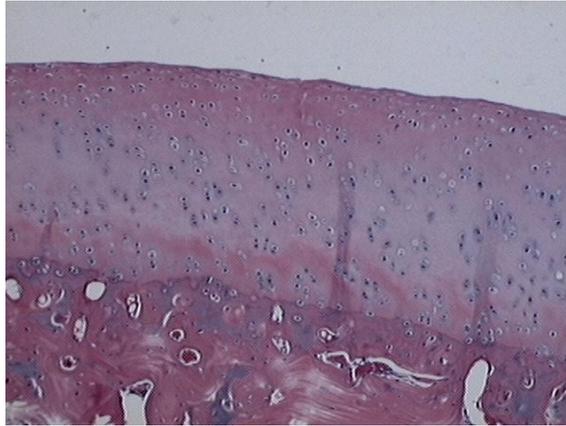


FIGURA 17 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM HEMATOXILINA E EOSINA. DE ESPÉCIME PERTENCENTE AO GRUPO VIII (OITO APLICAÇÕES DE CORTICOESTERÓIDE).



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

A seguir estão exemplos de cortes histológicos corados com safranina O.

FIGURA 18 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM SAFRANINA O. ESPÉCIME PERTENCENTE AO GRUPO II CONTROLE.

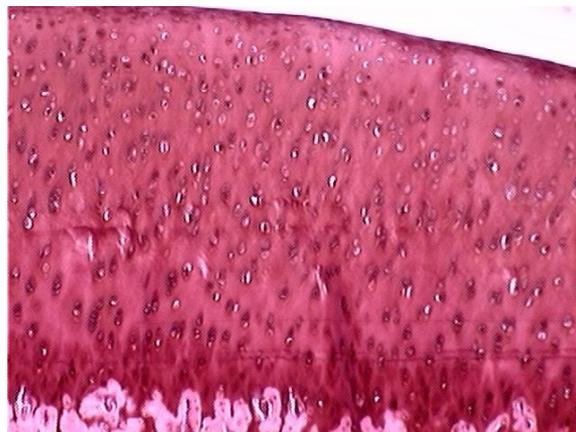


FIGURA 19 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM SAFRANINA O. ESPÉCIME PERTENCENTE AO GRUPO IV (UMA APLICAÇÃO DE CORTICOESTERÓIDE).

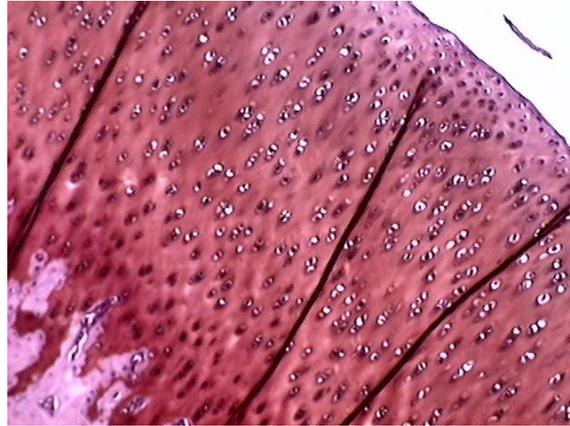


FIGURA 20 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM SAFRANINA O. ESPÉCIME PERTENCENTE AO GRUPO V (DUAS APLICAÇÕES DE CORTICOESTERÓIDE).

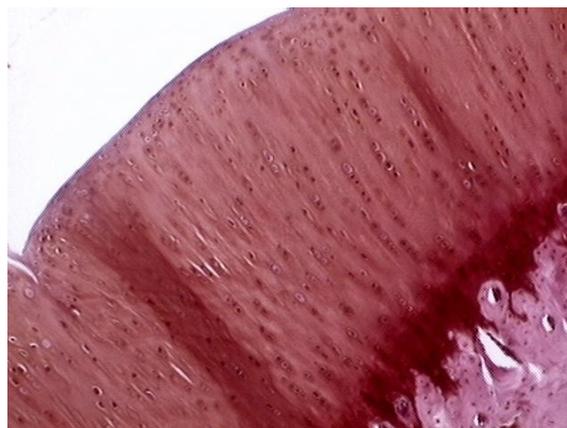


FIGURA 21 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM SAFRANINA O. ESPÉCIME PERTENCENTE AO GRUPO VI (QUATRO APLICAÇÕES DE CORTICOESTERÓIDE).

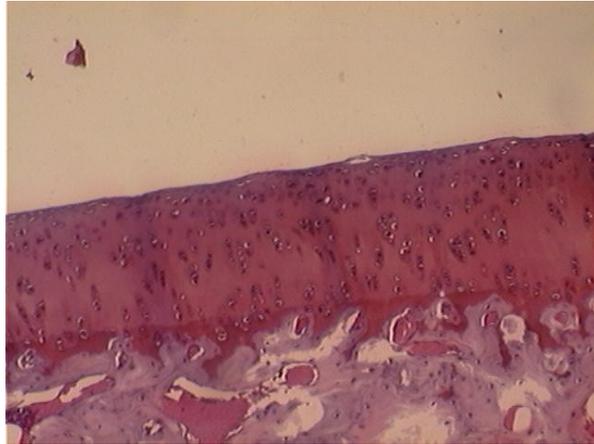


FIGURA 22 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM SAFRANINA O. ESPÉCIME PERTENCENTE AO GRUPO VII (SEIS APLICAÇÕES DE CORTICOESTERÓIDE).

