

*JANAINA BOSSO JOSÉ DA SILVA*

**ESTUDO EXPERIMENTAL DA IONTOFORESE COMO VIA  
DE ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS NO QUADRO  
AGUDO DE HEMARTROSE E NO MODELO DE  
ARTROPATIA CRÔNICA HEMOFÍLICA**

*CAMPINAS*

*2006*



**JANAINA BOSSO JOSÉ DA SILVA**

**ESTUDO EXPERIMENTAL DA IONTOFORESE COMO VIA  
DE ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS NO QUADRO  
AGUDO DE HEMARTROSE E NO MODELO DE  
ARTROPATIA CRÔNICA HEMOFÍLICA**

*Dissertação de Mestrado apresentada a Pós-Graduação  
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre  
em Clínica Médica, área de Concentração em  
Hematologia.*

**ORIENTADORA:** *Dra. Margareth Castro Ozelo*

**CO-ORIENTADORA:** *Profa Dra. Joyce Maria Annichino Bizzacchi*

**CAMPINAS**

**2006**

***DEDICATÓRIA***

Aos meus pais Luiz e Rosa,  
Pelo constante encorajamento, exemplo de conduta e de vida.

“Tudo o que faço há muito mais de vocês do que um dia eu poderia supor”.



## *AGRADECIMENTOS*

---

À Margareth pelo dinamismo e visão de pesquisa, pelo exemplo, compreensão, e incentivo em todos os momentos.

À Joyce pela confiança e oportunidade.

À Marcia pelo apoio, incentivo e ajuda diária, desde o início.

À Andréa pela espontaneidade.

À Rosalva pela sutileza das palavras.

A todos do laboratório de Hemostasia: Deva, Ucha, Andrey, Cristina, Silmara, Rafael, Ricardo e Tânia; pela ajuda em todos os momentos.

Ao Erich pela coerência e assistência constante.

Ao Aranha pela franqueza, clareza das idéias e sugestões.

Ao Rodrigo do laboratório de Espectrometria de Massas, pela paciência e empenho na realização das análises.

Ao Willian e Ana do laboratório do Núcleo de Medicina Cirúrgica e Experimental, pela imprescindível colaboração durante a realização dos experimentos com os porcos.

Ao Francisco pela paciência e compreensão.

Aos meus irmãos, Matheus e Junior, por sonharem junto comigo.

A todos os amigos do Hemocentro pelo acolhimento.



Este estudo foi financiado com recursos fornecidos pela FAPESP – Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (02/12658-6R)



	<i>Pág.</i>
<b>SUMÁRIO</b> .....	xxxv
<b>ABSTRACT</b> .....	xxxix
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	43
<b>1.1- Artropatia hemofílica</b> .....	46
1.1.1-Articulação sinovial.....	47
1.1.2-Fisiopatologia da artropatia hemofílica.....	49
<b>1.2- Tratamento dos episódios hemorrágicos</b> .....	54
<b>1.3- O tratamento da sinovite crônica e da artropatia hemofílica</b> .....	55
<b>1.4- Iontoforese</b> .....	58
<b>1.5- Utilização da iontoforese como terapia complementar nas hemartroses e na sinovite crônica</b> .....	61
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	63
<b>3- MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	67
<b>3.1- Avaliação do transporte transdérmico via iontoforese</b> .....	69
3.1.1- Aplicação iontoforética de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em articulação do joelho de voluntários sadios.....	69
3.1.2- Aplicação da iontoforese em articulação do joelho de voluntários sadios, após a administração endovenosa de Tc99m Sestamibi.....	70



<b>3.2- Métodos para análise dos fármacos: ácido <math>\epsilon</math>-aminocapróico (EACA), ácido hialurônico (HÁ) e oxitetraciclina (OTC).....</b>	<b>70</b>
3.2.1- Avaliação da iontoforese no modelo animal <i>in vivo</i> .....	71
3.2.2- Espectrometria de massas em fluidos biológicos.....	72
<b>3.3- Avaliação da ação do EACA, ácido hialurônico e da oxitetraciclina na artropatia hemofílica em modelo animal (camundongos portadores de hemofilia A).....</b>	<b>74</b>
3.3.1- Genotipagem dos camundongos <i>Knockout</i> deficientes do fator VIII (hemofílicos A).....	75
3.3.1.1- Genotipagem para alelos do gene do FVIII.....	75
3.3.2- Indução de hemartrose nos camundongos hemofílicos.....	76
3.3.2.1- Dispositivo para indução de hemartrose pelo sistema de molas.....	77
3.3.2.2- Dispositivo para indução de hemartrose pelo sistema de pesos.....	79
3.3.3- Adequação do equipamento de iontoforese para tratamento iontoforético em camundongos.....	79
3.3.4- Esquema para avaliação da aplicação iontoforética de fármacos após indução de hemartrose em modelo experimental murino.....	81
3.3.5- Análise histológica da articulação do tronozelo nos camundongos hemofílicos após indução iontoforética.....	84
3.3.6- Métodos estatísticos.....	86
<b>4- RESULTADOS.....</b>	<b>87</b>



<b>4.1- Avaliação do transporte transdérmico via iontoforese.....</b>	<b>89</b>
<b>4.2- Determinação das concentrações no líquido sinovial e soro dos fármacos administrados por via iontoforética em articulação do modelo experimental suíno.....</b>	<b>90</b>
4.2.1- Caracterização e padronização do método de quantificação das drogas.....	91
4.2.1.1- Ácido $\epsilon$ -aminocaprício (EACA).....	92
4.2.1.1.1- Caracterização do ácido $\epsilon$ -aminocaprício (EACA) pela técnica de ESI-MS.....	92
4.2.1.1.2- Determinação da polaridade do ácido $\epsilon$ -aminocaprício (EACA).....	94
4.2.1.1.3. Análise quantitativa do ácido $\epsilon$ -aminocaprício (EACA).....	94
4.2.1.2- Cloridrato de oxitetracilina .....	96
4.2.1.2.1- Caracterização do Cloridrato de oxitetracilina pela técnica de ESI-MS.....	96
4.2.1.2.2- Determinação da polaridade do cloridrato de oxitetracilina.....	97
4.2.1.2.3- Análise quantitativa do cloridrato de oxitetracilina.....	97
4.2.1.3- Ácido hialurônico.....	99
4.2.1.3.1- Caracterização do ácido hialurônico pela técnica de ESI-MS.....	99
4.2.1.3.2- Determinação da polaridade do ácido hialurônico.....	100



4.2.1.3.3- Análise semi quantitativa do ácido hialurônico.....	101
<b>4.3- Resultados da avaliação da administração dos fármacos por via iontoforética após indução de hemartrose na articulação do tornozelo em camundongos hemofílicos.....</b>	<b>101</b>
4.3.1- Indução de hemartrose nos camundongos hemofílicos.....	102
4.3.1.1- Dispositivo para induçãp de hemartrose pelo sistema de molas.....	102
4.3.2- Dispositivo para indução de hemartrose pelo sistema de pesos.....	104
4.3.3- Parâmetros da iontoforese para tratamento iontoforético em camundongos.....	107
<b>4.4- Resultados da análise histológica da articulação do tornozelo nos camundongos hemofílicos.....</b>	<b>109</b>
<b>5- DISCUSSÃO.....</b>	<b>119</b>
<b>6 -CONCLUSÕES.....</b>	<b>135</b>
<b>7- BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>139</b>
<b>8- ANEXOS.....</b>	<b>149</b>
<b>Anexo 1-</b> Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP.....	151
<b>Anexo 2-</b> Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP.....	152
<b>Anexo 3-</b> Trabalho: “Transdermal Iontophoretic Drug Delivery as an Alternative Choice in Hemophilia Synovitis Treatment.” .....	153



## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>A</b>	amper
<b>AMCA</b>	ácido tranexânico
<b>AU 198</b>	ouro 198
<b>CP</b>	concentrados protrombínicos
<b>CEEA</b>	Comissão de ética na experimentação animal
<b>CEMIB</b>	Centro multidisciplinar para investigação biológica
<b>CIvD</b>	coagulação intravascular disseminada
<b>cm</b>	centímetro
<b>cm<sup>2</sup></b>	centímetro quadrado
<b>CPPa</b>	concentrados protrombínicos parcialmente ativados
<b>DP</b>	desvio padrão
<b>DNA</b>	“ <i>desoxyribonucleic acid</i> ”, ácido desoxirribonucleico
<b>EACA</b>	ácido aminocapróico
<b>E</b>	equivalente-grama em quilogramas (Kg) ( $M / n = E$ )
<b>E.A.T.D.D</b>	“ <i>electrically-assisted transdermal drug delivery</i> ”
<b>EDTA</b>	sal dissódico do ácido etilenodinitritetracético
<b>ESI</b>	“ <i>electrospray ionization</i> ”, ionização por eletrospray
<b>ESI-MS</b>	“ <i>electrospray ionization mass spectrometry</i> ”
<b>F</b>	Força
<b>F VIII</b>	fator VIII