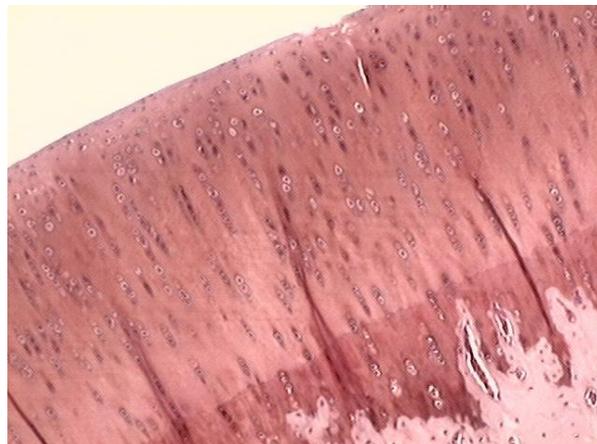
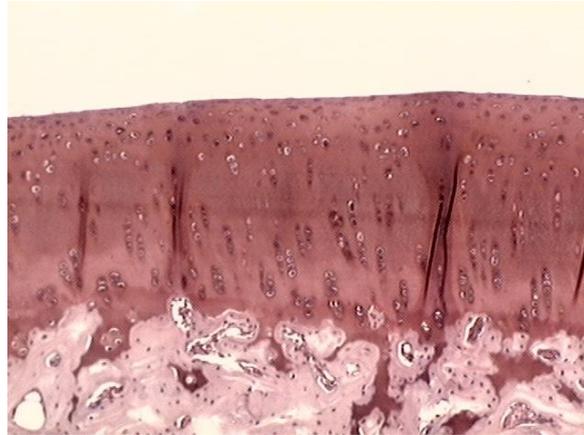


FIGURA 23 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM SAFRANINA O. ESPÉCIME PERTENCENTE AO GRUPO VIII (OITO APLICAÇÕES DE CORTICOESTERÓIDE).



A avaliação da intensidade de coloração dos cortes histológicos corados pela safranina O pelo aparelho de histomorfometria gerou resultados que foram dispostos em tabelas e gráficos. A seguir estão os gráficos fornecidos pelo programa, representativos da intensidade de coloração mensurada em cada lâmina, duas para cada espécime. As lâminas do planalto medial são designadas pela letra “A” e as do planalto lateral letra “B” nos diferentes grupos demonstrados nos gráficos a seguir. (gráficos de 1 a 8).

GRÁFICO 1 – DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA (GRUPO I CONTROLE).

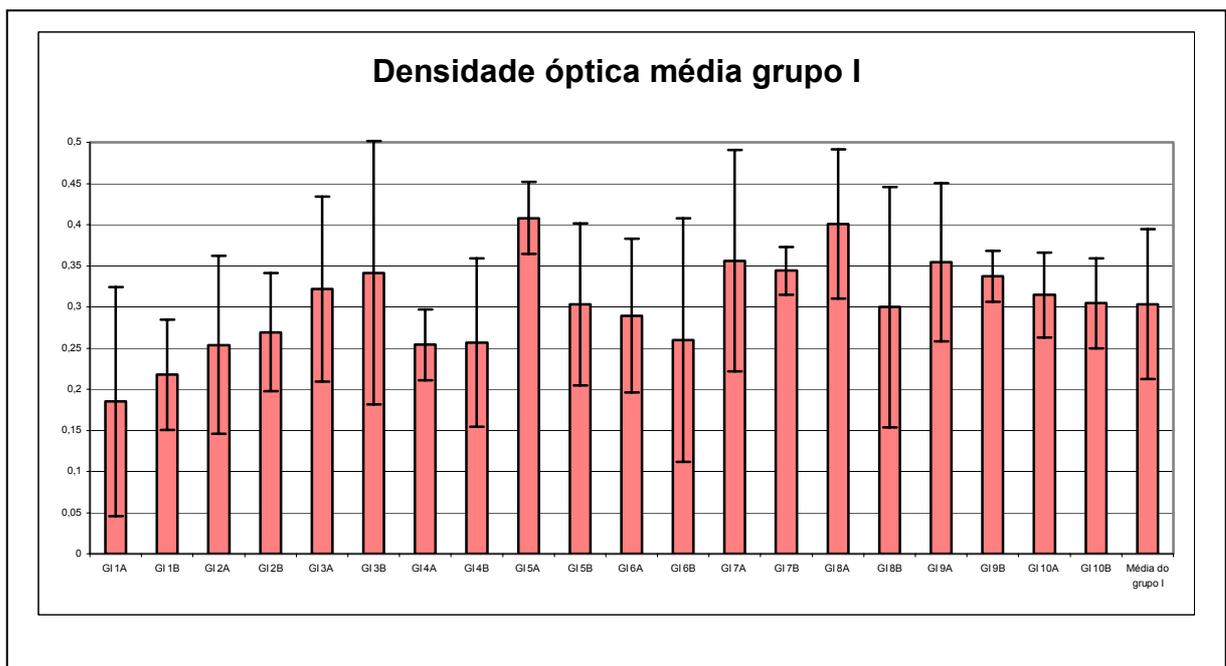


GRÁFICO 2 – DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA (GRUPO II CONTROLE)

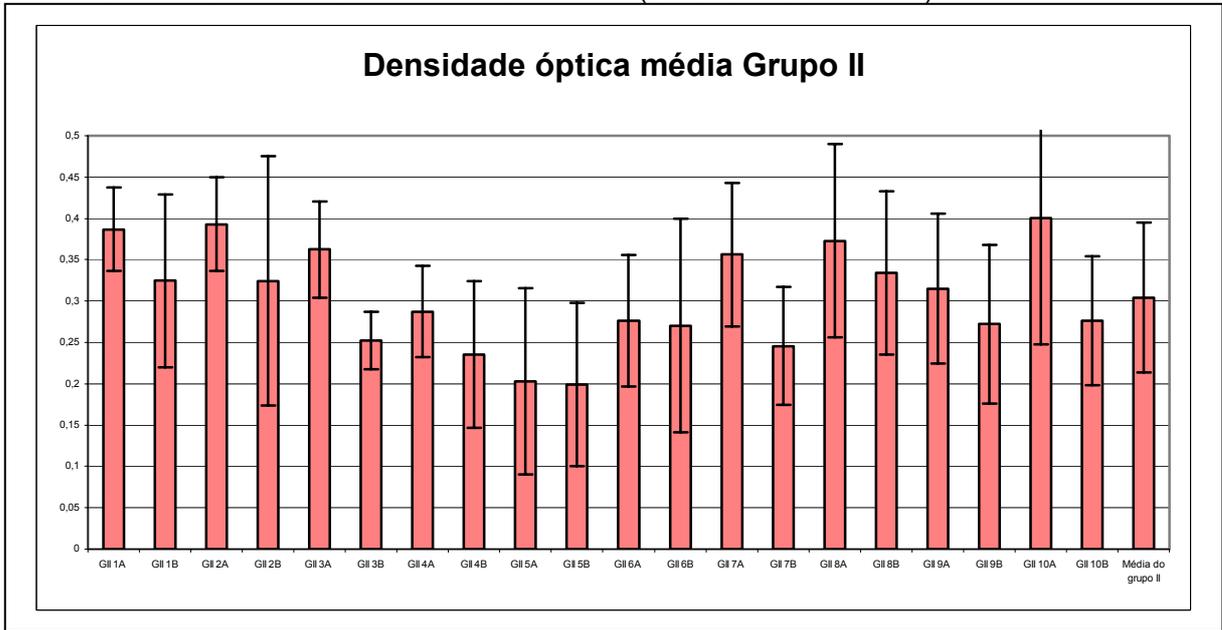


GRÁFICO 3 – DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA (GRUPO III CONTROLE)