<b>F IX</b>	fator IX
<b>g</b>	grama
<b>g</b>	gravidade
<b>h</b>	altura
<b>HA</b>	ácido hialurônico
<b>i</b>	corrente aplicada (A)
<b>IU/ml</b>	unidades internacionais por mili litros
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	interleucina 1 $\beta$
<b>IL-10</b>	interleucina 10
<b>IL-1ra</b>	receptor antagonista da interleucina 1
<b>K</b>	constante = $1 / 9,6 \times 10^4$ (C <sup>-1</sup> )
<b>k</b>	constante de proporcionalidade = $K_1 \times K_2$ (C <sup>-1</sup> )
<b>kg</b>	kilograma
<b>M</b>	massa molar
<b>m</b>	massa em quilogramas (Kg)
<b>mm</b>	milímetro
<b>mm<sup>2</sup></b>	milímetro quadrado
<b>mA</b>	mili amperes
<b>ml</b>	mili litro
<b>mg</b>	mili grama
<b>m/z</b>	massa molecular/carga
<b><math>\mu</math>l</b>	micro litro



<b>MALDI</b>	“ <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i> ”
<b>MS</b>	“ <i>mass spectrometry</i> “, espectrometria de massa
<b>n</b>	valência do elemento
<b>ng</b>	nano grama
<b>OTC</b>	cloridrato de oxitetraciclina
<b>pb</b>	pares de base
<b>PCR</b>	“polymerase chain reaction”, reação em cadeia da polimerase
<b>P 32</b>	fósforo 32
<b>pixel<sup>2</sup></b>	pixel quadrado
<b>Q</b>	carga elétrica em Coulomb (C)
<b>Q-TOF</b>	Q-TOF mass spectrometer
<b>RNA</b>	ácido ribonucleico
<b>R186</b>	renio 186
<b>RBC</b>	“ <i>red blood cell</i> “
<b>t</b>	tempo de aplicação (s)
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral $\alpha$
<b>Tc99m</b>	99m tecnécio Sestamibi
<b>Sestamibi</b>	
<b><sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub></b>	pertecnato de tecnécio
<b><math>\mu</math>g</b>	micro grama
<b>Y 90</b>	ítrio 90



	<i>Pág.</i>
<b>Tabela 1-</b> Escala de Petterson e cols para a classificação da artropatia hemofílica baseada nos achados radiológicos.....	53
<b>Tabela 2-</b> Correlação clínico-radiográfica segundo Pettersson e cols.....	54
<b>Tabela 3-</b> Classificação da artropatia hemofílica e indicação de sinoviórtese, segundo Fernandez-Palazzi.....	56
<b>Tabela 4-</b> Comparação dos resultados do EACA obtido no soro e no líquido sinovial.....	95
<b>Tabela 5-</b> Comparação dos resultados do cloridrato de oxitetraciclina obtido no soro e no líquido sinovial.....	98
<b>Tabela 6-</b> Demonstrativo dos grupos de animais para otimização do trauma.....	103
<b>Tabela 7-</b> Demonstrativo de dados do dispositivo de pesos.....	104
<b>Tabela 8-</b> Padronização do protocolo iontoforético.....	108
<b>Tabela 9-</b> Grupo A: camundongos tratados com ácido aminocapróico.....	112
<b>Tabela 10-</b> Grupo B: camundongos tratados com cloridrato de oxitetraciclina.....	114
<b>Tabela 11-</b> Grupo B: camundongos tratados com ácido hialurônico.....	116



	<i>Pág.</i>
<b>Gráfico 1-</b> Caracterização do ácido aminocapróico (EACA) por espectrometria de massa.....	93
<b>Gráfico 2-</b> Caracterização do ácido hialurônico (HA) por espectrometria de massa.....	96
<b>Gráfico 3-</b> Caracterização do cloridrato de oxitetraciclina (OTC) por espectrometria de massa.....	99
<b>Gráfico 4-</b> Análise das medidas e desvio padrão correspondentes às áreas de lesão proliferativas entre os animais tratados e não tratados com EACA.....	113
<b>Gráfico 5-</b> Análise das medidas e desvio padrão correspondentes às áreas de lesão proliferativas entre os animais tratados e não tratados com cloridrato de oxitetraciclina.....	115
<b>Gráfico 6-</b> Análise das medidas e desvio padrão correspondentes às áreas de lesão proliferativas entre os animais tratados e não tratados com ácido hialurônico.....	117



	<i>Pág.</i>
<b>Figura 1-</b> Esquema do ciclo vicioso hemartrose-sinovite-hemartrose.....	47
<b>Figura 2-</b> Componentes das articulações sinoviais.....	48
<b>Figura 3-</b> Representação esquemática dos mecanismos que levam ao dano articular induzido pelo sangue.....	50
<b>Figura 4-</b> Representação esquemática de possível intervenção no mecanismo e dano articular induzido pelo sangue.....	51
<b>Figura 5-</b> Representação esquemática do fluxo iônico na iontoforese.....	59
<b>Figura 6-</b> Movimento de íons durante a iontoforese.....	60
<b>Figura 7-</b> Demonstração da aplicação iontoforética em suínos.....	72
<b>Figura 8-</b> Ionização por eletrospray.....	73
<b>Figura 9-</b> Representação da genotipagem dos animais hemofílicos A.....	76
<b>Figura 10-</b> Sedação inalatória.....	77
<b>Figura 11-</b> Dispositivo para indução de hemartrose através de um sistema de mola.....	78
<b>Figura 12-</b> Paquímetro utilizado para avaliação articular do tornozelo do camundongo.....	78
<b>Figura 13-</b> Dispositivo para indução de hemartrose através de um sistema de pesos.....	79



<b>Figura 14-</b>	<b>A:</b> Região do tornozelo tricotomizada para aplicação iontoforética <b>B:</b> Posicionamento do animal durante aplicação iontoforética.....	80
<b>Figura 15-</b>	Adequação dos equipamentos utilizados na realização da iontoforese no camundongo.....	80
<b>Figura 16-</b>	Membro inferior e pelve: vista lateral.....	105
<b>Figura 17-</b>	Pé: vista superior.....	106
<b>Figura 18-</b>	<b>A e B:</b> Demonstração do posicionamento do animal para indução da hemartrose no tornozelo utilizando o dispositivo por sistema de pesos.....	106
<b>Figura 19-</b>	Articulação do tornozelo do camundongo após 10 dias da primeira indução de hemartrose por trauma.....	109
<b>Figura 20-</b>	Articulação do tornozelo do camundongo após 10 dias da primeira indução de hemartrose por trauma.....	110
<b>Figura 21-</b>	Lâminas do animal 4 do grupo submetido à iontoforese com ácido aminocapróico na articulação do tornozelo (aumento: 16x).....	112
<b>Figura 22-</b>	Lâminas do animal 5 do grupo submetido à iontoforese com cloridrato de oxitetraciclina (aumento: aumento 16x ).....	114
<b>Figura 23-</b>	Lâminas do animal 5 do grupo submetido à iontoforese com ácido hialurônico (aumento: aumento 16x ).....	116





## *RESUMO*



A iontoforese é uma técnica de transferência de drogas mediadas por um fluxo elétrico. Os benefícios terapêuticos da introdução de medicamentos pela iontoforese incluem a diminuição de efeitos colaterais sistêmicos aos quais o paciente apresenta intolerância e a ação localizada do medicamento podendo este estar em maior concentração na área alvo, onde sua ação é mais efetiva e prolongada. No caso da hemofilia, efeito adicional é observado, pois o paciente é poupado de um procedimento invasivo, como punção venosa ou aplicação intra-articular, que depende da reposição dos concentrados de fator. O emprego da iontoforese corrobora a idéia de intervenção direta nos quadros agudos de hemartrose e na sinovite crônica, de maneira não invasiva.

Primeiramente, elaboramos um protocolo em conjunto com o Departamento de Medicina Nuclear do Hospital das Clínicas da Unicamp com o objetivo de comprovarmos, através de experimentos cintilográficos em humanos o transporte transdérmico dinâmico pela iontoforese.

Uma vez comprovado o mecanismo iontoforético, avaliamos através de modelo experimental suíno o comportamento dos fármacos com potencial uso na hemofilia, seja nos episódios agudos de hemartrose (ácido  $\epsilon$ -aminocapróico - EACA) ou tratamento da sinovite crônica (ácido hialurônico e cloridrato de oxitetraciclina). O uso de fármacos com poder hemostático durante os episódios agudos de hemartrose, além do tratamento da sinovite crônica, permitem a longo e curto prazo uma recuperação mais rápida da articulação, além de otimizar o consumo final de hemoderivados ou qualquer outra forma de reposição de fator.

Neste protocolo suíno foi possível confirmar que o ácido  $\epsilon$ -aminocapróico e o cloridrato de oxitetraciclina são drogas que efetivamente poderiam ser utilizadas em protocolos iontoforéticos. A determinação da concentração do ácido hialurônico neste experimento foi prejudicada por se tratar de um complexo polissacarídeo. Assim, acreditamos que estudos complementares utilizando outras técnicas mais sensíveis de quantificação de fármacos devem ser realizadas com este intuito no futuro.

A avaliação do efeito da aplicação iontoforética do EACA, ácido hialurônico e cloridrato de oxitetraciclina em modelo experimental murino (camundongos portadores de hemofilia A), foi realizada através de avaliação histológica que avaliou a área de lesão proliferativa correspondente à articulação tratada e não tratada.

Embora em nenhum dos grupos estudados os resultados entre os animais tratados e não tratados tenha evidenciado uma diferença estatisticamente significativa, foi possível notar uma tendência de melhora sempre que as medicações foram administradas através da iontoforese.

Desta forma, o princípio da aplicação assim como as questões práticas da terapêutica iontoforética foram reconhecidas como uma possível via de administração em condições clínicas apresentadas pelos pacientes hemofílicos. Novos estudos precisam ser realizados a fim de que sejam observados o comportamento farmacológico e as doses terapêuticas ideais das drogas utilizadas para o uso através de iontoforese.



***ABSTRACT***



Iontophoresis is technique of transferring drugs by an electric flow. The therapeutic benefits of introducing drugs by iontophoresis include lowering of systematic side effects and the local action of medication with a larger concentration into the damage area, where its action is more effective and prolonged. Besides that, the hemophilic patients are avoided to get venous puncture or an injection into their joint. The use of iontophoresis takes the idea of direct intervention in acute hemarthroses and chronic synovitis in one non aggressive way.

First of all we created a protocol in association with Nuclear Medicine Department of the Clinical Hospital of UNICAMP and we standardize cintilographic experiments in humans to evaluate the transdermal dynamics delivered by iontophoresis, confirming iontophoretics mechanism.

Once it proved the iontophoretic mechanism, we evaluate in a swine experimental model the behavior of drugs with potential use in hemophilia ( $\epsilon$ -aminocaproic acid during the acute episodes of hemarthroses; hyaluronic acid and oxitetracycline clorhydrate to treat chronic cases) by electrospray ionization mass spectrometry.

The use of haemostatic drugs during the acute treatment of hemarthroses, besides the treatment of chronic synovitis, allows in long and short period of time, once recover faster of the joints also reduce the final consumption of replacement products.

In swine protocol, we observed that  $\epsilon$ -aminocaproic acid and oxitetracycline clorhydrate are drugs which may actually cause and be used in iontophoretics's protocols. However new complementary studies are necessary to make possible the use of hyaluronic acid, once it's a large polissacaride. We believe that others studies using different methods more sensitive of drug quantifications should be used with this purpose of accomplishment in the future.

The evaluation of the iontoforetic application's effect of these drugs in murino's experimental models (knockout mice with hemophilia A) was performed by the histologic analysis, showing that in both groups (EACA and OTC) iontophoretic treatment resulted in a lower average of damage when comparing the treated limb and the one not treated.

Although in none of the groups studied the results among animals treated and non-treated has shown a meaningful statistic difference, was possible to notice one improvement trend always when medications were delivered by iontophoresis.

Thus the application's principle as other practical questions from therapeutic, were recognized as a possible option of treatment of the clinical conditions in hemophilic patients. New researches are necessary to observe drugs behavior and the ideal therapeutic doses in iontophoresis.



## ***1- INTRODUÇÃO***



A hemofilia é um distúrbio hemorrágico hereditário, decorrente da deficiência ou anormalidade da atividade coagulante do fator VIII (hemofilia A) ou do fator IX (hemofilia B). Os genes que codificam a produção dos fatores VIII e IX estão localizados no cromossomo X. Assim manifesta-se quase exclusivamente em homens, enquanto que as mulheres portadoras são habitualmente assintomáticas (Lorenzi, 1999).

A hemofilia é presente em indivíduos de diversos grupos étnicos, com prevalência de 1:10.000 e 1:30.000 nascimentos de homens para a hemofilia A e B, respectivamente. No Brasil, de acordo com o Registro de Coagulopatias Hereditárias do Ministério da Saúde (<http://portal.saude.gov.br/saude>) o número de hemofílicos atualmente registrados são de 6937 pacientes cadastrados com hemofilia A e 1316 pacientes com hemofilia B.

A apresentação clínica é semelhante para a hemofilia A ou B, sendo caracterizada por sangramentos intra-articulares (hemartroses), hemorragias musculares ou em outros tecidos ou cavidades. Observa-se uma correlação entre a atividade residual dos fatores VIII ou IX com a frequência e tipo de sangramento. Assim pacientes com níveis de fator menor que 0.01 IU/ml (< 1% do normal) são classificados como graves, e freqüentemente apresentam sangramentos espontâneos. Quando a atividade residual está entre 0.01 – 0.05 IU/ml (1% a 5% do normal); os pacientes são classificados como moderados e apenas esporadicamente apresentam sangramentos espontâneos. Com níveis 0.05 a 0.40 IU/ml (5% a 40% do normal) não se observam sangramentos espontâneos e são classificados como leve (White *et al.*, 2002).

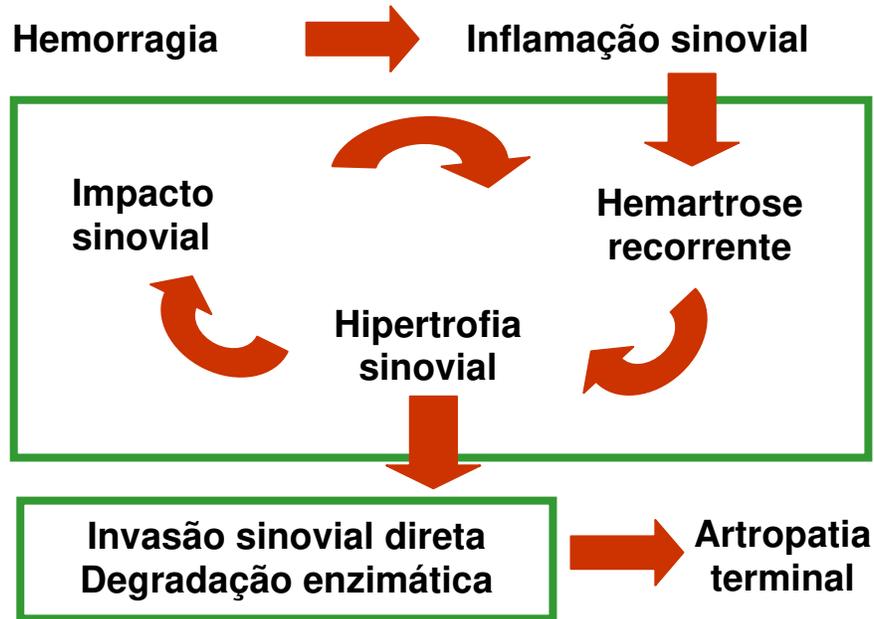
Mais de 90% dos episódios de sangramento em hemofílicos ocorrem no sistema músculo-esquelético sendo que 80% destes são em articulações. Os hematomas intramusculares são, portanto, menos comuns que as hemartroses. Apesar de serem freqüentemente reabsorvidos, eventualmente podem provocar síndrome compartimental, tornarem-se infectados ou até transformarem-se em pseudotumor (Caviglia, 2006; Rodriguez Merchan, 2002).

## 1.1- Artropatia hemofílica

A hemartrose é a manifestação mais comum e dolorosa com implicações econômicas, físicas e psicológicas que caracterizam o quadro debilitante da hemofilia. Sucessivas hemartroses resultam em uma patologia inflamatória e proliferativa denominada sinovite hemofílica. Com o tempo instala-se uma progressiva e incapacitante debilidade em função da progressão da destruição articular o que chamamos de artropatia hemofílica crônica. Esta por sua vez, é a causa mais importante de morbidade em pacientes hemofílicos adultos jovens (Bithell, 1998). As articulações mais acometidas são respectivamente: joelhos, cotovelos, tornozelos, quadris, ombros e punhos (Roberts e Hoffman, 1995).