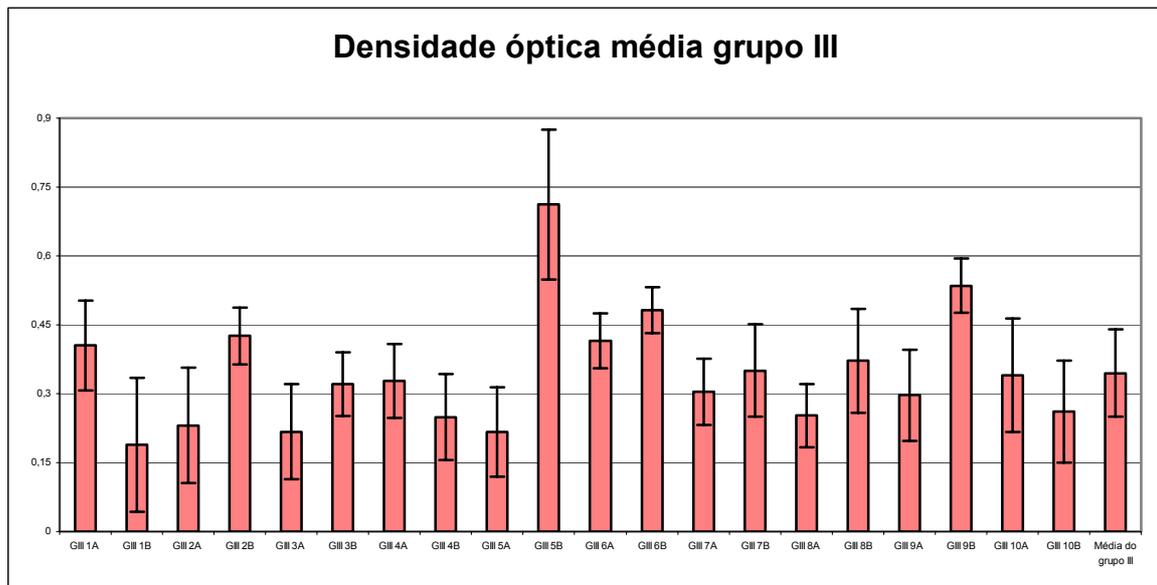


GRÁFICO 4 – DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA (GRUPO IV CORTICOESTERÓIDE)

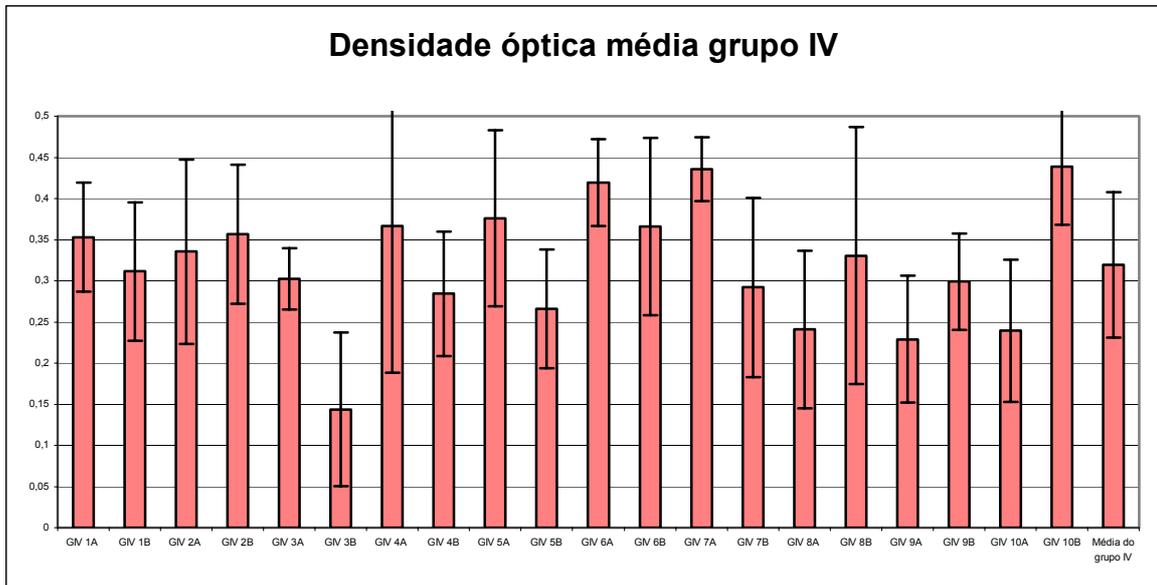


GRÁFICO 5 – DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA (GRUPO V CORTICOESTERÓIDE)