A sinovite hemofílica pode ser classificada em aguda e crônica. A sinovite aguda é reconhecida pela presença de hiperplasia e infiltração celular perivascular. A fibrose não está presente neste estágio. A forma crônica é definida pela sinovite que persiste por mais de seis meses. Por sua vez a sinovite crônica pode ser dividida em duas formas: ativa e inativa. Na forma ativa, observa-se hiperplasia das vilosidades da membrana sinovial além de algumas áreas fibróticas. Já na forma inativa, as mudanças fibróticas são vistas em primeiro plano (Eickhoff *et al.*, 1998).

Apesar da seqüência de eventos clínicos do ciclo: hemartrose ↔ sinovite crônica ↔ hemartrose serem bem documentados (figura 1), os componentes no sangue e as mudanças moleculares responsáveis pela sinovite crônica hemofílica ainda não foram totalmente elucidados (Hakobyan *et al.*, 2005).

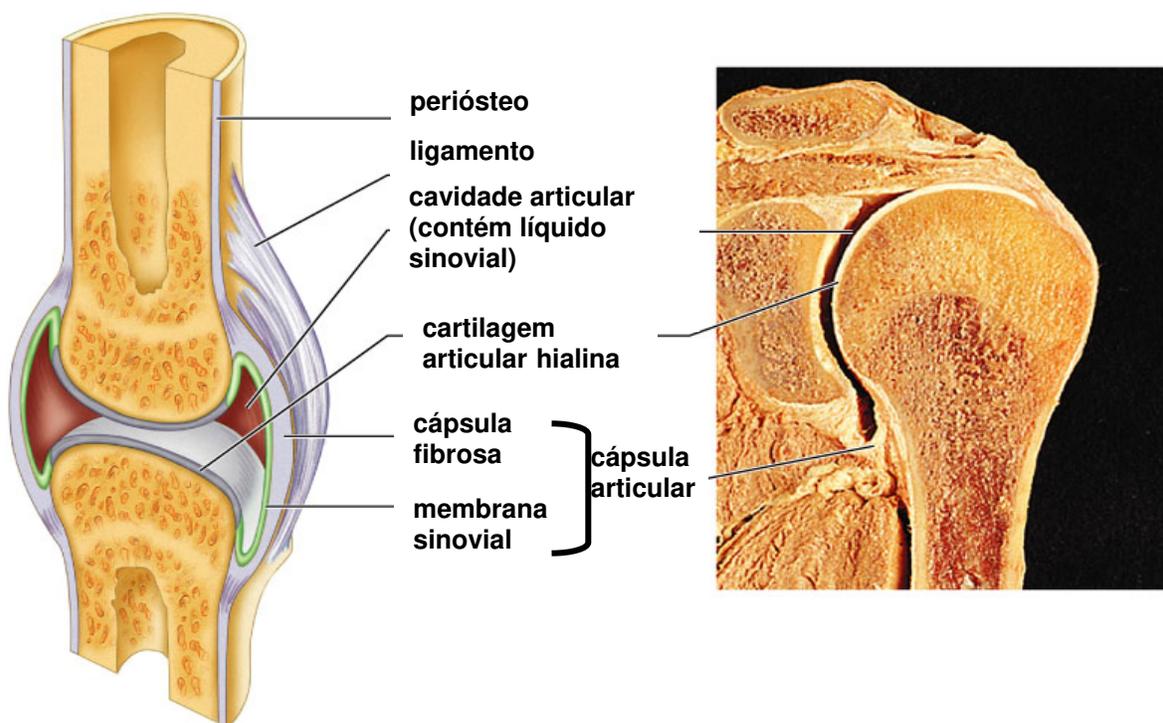


**Figura 1-** Esquema do ciclo vicioso hemartrose-sinovite-hemartrose (Adaptado de Silva *et al.*, 2004).

### 1.1.1- Articulação sinovial

As articulações sinoviais são aquelas, onde os ossos são articulados em uma cavidade preenchida por líquido sinovial. As diartroses são articulações dotadas de grande mobilidade, geralmente unindo ossos longos. Nas diartroses existe uma cápsula que liga as extremidades ósseas, delimitando uma cavidade fechada, a cavidade articular. Esta cavidade contém um líquido incolor, transparente e viscoso; o líquido sinovial. O líquido sinovial é um dialisado do plasma sanguíneo contendo elevado teor de ácido hialurônico, sintetizado pelas células da camada sinovial. O deslizamento das superfícies articulares que são revestidas por cartilagem hialina, é facilitado pelo efeito lubrificante do ácido hialurônico (Junqueira e Carneiro, 2004).

Os principais componentes da articulação sinovial são: a) cápsula articular: composta por uma porção externa ou cápsula fibrosa, revestida internamente pela membrana sinovial; b) cartilagem articular hialina: que reveste os ossos; c) cavidade articular: preenchida por líquido sinovial; d) ligamentos: que reforçam a articulação, permitindo sua sustentação durante os movimentos (figura 2).



**Figura 2-** Componentes das articulações sinoviais.

A membrana sinovial é um componente essencial das articulações sinoviais e reveste a superfície interna da cápsula articular, recobrindo todas as estruturas intra-articulares, exceto a cartilagem articular. Esta membrana é dividida em duas partes: uma camada de revestimento adjacente ao espaço articular, chamada camada de revestimento ou camada íntima e a camada de suporte ou tecido subsinovial (ROSENDAAL *et al.*, 1998). As principais células da camada de revestimento sinovial ou camada íntima são do tipo A, tipo B e tipo AB, de morfologia intermediária. Todas produzem dentre outros, o ácido hialurônico, um dos principais componentes do líquido sinovial. A camada de revestimento sinovial é composta normalmente por duas a três camadas de células e suportadas por tecido fibrogorduroso (Roosendaal *et al.*, 1998).

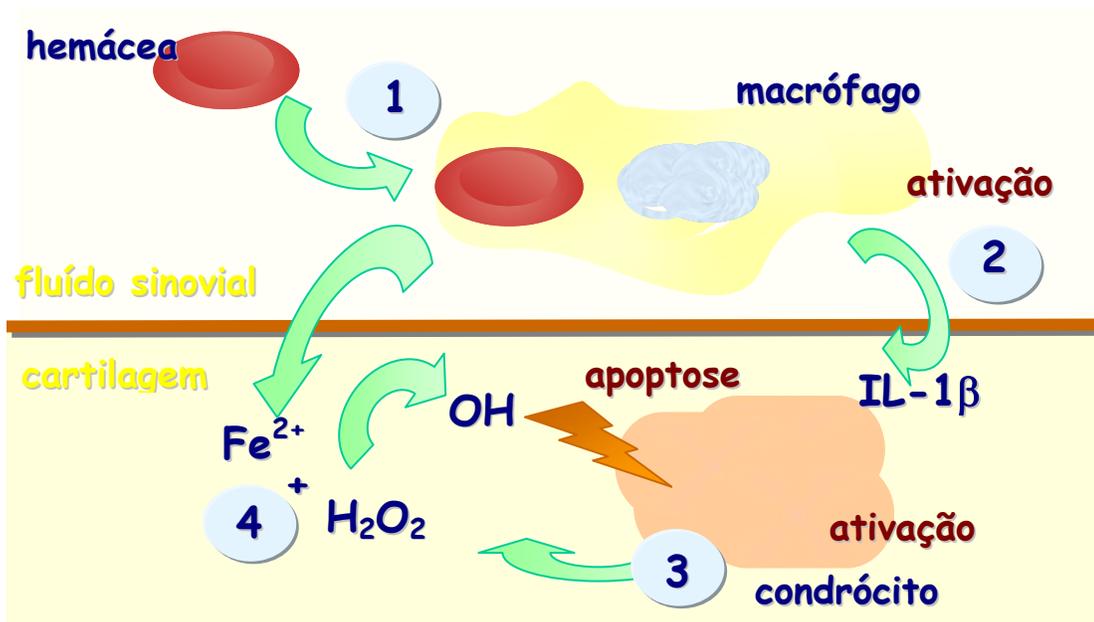
A membrana sinovial desempenha importante função na manutenção do balanço entre o processo fisiológico e as mudanças patológicas que ocorrem na articulação durante sangramentos recorrentes. É responsável pela lubrificação e nutrição dos tecidos articulares, além de regular o volume do fluido sinovial e a composição de suas macromoléculas (Roosendaal *et al.*, 1998).

A cartilagem articular é um dos componentes da articulação que está diretamente envolvida aos efeitos deletérios do sangue dentro do processo de dano articular. A cartilagem é formada principalmente por fibras de colágeno e moléculas grandes (agregantes proteoglicanos) além de um número relativamente pequeno de condrócitos. A cartilagem contribui com as extraordinárias propriedades da articulação, permitindo a distribuição de altas cargas compressivas e a estabilização do movimento da articulação com baixo nível de fricção. Não existem dados indicativos que a cartilagem de pacientes com hemofilia (prévio ao dano articular) seja diferente de pessoas saudáveis (Roosendaal, 1998).

#### 1.1.2- Fisiopatologia da artropatia hemofílica

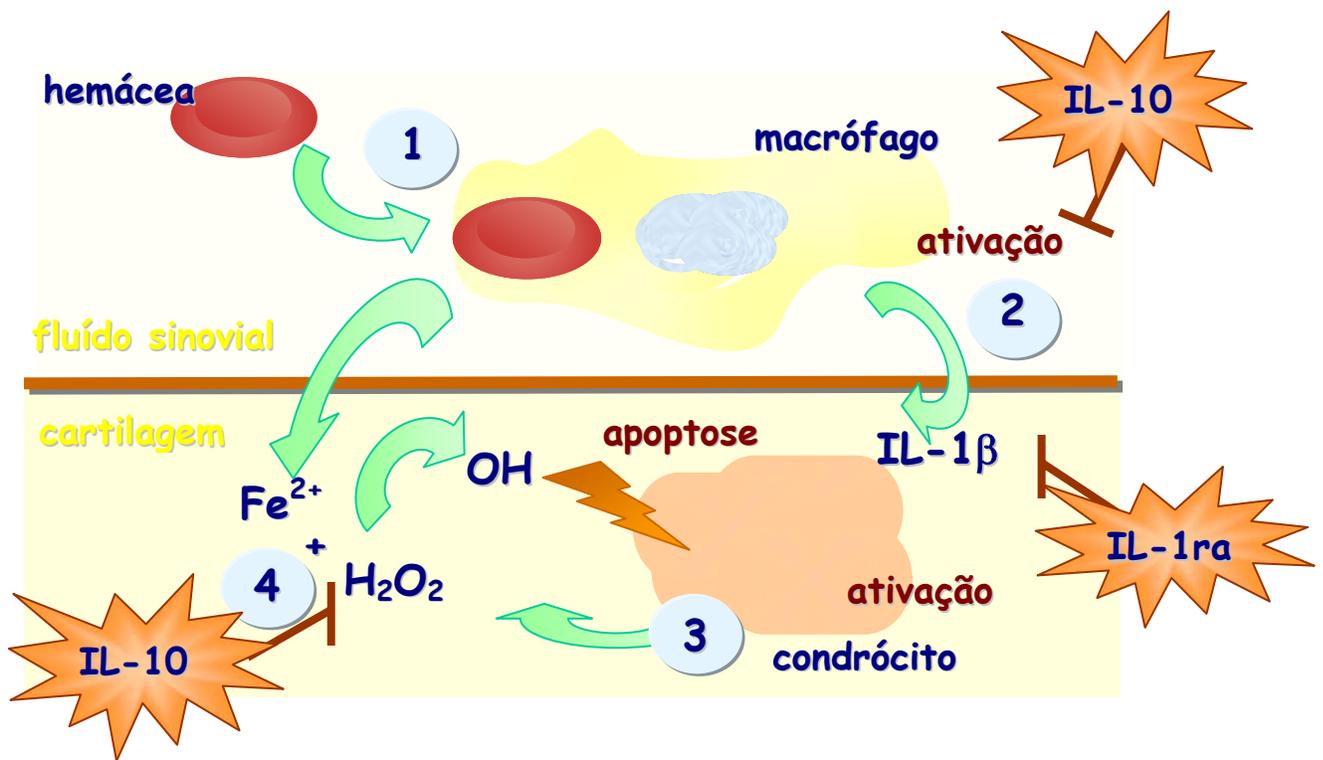
Durante o quadro agudo de hemartrose, os neutrófilos presentes na cavidade articular liberam enzimas proteolíticas e simultaneamente os macrófagos fagocitam o ferro da hemoglobina, levando à produção de substâncias oxidativas tóxicas. Após os episódios hemorrágicos, há deposição de hemosiderina nas camadas superficiais e profundas da membrana sinovial com proliferação de células fibroblásticas e neoformação vascular (Hakobyan *et al.*, 2004). Em resposta a esses fatores, a membrana sinovial se prolifera (**hiperplasia**), torna-se mais espessa (**hipertrofia**) e há a formação de vilosidades que se projetam no espaço articular. Essas vilosidades são friáveis e rompem-se facilmente ao menor traumatismo, o que por sua vez, ocasiona novo ciclo de hemorragia. Alterações sinoviais e destruição da cartilagem articular são os eventos mais proeminentes da **artropatia hemofílica** (Arnold e Hilgartner, 1977).

A degradação da matriz cartilaginosa é um processo complexo e vários mediadores (enzimas, citocinas e metabólitos oxidativos) são produzidos pelos condrócitos em resposta direta ao sangue na articulação (figura 3).



**Figura 3- Representação esquemática dos mecanismos que levam ao dano articular induzido pelo sangue.** (1) Após o sangramento intra-articular, ocorre uma interação entre os monócitos e as células vermelhas sanguíneas (hemáceas). (2) Os macrófagos localizados no espaço sinovial tornam-se ativados e secretam IL-1β (interleucina 1β) e outras citocinas pró-inflamatórias, como o TNFα (fator de necrose tumoral α). (3) A IL-1β estimula os condrócitos a produzirem hidrogenoperóxide (4), a qual é derivada da redução do ferro da hemoglobina, vinda das hemáceas processadas por macrófagos ou liberadas como resultado do dano da própria hemácea. O resultado é a formação de radicais hidroxil nas áreas vizinhas aos condrócitos, levando ao aumento da atividade oxidativa, resultando em **apoptose condrocitária**. Este processo leva a diminuição da atividade reparadora da cartilagem. Quando existem mudanças adversas na matriz cartilaginosa, pode ocorrer degeneração da cartilagem por reparação insuficiente. Em conseqüência, mas secundariamente a estas mudanças, haverá o desenvolvimento de inflamação sinovial, contribuindo para a artropatia (Adaptado de Hooiveld, 2003).

A experiência clínica no tratamento das hemartroses com a reposição do concentrado de fator resulta em uma diminuição da prevalência da artropatia crônica (Dimichele e Neufeld, 1998). Todavia, isto não é capaz de conter a progressão do dano cartilaginoso. Hooiveld (2003), propõe uma intervenção adicional na prevenção da artropatia crônica hemofílica através da ação da interleucina 10 (IL-10). Através de estudos experimentais o autor relata que a IL-10 tem demonstrado desempenhar propriedades antiinflamatórias podendo controlar o quadro de sinovite, além de prevenir a produção de citocinas pró-inflamatórias dos monócitos/macrófagos (figura 4).



**Figura 4- Representação esquemática de possível intervenção no mecanismo de dano articular induzido pelo sangue.** Interleucina-10 (IL-10 ) inibe a ativação dos macrófagos e a produção de interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Por outro lado, IL-10 também pode proteger diretamente os condrócitos pela prevenção do aumento da produção de hidrogenioperoxidase. O receptor antagonista da interleucina-1 (IL-1ra), pode neutralizar diretamente o efeito estimulatório da IL-1 $\beta$  nos condrócitos, deste modo prevenindo o aumento da produção de hidrogenioperoxidase (Adaptado de Hooiveld, 2003).

A ação de substâncias tóxicas sobre a cartilagem articular determina a formação de lesões inflamatórias com erosão progressiva do tecido cartilaginoso e do tecido ósseo subcondral. A consequência é a progressiva diminuição do espaço articular e dos movimentos articulares.

Assim que a hemartrose ocorre, a articulação adquire posição antálgica e instala-se uma contratura muscular. Se esse episódio não for corretamente tratado, a contratura torna-se fixa e outros fatores são observados. Esta posição anormal leva à alterações mecânicas, sangramentos recorrentes e progressiva destruição da articulação (Fernández-Palazzi *et al.*, 2002), freqüentemente necessitando de substituição articular em idade relativamente jovem (Roosendaal *et al.*, 1999).

Devido ao comprometimento das articulações na artropatia hemofílica, com restrição dos movimentos dos membros acometidos, os músculos proximais atrofiam-se, facilitando traumatismos mecânicos que causam novas hemorragias. A inflamação crônica da membrana sinovial pode levar à fibrose e, eventualmente, ao completo desaparecimento das células sinoviais produtoras do líquido lubrificante. No estágio final de evolução, pode ocorrer a fusão da articulação (Roosendaal, 2006).