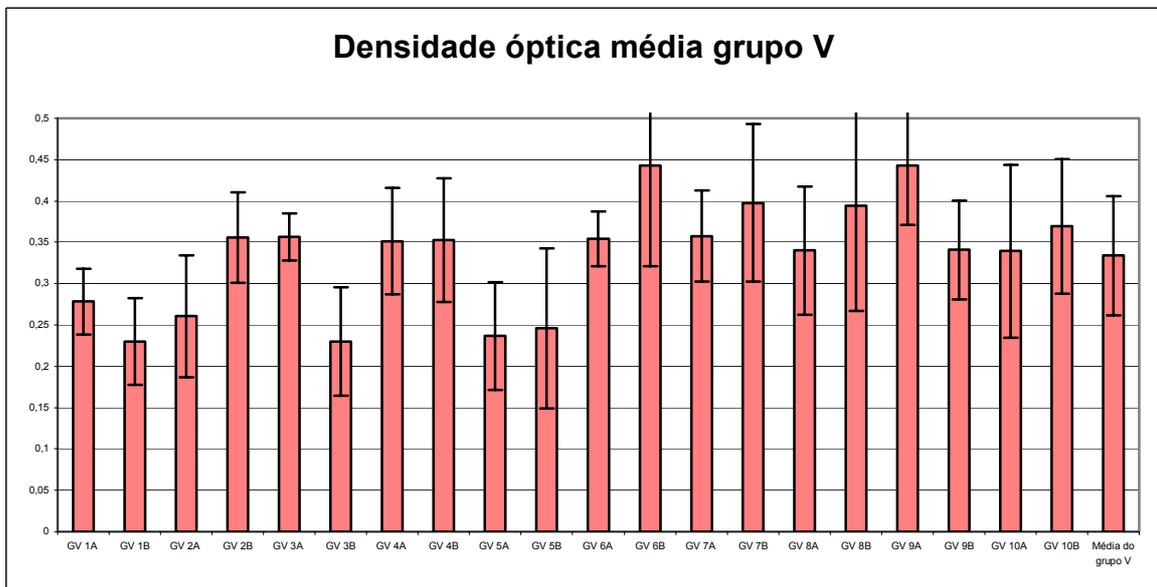


GRÁFICO 6 – DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA (GRUPO VI CORTICOESTERÓIDE)

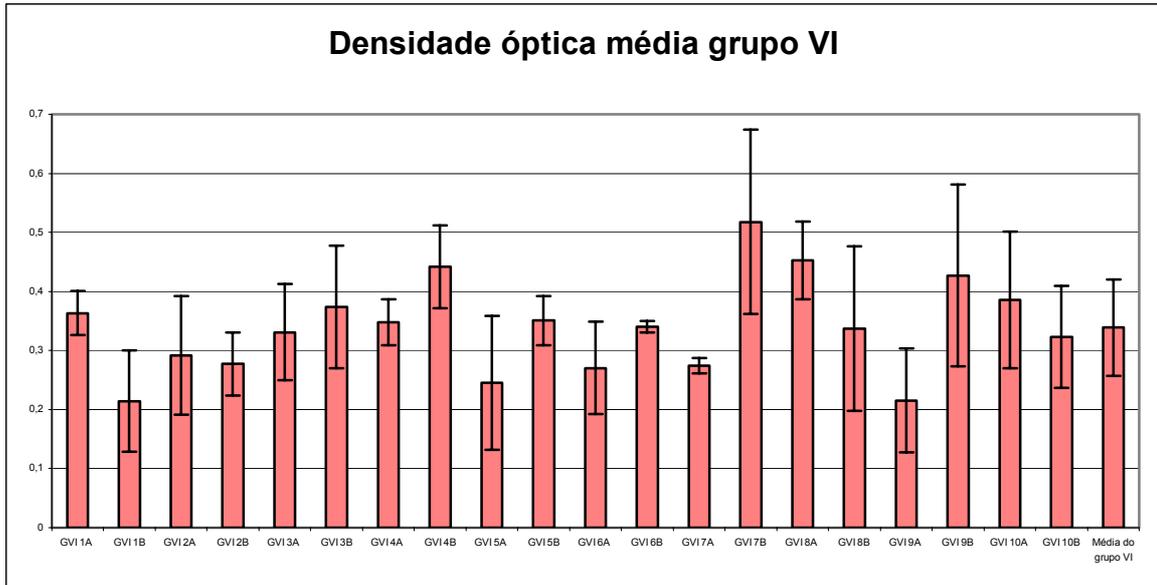


GRÁFICO 7 – DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA (GRUPO VII CORTICOESTERÓIDE)

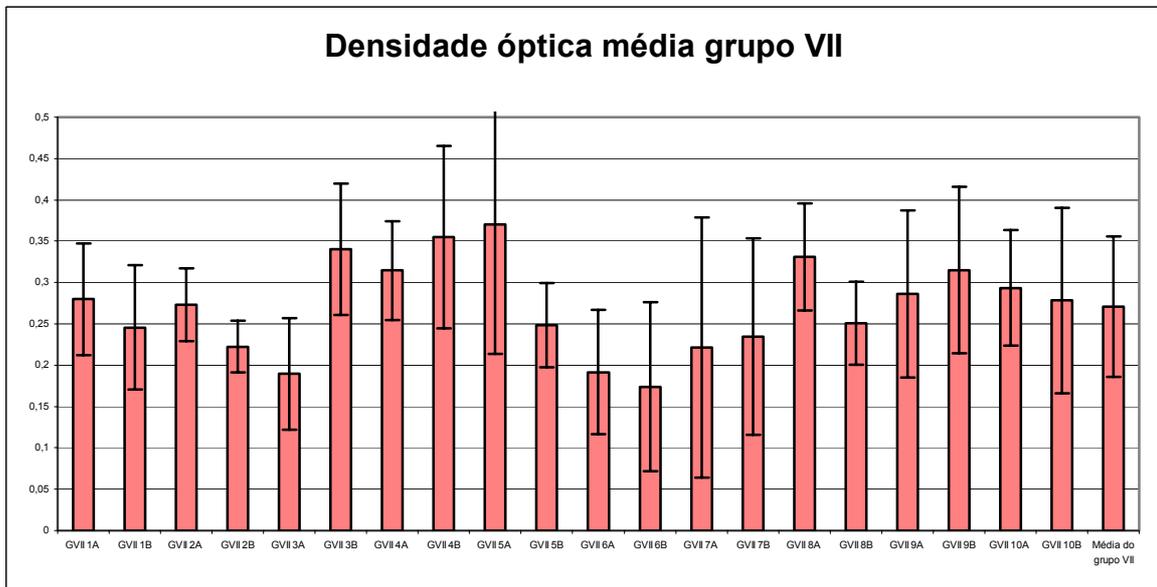
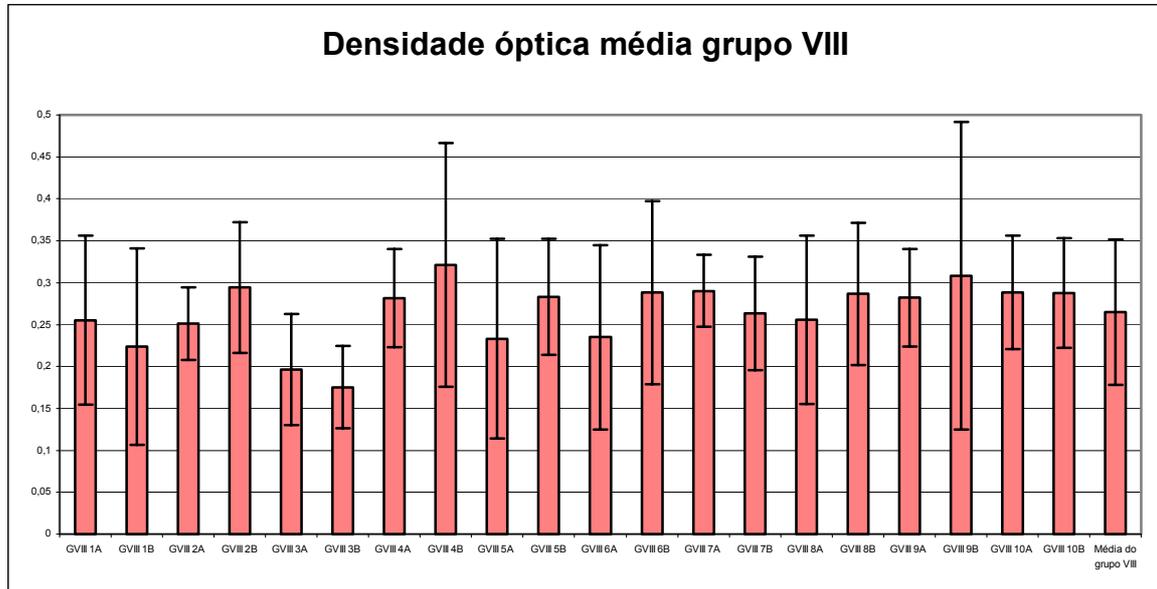