Os achados radiológicos mais característicos da artropatia hemofílica crônica são: cistos subcondrais, osteoporose, epífises alargadas, superfície subcondral irregular, diminuição do espaço articular, erosões na margem articular, total incongruência óssea, levando à deformidade articular. Também pode ocorrer fibrose ou anquilose óssea (Rodríguez-Merchan, 2000). O conjunto destas alterações levou Pettersson e cols estabelecerem em 1980, uma classificação puramente radiológica sobre a evolução da artropatia hemofílica (tabela 1). Na **Escala de Pettersson e cols**, a pontuação final oscila entre zero (0), ausência de artropatia, e 13 pontos, em casos de pacientes mais afetados. Posteriormente, publicaram outra classificação que correlaciona as manifestações clínicas com as alterações radiológicas (tabela 2) (Pettersson *et al.*, 1980).

**Tabela 1- Escala de Pettersson e cols.** para a classificação da artropatia hemofílica baseada nos achados radiológicos.

Varição Radiológica	Achado Radiológico	Pontos
Osteoporose	Ausente	0
	Presente	1
Alargamento da epífise	Ausente	0
	Presente	1
Irregularidade da superfície subcondral	Ausente	0
	Leve	1
	Pronunciada	2
Estreitamento do espaço articular	Ausente	0
	< 50%	1
	> 50%	2
Formação de cistos subcondrais	Ausente	0
	1 cisto	1
	> 1 cisto	2
Erosões na margem articular	Ausente	0
	Presente	1
Incongruência entre superfícies articulares	Ausente	0
	Leve	1
	Pronunciada	2
Deformidade (angulação e/ou deslocamento das articulações ósseas)	Ausente	0
	Leve	1
	Pronunciada	2

Pontos possíveis: 0-13 pontos.

**Tabela 2-** Correlação clínico-radiográfica segundo Pettersson e cols.

Pontuação articular	História de hemorragias	Redução da função articular
0	Presente em alguns casos	Nenhuma
2	Presente quase sempre	Ausente ou moderada
3-4	Sempre presente	Sempre presente
>4	Sempre presente	Correlação entre aumento da pontuação e diminuição da função.

### 1.2- Tratamento dos episódios hemorrágicos na hemofilia

O principal tratamento utilizado na hemofilia é a terapia de reposição, isto é, a administração intravenosa do fator requerido sob demanda (após episódio hemorrágico) ou profilaticamente. O objetivo da terapia de reposição é obter uma concentração do fator necessário, no sítio de sangramento, tal que a coagulação possa tornar-se hemostaticamente efetiva. No entanto a terapia de reposição, principalmente quando baseada no uso de produtos seguros contra as infecções transfusionais (concentrados derivados de plasma humano tratados por processos de inativação viral e concentrados de fator recombinantes) é um tratamento de alto custo e ainda escassos na maioria dos países, sobretudo países em desenvolvimento.

Uma importante complicação decorrente do tratamento de reposição na hemofilia é a formação de anticorpos neutralizadores da função coagulante do fator VIII ou IX, em hemofílicos A ou B, respectivamente. Clinicamente a presença desses anticorpos denominados inibidores, dificulta a indução da hemostasia terapêutica com concentrados de fatores de coagulação. Em alguns casos, somente uso de altas doses do concentrado de fator pode ser suficiente, mas na maioria das vezes é necessário o uso de produtos que têm a capacidade de gerar trombina independente da via do fator VIII ou IX (produtos *bypass*); recentemente tem sido utilizado o fator VII ativado. A prevalência de inibidores varia de 1% a 5% entre pacientes com hemofilia B e 15% a 20% entre os hemofílicos A (Brettler e Levine, 2001).

Como forma de terapêutica auxiliar, dispomos dos inibidores da fibrinólise, tais como o ácido épsilon-aminocapróico (EACA) e o ácido tranexânico (AMCA); que podem diminuir o sangramento em pacientes com distúrbios da coagulação (Bithell, 1998). Estes agentes antifibrinolíticos têm se mostrado úteis em várias condições clínicas, sobretudo para o controle do sangramento durante extrações dentárias ou outros sangramentos de mucosas em portadores de distúrbios hemorrágicos (Villar *et al.*, 2002 e Mannucci, 1998).

De acordo com Sherry e Marder (1996), existem três situações clínicas diferentes onde a terapia antifibrinolítica pode ser racionalmente aplicada: a) tratamento de estados de hiperfibrinólise sistêmica; b) terapêutica auxiliar em pacientes que têm uma potencial diminuição na formação de coágulos hemostáticos, como é o caso da hemofilia; c) em sangramentos localizados, como nas erosões gástricas, mesmo quando o paciente não apresenta alterações da coagulação nem aumento da fibrinólise sistêmica.

### **1.3- O tratamento da sinovite crônica e da artropatia hemofílica**

Desde a década de 60, quando a terapia de reposição tornou-se uma realidade, tem sido enfatizada a importância da fisioterapia na prevenção e tratamento das seqüelas de recorrentes hemartroses.

Para o tratamento da sinovite crônica algumas medidas já foram bem estabelecidas, como a sinoviórtese química e radioativa (Silva *et al.*, 2004; Heim, 2002; Rodriguez-Merchan e Wiedel, 2001; Fernandez-Palazzi e Caviglia, 2001; Gilbert e Cornwall, 2001). A sinoviórtese é um procedimento invasivo que utiliza injeções intra-articulares com fármacos (química) ou radio-fármacos (radioativa) cujo objetivo é “estabilizar” (órtese) a membrana sinovial, através da fibrose da membrana e plexo sinovial, pela ação fibrótica dos fármacos empregados. Na sinoviórtese química, as drogas mais utilizadas são: ácido ósmico (Ayrál, 2001), rifampicina (Caviglia *et al.*, 2001) e metilprednisolona (Fernandez-Palazzi, 2002; Ayrál, 2001), na sinoviórtese radioativa são: ouro - au 198 (Pettersson, 2001), fósforo - p 32 (Silva *et al.*, 2001) ítrio - yttrium 90 (Rodriguez-Merchan *et al.*, 2001) e rhenium - r 186 (Heim, 2002).

A sinoviórtese é uma opção de tratamento que retarda o desenvolvimento da artropatia hemofílica e está indicada em quadros de sinovite crônica associada à hemartroses recorrentes. Todavia é um método invasivo e requer na maioria das vezes, várias punções, necessitando da reposição de fator em média de duas a três doses por procedimento, além de ser um procedimento doloroso, dependendo do fármaco utilizado.

Vários centros utilizam diferentes classificações para a indicação da sinoviórtese. Fernandez-Palazzi (1998), classifica a artropatia hemofílica em quatro estágios dependentes da severidade clínica (tabela 3).

**Tabela 3-** Classificação da artropatia hemofílica e indicação de sinoviórtese, segundo Fernandez-Palazzi (1998).

Grau de acometimento	Alterações articulares	Recomendação para sinoviórtese
<u>Grau I</u> : sinovite transitória sem seqüela pós sangramento	articulação volta ao estágio pré sangramento após a hemartrose ter cessado	indicada se houver > 3 hemartroses em 6 meses
<u>Grau II</u> : sinovite permanente	há alargamento articular, espessamento sinovial e limitação de movimento.	indicada
<u>Grau III</u> : artropatia crônica	além dos sinais do grau II existem deformidades axiais e atrofia muscular.	pode ser um recurso
<u>Grau IV</u> : artropatia severa	Fibrose ou anquilose óssea	não é recomendada

Embora os melhores resultados relacionados à sinoviórtese no tratamento da sinovite crônica para pacientes com hemofilia tenham sido obtidos com uso de radiofármacos, este procedimento apresenta alguns inconvenientes, como a dificuldade e os cuidados relacionados à manipulação dos produtos radioativos, seu alto custo e baixa disponibilidade em diversos locais, além dos riscos potenciais da utilização destes produtos, sobretudo na faixa etária pediátrica, onde se encontram a maioria dos pacientes que podem se beneficiar com este procedimento. Assim, embora este procedimento tenha consideráveis benefícios, diversas questões de segurança e factibilidade ainda são considerados.

Neste contexto acreditamos que a sinoviórtese química pode ser ainda uma boa alternativa no controle da sinovite crônica em pacientes hemofílicos, sobretudo se for possível o controle dos principais inconvenientes relacionados a sua baixa efetividade, como a necessidade de múltiplas punções dolorosas.

Para a sinoviórtese química, é essencial considerar a ação de cada fármaco utilizado, de acordo com o tipo de lesão articular presente. Assim a utilização de corticoesteróides apresenta resultados mais satisfatórios em quadros inflamatórios agudos, levando na maioria das vezes apenas a benefícios passageiros e com efeitos deletérios na cartilagem articular (Shupak *et al.*, 1998; Rodriguez-Merchan *et al.*, 1994).

Na década de 80, baseado em experiência anterior realizada em pacientes com artrite reumatóide, uma nova alternativa foi introduzida para uso em artropatia hemofílica, a sinoviórtese com rifampicina (Caviglia *et al.*, 2001). A rifampicina é um antibiótico que apresenta efeito antimetabólico, impedindo a síntese de RNA e DNA polimerase em células imunocompetentes. Nas articulações, sua ação proteolítica e antifibrinolítica favorece a fibrose e esclerose da membrana sinovial, diminuindo assim os episódios de sangramento local e interrompendo o ciclo: hemartrose ↔ sinovite crônica ↔ hemartrose (Fernandez-Palazzi e Caviglia, 2001). Os resultados obtidos parecem ter sido satisfatórios, sobretudo em articulações menores (cotovelos e tornozelos) e quando o tratamento foi iniciado precocemente, isto é, em articulações com grau I de acometimento (Caviglia *et al.*, 2001). Além disso, alguns grupos observaram uma melhora significativa da dor articular crônica e na amplitude dos movimentos articulares (Radossi *et al.*, 2003). Atualmente a rifampicina não é facilmente encontrada em nosso meio, no entanto outros fármacos, como o cloridrato de oxitetraciclina, que é um antibiótico da família das tetraciclinas, parece ser também uma alternativa no tratamento da sinovite crônica hemofílica.

O cloridrato de oxitetraciclina é um antibiótico, com ação bacteriostática derivado da tetraciclina (obtida a partir da *Streptomyces rimosus*). O cloridrato de oxitetraciclina quando utilizado intra-articular causa um efeito semelhante à rifampicina, com fibrose da membrana sinovial. O efeito *in vivo* do cloridrato de oxitetraciclina foi recentemente observado em estudo experimental com coelhos submetidos à hemartrose

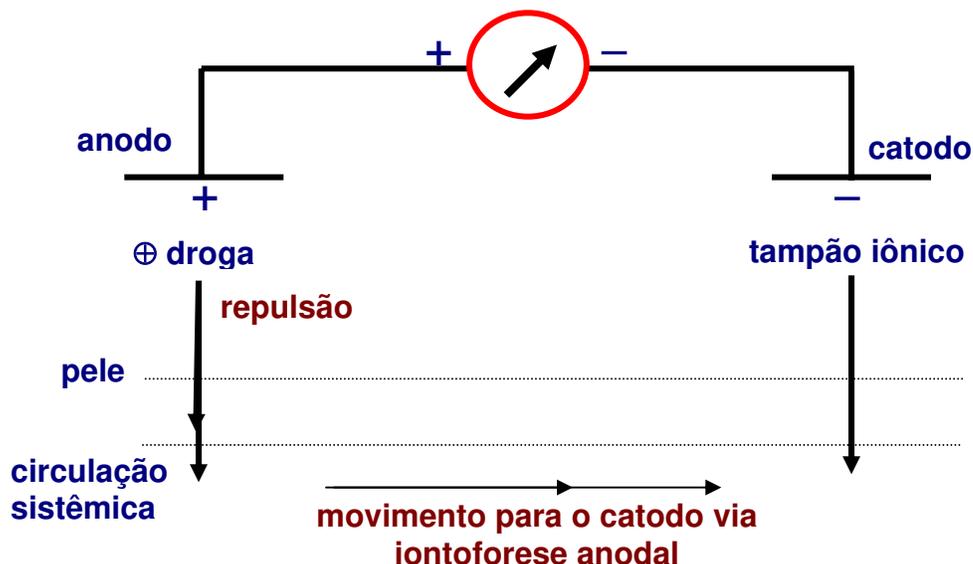
induzida pela injeção de sangue autólogo intra-articular (2vezes/semana por 2 semanas). Após duas semanas, 8 animais passaram a receber injeções intra-articulares de solução salina (grupo A) e 16 animais receberam aplicações intra-articular de 50 mg de cloridrato de oxitetraciclina uma vez por semana por 4 semanas. Ao término, os animais foram sacrificados e foi possível observar que o grupo tratado com oxitetraciclina apresentava histologicamente regeneração do tecido sinovial com menor formação de vasos locais que o grupo tratado com salina, que apresentou tecido reparado de forma distinta que o tecido normal (Rojas *et al.*, 2004). Recentemente alguns grupos da América Latina, liderados por Fernandez-Palazzi da Venezuela, têm descrito sua experiência com uso de cloridrato de oxitetraciclina em substituição à rifampicina (Fernandez-Palazzi *et al.*, 2004).

Como recurso para o tratamento da artropatia hemofílica, encontramos o ácido hialurônico (Fernandez-Palazzi *et al.*, 2002, Rodriguez-Merchan, 2003). Embora amplamente utilizado em indivíduos com osteoartrite desde 1989, também tem mostrado resultados promissores na artropatia hemofílica (Wallny *et al.*, 2000); todavia, os dados publicados são limitados e restritos a pacientes adultos (Athassiou-metaxa *et al.*, 2002). Os primeiros dados do uso do ácido hialurônico no tratamento da artropatia foram registrados em 1994 (Fernandez-Palazzi, 1994). O ácido hialurônico é um polímero natural da família dos glicosaminoglicanos (ácido mucopolissacaride), constituinte importante da matriz extracelular e que está presente em concentrações particularmente elevadas nas cartilagens e no líquido sinovial. O ácido hialurônico demonstra apresentar propriedades analgésicas e antiinflamatórias, além de induzir a normalização da fluidez ou viscoelasticidade do líquido sinovial e ativação da regeneração tecidual na cartilagem comprometida, restabelecendo o equilíbrio funcional da articulação (Wallny *et al.*, 2000).

#### **1.4- Iontoforese**

A iontoforese é uma técnica de administração de fármacos, através do uso de corrente elétrica que permite a introdução a partir da pele e das mucosas, de íons medicamentosos para o interior dos tecidos, utilizando-se para tanto, das propriedades da corrente galvânica (Guirro e Guirro, 1996).

A corrente Galvânica é uma corrente contínua que caracteriza-se por criar um campo eletrostático unidirecional constante entre os eletrodos para permitir transmissão ininterrupta da medicação (figura 5) (Cicccone, 2001).

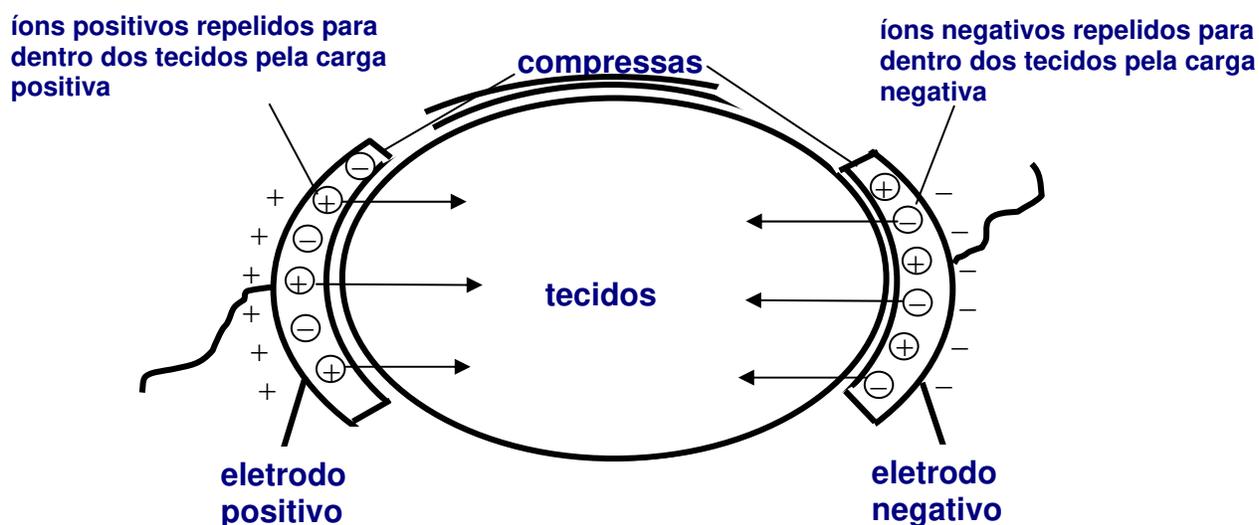


**Figura 5-** Representação esquemática do fluxo iônico na iontoforese.

A primeira proposta para o uso de corrente elétrica com o intuito de transferência de drogas, data a partir de meados do século XVIII. Antes do começo do século XX, a transferência de drogas mediadas por fluxo elétrico era conhecida como “cataforese”, sendo que Frankenhäuser introduziu o termo iontoforese antes de 1908. Uma recente definição diz que a iontoforese ou transferência iônica é a introdução de íons livres aplicados de maneira não invasiva usando uma corrente direta. Um termo recentemente introduzido denomina-se “*electrically-assisted transdermal drug delivery*” – *E.A.T.D.D.* (Helmstädter, 2001).