GRÁFICO 8 – DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA (GRUPO VIII CORTICOESTERÓIDE)



4.1 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 (TRIOLA, 2005; NETER, 1996).

Testou-se a hipótese nula de variâncias iguais em todos os grupos, versus a hipótese alternativa de pelo menos um grupo com variância diferente. O resultado do teste indicou a não rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5% ($p=0,5968$). Em seguida, testou-se a hipótese nula de médias de densidade óptica iguais em todos os grupos, versus a hipótese alternativa de pelo um dos grupos com

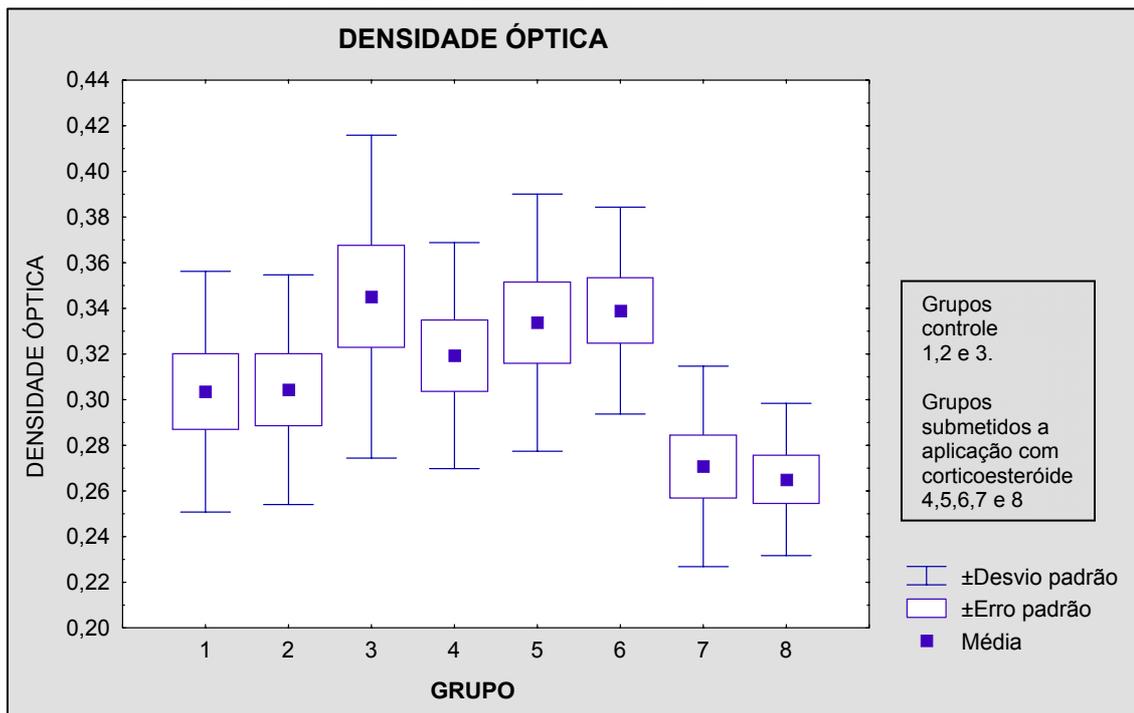
média diferente dos demais. O resultado do teste indicou a rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5% ($p=0,0030$). A comparação das médias de densidade óptica fornecidas pelo software foram feitas grupo a grupo sempre observando o nível de significância de 5%. Os dados em negrito demonstram os grupos com diferença estatisticamente significativa (tabela 3).

TABELA 3 – ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS GRUPOS LEVANDO-SE EM CONTA O VALOR DE p

Grupos sob comparação	Valor de p
I x II	0,9700
I x III	0,0736
I x IV	0,4929
I x V	0,1911
I x VI	0,1257
I x VII	0,1579
I x VIII	0,0980
II x III	0,0796
II x IV	0,5168
II x V	0,2040
II x VI	0,1351
II x VII	0,1473
II x VIII	0,0908
III x IV	0,2637
III x V	0,6214
III x VI	0,7906
III x VII	0,0018
III x VIII	0,0008
IV x V	0,5304
IV x VI	0,3927
IV x VII	0,0378
IV x VIII	0,0207
V x VI	0,8192
V x VII	0,0076
V x VIII	0,0037
VI x VII	0,0040
VI x VIII	0,0019
VII x VIII	0,8038

Adicionalmente, foi apresentado um gráfico de Box-Plot para demonstrar as diferenças dos resultados obtidos nos diferentes grupos. Observa-se claramente a tendência crescente de redução dos proteoglicanos a medida que o número de aplicações aumenta (graf. 9).

GRÁFICO 9 - APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS DE MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DA DENSIDADE ÓPTICA DE CADA UM DOS GRUPOS.



5 DISCUSSÃO

A intenção de avaliar os efeitos do corticoesteróide composto partiu do princípio de que não foram encontrados na literatura trabalhos que testassem a composição dipropionato de betametasona e fosfato dissódico de betametasona. 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 sistêmicos (CALDWELL, 1996). 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 (McCARTY; HOGAN, 1964). Esta associação de corticoesteróides poderia resultar em uma maior supressão da síntese protéica na matriz cartilaginosa levando a uma degeneração mais precoce com um menor número de aplicações do que os evidenciados na literatura com drogas simples.

A betametasona é um corticoesteróide muito potente do ponto de vista anti-inflamatório, com um efeito proporcional maior do que diversos outros corticoesteróides (GOODMAN & GILMAN, 1996). Como não se tinha um 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 causaria redução nos proteoglicanos da matriz resultando em uma fragilidade estrutural.

O coelho foi o modelo experimental escolhido porque o aparecimento de lesões induzidas pelo corticoesteróide é mais freqüente nesta espécie animal (GIBSON et al., 1976; SALTER; MURRAY, 1969) e a maioria dos trabalhos demonstrando alteração degenerativa na cartilagem devido à ação dos corticoesteróides foi observada nestes animais.

Utilizou-se a composição de fosfato dissódico de betametasona 2mg, que devido a sua solubilidade tem rápido início de ação e o dipropionato de betametasona 5mg que possui menor solubilidade e portanto permanece por mais tempo no interior da articulação.

Para o cálculo da dosagem adotou-se como parâmetro miligramas por quilograma visto que a proporcionalidade por superfície corporal utilizada para alguns medicamentos gera uma dose elevada (KLAASSEN, 1996). Procurou-se avaliar a concentração de corticoesteróide por mililitro evitando desta forma a possibilidade de ação tóxica direta por hiperconcentração do fármaco, que poderia ocasionar morte celular. Doses elevadas por si só tem um potencial lesivo para as células como demonstrado no trabalho experimental em cultura de tecidos realizado por FUBINI (2001). A dose aplicada continha 0,25mg como dipropionato de betametasona e 0,1mg como fosfato de betametasona ou 0,63 μ M de dipropionato de betametasona e 0,25 μ M de fosfato dissódico de betametasona.

Na articulação os efeitos da redução de proteoglicanos são determinantes no aparecimento das lesões induzidas pelo corticoesteróide. A resultante fragilidade estrutural leva a uma 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 foi observada uma redução *in vivo* devido à duração dos experimentos (MANKIN; CONGER, 1966(a); UITTO; MUSTAKALIO, 1971; BEHRENS; SHEPARD; MITCHEL, 1975). Devido a importância destes elementos para a integridade da cartilagem optou-se pela avaliação da quantidade de proteoglicanos após oito dias da aplicação intra-articular de corticoesteróide, baseando-se em sua meia vida.

O corante “safranina O” foi escolhido para avaliar a quantidade de proteoglicanos com base no estudo de ROSENBERG (1971) que demonstrou a ligação estequiométrica deste corante 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 notadas na intensidade de coloração são decorrentes da redução de proteoglicanos mais especificamente de sulfato de queratina e sulfato de condroitina. 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 oito dias após à última infiltração.

A utilização de um corticoesteróide de maior permanência no interior da articulação ocasiona um 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 a dose é de difícil determinação devido à lenta absorção. Com duas infiltrações o principal efeito da permanência teria desaparecido na quinta semana e se este número de infiltrações ocasionasse alterações seriam notadas no grupo quatro, pois os animais já mostrariam sinais de lesões decorrentes do emprego das duas aplicações e que, mesmo sendo submetidos ao acréscimo de mais duas infiltrações, ainda não apresentavam alterações por este método de avaliação. Observou-se redução da intensidade de coloração com safranina O na matriz cartilaginosa de coelhos infiltrados seis e oito vezes com intervalos semanais. 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 um maior acúmulo de pequenas rugosidades localizadas no platô medial próximo à inserção ligamentar.

Não foram observadas alterações teciduais na microscopia óptica utilizando a coloração com hematoxilina e eosina nos diferentes grupos infiltrados com corticoesteróide.

Um efeito condroprotetor com baixas dosagens de corticoesteróide foi evidenciado em diferentes modelos experimentais. Em coelhos submetidos à menissectomia parcial lateral e trans-seção dos ligamentos sesamóide e colateral fibular, utilizando hidrocortisona (BUTLER et al. 1983). O efeito condroprotetor observado por diferentes pesquisadores ocorreu com uma dosagem de corticoesteróide que corresponde à metade da utilizada neste estudo. Para esta afirmação levou-se em conta a potência anti-inflamatória da betametasona que é cinco vezes mais potente que a triamcinolona e seis vezes mais potente do que a hidrocortisona (GOODMAN & GILMAN, 1996). O intervalo de tempo entre as aplicações foi de quatro semanas nos estudos realizados por BUTLER et al. (1983) e PELLETIER et al. (1994, 1995). Os trabalhos experimentais realizados por BEHRENS, SHEPARD e MITCHEL (1975) utilizaram doses elevadas de corticoesteróides. PAPACHRISTOU, ANAGNOSTOU e KATSORHIS (1997) observaram até mesmo o desaparecimento da membrana citoplasmática em 15%

dos espécimes após a aplicação de altas dosagens de betametasona nos dois joelhos com intervalos semanais.

O repouso relativo era postulado por HOLLANDER, JESSAR e BROWN JR. (1961) com base em suas observações clínicas em humanos. GOGIA, BROWN e AL-OBAIDI (1993) observaram degradação mais intensa no tecido cartilaginoso de ratos que faziam exercícios e que tiveram seus joelhos infiltrados com corticoesteróide. Há poucos estudos demonstrando os efeitos da associação exercícios e corticoesteróides intra-articulares, não se encontrou nenhum realizado em coelhos. Neste estudo, embora os coelhos pudessem se movimentar nas gaiolas não realizaram exercícios.

A avaliação da intensidade de coloração realizada com auxílio de um aparelho de histomorfometria permitiu uma mensuração objetiva com dados mensuráveis, eliminando possíveis discordâncias subjetivas entre observadores.

No preparo das lâminas não se adicionou a safranina O, previamente à descalcificação, o que poderia evitar a perda de 10% de proteoglicanos durante o processo (KIRALY, 1996). Entretanto como o método utilizado foi comparativo e não quantitativo e a cartilagem foi tratada do mesmo modo para os grupos infiltrados, não influenciou no resultado final. Para uma avaliação quantitativa do tecido seria interessante a utilização deste princípio.

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 observamos lesão celular embora o intervalo de aplicações de corticoesteróide na articulação fosse pequeno para o tipo da substância empregada concordando com as observações de BARKER e MARTINEK (1976).

Fica claro pelo presente estudo que uma infiltração com corticoesteróide na articulação não acarreta lesões celulares e ou na matriz. A dosagem de corticoesteróide que leva aos efeitos condroprotetores pode ser menor do que a 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.

Novos estudos levando em conta a potência do corticoesteróide bem como intervalo de tempo satisfatório para a recuperação do tecido cartilaginoso devem ser realizados.

6 CONCLUSÃO

A análise dos efeitos da composição sulfato de betametasona e dipropionato de betametasona na cartilagem hialina normal de coelhos, adotando-se uma dosagem proporcional à utilizada na prática clínica, não demonstrou redução na quantidade de proteoglicanos da matriz cartilaginosa nos grupos que receberam até quatro aplicações intra-articulares com intervalo semanal. A redução destes elementos constituintes da matriz se tornou evidente após seis e oito aplicações, demonstrando o efeito cumulativo do medicamento pois o intervalo semanal não é suficiente para o desaparecimento da droga do interior da articulação e recuperação metabólica do tecido. A avaliação da intensidade de coloração do tecido cartilaginoso com o corante “safranina O” utilizando-se o aparelho de histomorfometria propiciou uma análise estatística com dados objetivos facilitando a interpretação, superando a escala visual que depende essencialmente do observador.

REFERÊNCIAS

ARCE, R. D.; FLECHTMANN, C. H. W. **Introdução à anatomia e fisiologia animal**. 2.ed. São Paulo : Nobel, 1989. p.46.

ATTUR, M. G. et al. Osteoarthritis or osteoarthrosis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine. **Osteoarthritis Cartilage**, Philadelphia, v. 10, n. 1, p. 1-4, 2002.

BARKER, W. D.; MARTINEK, J. An ultrastructural evaluation of the effect of hydrocortisone on rabbit cartilage. **Clin Orthop**, n. 115, p. 286-290, 1976.

BEHRENS, F.; SHEPARD, N.; MITCHELL, N. Alteration of rabbit articular cartilage by intra-articular injection of glucocorticoids. **J Bone Joint Surg Am**, v. 57, n. 1, p. 70-76, 1975.

BEHRENS, F.; SHEPARD, N.; MITCHELL, N. Metabolic recovery of articular cartilage after intra-articular injections of glucocorticoid. **J Bone Joint Surg Am**, v. 58, n. 8, p. 1157-1160, 1976.

BRAY, R. C.; FRANK, C. B.; MINIACI, A. The structure and function of diarthrodial joints. In: McGINTY, J. B. ed. **Operative arthroscopy**. 2.ed. Philadelphia: Lippincot-Raven, 1996. Cap. 10, p.105-143.

BUCKWALTER, J. A.; MANKIN, H. J. Instructional Course Lectures, The American Academy of Orthopaedic Surgeons. Articular cartilage, part I: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. **J Bone Joint Surg Am**, v.79, p.600-611, 1997(a).

BUCKWALTER, J. A.; MANKIN, H. J. Instructional Course Lectures, The American Academy of Orthopaedic Surgeons. Articular cartilage, part II: degeneration and osteoarthrosis , repair, regeneration, and transplantation. **J Bone Joint Surg Am**, v.79, p.612-632, 1997(b).

BUTLER, M. et al. A new model of osteoarthritis in rabbits. III. Evaluation of anti-osteoarthritis effects of selected drugs administered intraarticularly. **Arthritis Rheum**, Atlanta, v. 26, n. 11, p. 1380-1386, 1983.

CALDWELL, J. R. Intra-articular corticosteroids: guide to selection and indications for use. **Drugs**, Sydney, v. 52, n. 4, p. 507-514, 1996.

CHAMBERS, M. G. et al. Expression of collagen and aggrecan genes in normal and osteoarthritic murine knee joints. **Osteoarthritis Cartilage**, Philadelphia, v. 10, n. 1, p. 51-61, 2002.

CHANDLER, G. N. et al. Charcot's arthropathy following intra-articular hydrocortisone. **Br Med J**, v. 1, p. 952-953, 1959.

FUBINI, S. L. et al. Corticosteroids alter the differentiated phenotype of articular chondrocytes. **J Orthop Res**, v.19, p.688-695, 2001.

GIBSON, T. et al. Effect of intra-articular corticosteroid injections on primate cartilage. **Ann Rheum Dis**, v. 36, n. 1, p.74-79, 1976.

GOGIA, P. P.; BROWN, M.; AL-OBAIDI, S. Hydrocortisone and exercise effects on articular cartilage in rats. **Arch Phys Med Rehabil**, Philadelphia, v. 74, n. 5, p. 463-467, 1993.

GOODMAN & GILMAN as bases farmacológicas da terapêutica. 9.ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 1996.

HAINQUE, B. et al. Effects of dexamethasone on the growth of cultured rabbit articular chondrocytes: relation with the nuclear glucocorticoid-receptor complex. **Ann Rheum Dis**, v. 46, n. 2, p. 146-152, 1987.

HIGUCHI, M. et al. Ultrastructure of the articular cartilage after systemic administration of hydrocortisone in the rabbit: an electron microscopic study. **Clin Orthop**, n. 152, p. 296-302, 1980.

HOLLANDER, J. L. et al. Hydrocortisone and cortisone injected into arthritic joints. **JAMA**, v.147, n 17, p.1629-1635, 1951.

HOLLANDER, J. L.; JESSAR, R. A.; BROWN JR., E. M. Intra synovial corticosteroid therapy: a decade of use. **Bull Rheum Dis**, v. 11, p. 239-240, 1961.

HORISAWA, E. et al. Prolonged anti-inflammatory action of DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres containing betamethasone sodium phosphate for an intra-articular delivery system in antigen-induced arthritic rabbit. **Pharm Res**, v. 19, n. 4, p. 403-410, 2002.

ISHIKAWA, K.; OHIRA, T.; SAKATA, H. Effects of intraarticular injection of halopredone diacetate on the articular cartilage of rabbit knees: a comparison with methylprednisolone acetate. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 75, n. 3, p. 423-436, 1984.

ITANI, T. et al. Quantitative analysis of rough endoplasmic reticulum in chondrocytes of articular and tracheal cartilage of rabbits following the systemic administration of hydrocortisone. **J Anat**, London, v. 181, n. pt 2, p. 357-363, 1992.

KELMAN, G. J. et al. Steroid-related osteonecrosis of the knee: two cases reports and a literature review. **Clin. Orthop**, n. 257, p. 171-176, 1990.

KIRALY, K. Safranin O reduces loss of glycosaminoglycans from bovine articular cartilage during histological specimen preparation. **Histochem J**, v. 28, n. 2, p. 99-107, 1996.

KLAASSEN, C. D. (Ed.) **Casarett and Doull's toxicology**: the basic science of poisons. New York: McGraw Hill. 1996. p.23-25.

MACLEOD, J. N. et al. Effect of synovitis and corticosteroids on transcription of cartilage matrix proteins. **Am J Vet Res**, v.59, n.8, p.1021-1026, 1998.

MANKIN, H. J.; CONGER, K. A. The acute effects of intra-articular hydrocortisone on articular cartilage in rabbits. **J Bone Joint Surg Am**, v. 48, n. 7, p. 1383-1388, 1966 (a).

MANKIN, H. J.; CONGER, K. A. The effect of cortisol on articular cartilage of rabbits. 1. Effect of a single dose of cortisol on glycine-C¹⁴ incorporation. **Lab Invest**, Baltimore, v. 15, p. 794-800, 1966 (b).

McCARTY, D. J.; HOGAN, J. M. Inflammatory reaction after intrasynovial injections of microcrystalline adrenocorticosteroid esters. **Arthritis Rheum**, Atlanta, v. 7, p. 359-367, 1964.

NETER, J. **Applied linear statistical models**. 4.ed. Chicago : Irwin, 1996. p.111

PAPACHRISTOU, G.; ANAGNOSTOU, S.; KATSORHIS, T. The effect of intraarticular hydrocortisone injection on the articular cartilage of rabbits. **Acta Orthop Scand Suppl**, Oslo, v. 275, p. 132-134, 1997.

PARIKH, J. R. et al. Charcot's arthropathy of the shoulder following intraarticular corticosteroid injections. **J Rheumatol**, Toronto, v. 20, n. 5, p. 885-887, 1993.

PELLETIER, J. P. et al. Intraarticular injection with methylprednisolone acetate reduces osteoarthritis lesions at the same time as chondrocyte stromelysin synthesis in experimental osteoarthritis. **Arthritis Rheum**, Atlanta, v. 34, p. 414-423, 1994.

PELLETIER, J. P. et al. The *in vivo* effects of intraarticular corticosteroid injections on cartilage lesions, stromelysin, interleukin-1, and oncogene protein synthesis in experimental osteoarthritis. **Lab Invest**, Baltimore, v. 72, n. 5, p. 578-586, 1995.

PELLETIER, J. P.; MARTEL-PELLETIER, J.; MALEMUD, C. J. Canine osteoarthritis: effects of endogenous neutral metalloproteases on articular cartilage proteoglycans. **J Orthop Res**, v. 6, p. 379-388, 1988.

PELLETIER, J. P.; MARTEL-PELLETIER, J. Protective effect of steroids on cartilage lesions and osteophyte formation in the Pond-Nuki dog model of osteoarthritis. **Arthritis Rheum.**, Atlanta, v. 32, p. 181-193, 1989.

ROSENBERG, L. Chemical basis for the histological use of safranin O in the study of articular cartilage. **J. Bone Joint Surg Am**, v. 53, n. 1, p. 69-82, 1971.

SAKINIENE, E.; BREMELL, T.; TARKOWSKI, A. Addition of corticosteroids to antibiotic treatment ameliorates the course of experimental *Staphylococcus Aureus* arthritis. **Arthritis Rheum**, Atlanta, v. 39, n. 9, p. 1596-1605, 1996.

SALTER, R. B.; MURRAY, D. Effects of hydrocortisone on musculo-skeletal tissues. **J Bone Joint Surg Br**, v. 51, n. 1, p. 195, 1969.

SHAW, N. E.; LACEY, E. The influence of corticosteroids on normal and papain-treated articular cartilage in the rabbit. **J Bone Joint Surg Br**, Atlanta, v.55, n.1, p.197-205, 1973.

STRICKER, S.J. et al. Chondroprotective effect of bethamethasone in lapine pyogenic arthritis. **J Pediatr Orthop**, Philadelphia, v. 16, p. 231-236, 1996.

TRIOLA, M. F. **Introdução à estatística**. 9.ed. Rio de Janeiro : LTC, 2005. p.287-289, 291-297

UITTO, J.; MUSTAKALLIO, K. K. Effect of hydrocortisone acetate, fluocinolone acetonide, fluclorolone acetonide, bethametasone-17-valerate and fluprednylidene-21-acetate on collagen biosynthesis. **Biochem Pharmacol**, v. 20, p. 2495-2503, 1971.

VERSCHURE, P. J. et al. Stimulation of proteoglycan synthesis by triamcinolone acetonide and insulin-like growth factor 1 in normal and arthritic murine articular cartilage. **J Rheumatol**, v. 21, n. 5, p. 920-926, 1994.

WYSENBECK, A. J. Experimental septic arthritis in rabbits treated by a combination of antibiotic and steroid drugs. **Clin Exp. Rheumatol.**, v. 14, n. 5, p. 507-512, 1996.

ZACHARIAE, L. Deleterious effects of corticosteroids administered topically, in particular intra-articular. **Acta Orthop Scand**, Oslo, v. 36, p. 127-136, 1965.