O princípio da aplicação assim como as questões práticas da terapêutica foram reconhecidos em virtude do célebre experimento realizado por Leduc, que no começo do século XX, conduziu vigorosamente esse tipo de pesquisa antes da classe médica

(Singh, 1993). Seu experimento fundamental consistiu na tentativa de aplicação iontoforética de estricnina em dois coelhos. Em um dos coelhos a droga foi contida no eletrodo negativo e no outro, no eletrodo positivo de um sistema elétrico gerador de corrente contínua. Após um certo tempo de aplicação, o coelho cuja solução de estricnina estava contida no eletrodo positivo sofreu espasmos convulsivantes que o levaram a morte, enquanto que o outro coelho nada sofreu. As alterações ocorridas em apenas um dos coelhos demonstraram que a droga é transportada para o interior dos tecidos de acordo com as suas características polares, responsáveis pela determinação do sentido do fluxo iônico ativado pela corrente contínua. Assim os íons positivos são introduzidos no organismo a partir do ânodo e os íons negativos a partir do cátodo (figura 6) (Guirro e Guirro, 1996).



**Figura 6-** Movimento de íons durante a iontoforese.

Desde o final da década de 30, a administração de diversas substâncias através da iontoforese já foi relatada. Ciccone (2001), cita algumas aplicações clínicas, com medicações primárias administradas atualmente pela iontoforese como: ácido acético para tendinite calcificante e miosite ossificante; cloreto de cálcio e sulfato de magnésio nos espasmos musculoesqueléticos; dexametasona para inflamação; iodo para capsulite adesiva,

outras adesões dos tecidos moles e infecções microbianas; lidocaína para dor e inflamação dos tecidos moles (como bursite e tenossinovite); hialuronidase no tratamento de edema local (estágio sub-agudo e crônico); salicilatos e óxido de zinco para dor muscular e articular em condições agudas e crônicas (como lesões por uso excessivo e artrite reumatóide), além de uso para úlceras de pele e outras doenças dermatológicas.

De acordo com Guirro e Guirro (1996), os benefícios terapêuticos da introdução de medicamentos pela iontoforese são: ausência de efeitos colaterais sistêmicos aos quais o paciente apresenta intolerância; ação localizada do medicamento podendo este estar em maior concentração na área lesada, onde sua ação é mais efetiva e prolongada.

Acredita-se que o amplo uso clínico, combinado com pesquisa adicional, possam permitir que a iontoforese assuma um papel proeminente na prática clínica contemporânea (Ciccione, 2001).

Os princípios básicos de aplicação iontoforética dependem: da eletricidade como veículo de administração da droga; da transferência de íons (que é de acordo com a polaridade da substância); do tipo, amplitude, duração e dosagem da corrente empregada (Hawan Su *et al.*, 1994).

### **1.5- Utilização da iontoforese como terapia complementar nas hemartroses e na sinovite crônica**

As alterações articulares que ocorrem nos pacientes hemofílicos podem ser consideradas de duas maneiras: o sangramento agudo intra-articular (hemartrose) e a sinovite crônica decorrente dos episódios hemorrágicos recorrentes.

Durante o episódio hemorrágico agudo é essencial o tratamento com reposição de fatores da coagulação para controle do sangramento. No entanto outras medidas e medicações coadjuvantes podem auxiliar no controle das hemorragias, no tratamento da sinovite crônica bem como na artropatia.

Os antifibrinolíticos são drogas amplamente utilizadas no controle de hemorragias por sua ação hemostática sistêmica e, sobretudo local.

A administração via iontoforética de antifibrinolíticos e das medicações utilizadas na sinoviórtese química não é descrita na literatura. De fato, embora sabemos da utilização por alguns grupos multiprofissionais da iontoforese como via de administração de fármacos como corticosteróide, drogas anestésicas e vasodilatadoras (histamina), para tratamento das alterações articulares em indivíduos hemofílicos, estes procedimentos ainda são pouco divulgados, sendo escassa a bibliografia deste tema para hemofilia. Assim optamos por desenvolver e padronizar métodos que pudessem viabilizar a aplicação iontoforética de fármacos com potencial benefício ao tratamento das complicações articulares hemofílicas agudas (hemartroses), com o uso de antifibrinolítico (ácido  $\epsilon$ -aminocapróico) e crônicas, utilizando o ácido hialurônico e o cloridrato de oxitetraciclina.



## ***2- OBJETIVOS***



Do exposto anteriormente são objetivos deste estudo:

1. Avaliação do transporte transdérmico via iontoforese, através da análise dinâmica da aplicação iontoforética de radiofármacos em joelho de indivíduos saudáveis.
2. Padronização e análise, através de modelo experimental suíno, da aplicação iontoforética de fármacos com potencial uso durante episódios agudos de hemartrose em pacientes hemofílicos (ácido  $\epsilon$ -aminocapróico) ou para tratamento da sinovite crônica (cloridrato de oxitetraciclina e ácido hialurônico), com posterior análise da presença e concentração destes fármacos no soro e no líquido sinovial pelo método de espectrometria de massa.
3. Avaliação em modelo experimental murino (camundongos *knockout* portadores de hemofilia A) do efeito da aplicação iontoforética dos fármacos: ácido  $\epsilon$ -aminocapróico em hemartrose aguda, ácido hialurônico e cloridrato de oxitetraciclina na sinovite crônica, através da análise histológica das articulações afetadas.





### ***3- MATERIAIS E MÉTODOS***



### 3.1- Avaliação do transporte transdérmico via iontoforese

Com a colaboração dos profissionais do Departamento da Medicina Nuclear do Hospital das Clínicas da Unicamp, desenvolvemos e padronizamos dois experimentos cintilográficos, para a avaliação dinâmica do transporte transdérmico pela iontoforese.

Para a avaliação dinâmica do transporte transdérmico pela iontoforese, foram selecionados para cada experimento 05 voluntários entre alunos e/ou funcionários da UNICAMP que atenderam aos seguintes critérios:

- faixa etária entre 20 e 40 anos (ambos os sexos),
- não estivessem usando qualquer tipo de medicamento nos últimos 10 dias,
- não apresentassem doenças articulares degenerativas, neoplasias, alterações vasculares ou quaisquer outras patologias de base com qualquer comprometimento sistêmico.
- nunca tivessem sido submetidos a intervenções cirúrgicas na região a ser tratada (articulação dos joelhos).

Os voluntários foram submetidos previamente ao procedimento à avaliação física e radiológica, para descartar qualquer comprometimento articular prévio.

#### 3.1.1- Aplicação iontoforética de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em articulação do joelho de voluntários sadios

Para a realização do experimento foi utilizado o radioisótopo pertecnetato de tecnécio ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ), que além de ser considerado livre de efeitos colaterais, possibilita a realização de imagens em câmera de cintilação. O procedimento foi realizado em duas etapas, com a aplicação de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  no eletrodo negativo colocado em contato com a pele na porção lateral do joelho direito do indivíduo. Os voluntários permaneceram em decúbito dorsal, com a articulação do joelho direito em posição neutra. Os eletrodos foram

posicionados medial e lateralmente à articulação do joelho. Na primeira etapa os voluntários foram monitorados simultaneamente com captura de imagens pela câmera de cintilação por cerca de 20 minutos com o aparelho de iontoforese desligado. Na segunda etapa o aparelho de iontoforese foi ligado e os voluntários permaneceram cerca de 20 minutos, com intensidade em rampa ascendente de 1,0 a 8,0 mA. Os indivíduos foram monitorados simultaneamente a realização do procedimento iontoforético, através da captura de imagens pela câmera de cintilação.

### 3.1.2- Aplicação da iontoforese em articulação do joelho de voluntários sadios, após a administração endovenosa de Tc99m Sestamibi.

Este segundo experimento foi realizado para analisar o mecanismo inverso ao da iontoforese. Outros 05 voluntários seguindo os mesmos critérios de inclusão e exclusão foram selecionados.

No experimento elaborado, o voluntário permaneceu em decúbito dorsal, com a articulação do joelho em posição neutra. O mesmo recebeu a substância radioativa por via endovenosa. O Tc99m Sestamibi, é um complexo catiônico que tem a capacidade de acumular-se nos músculos. Os eletrodos foram posicionados medial e lateralmente à articulação do joelho. O voluntário foi monitorado simultaneamente com a captura de imagens pela câmera de cintilação, para que fosse possível avaliar se haveria maior concentração do radioisótopo injetado, na área onde os eletrodos foram posicionados (articulação do joelho), com o aparelho de iontoforese ligado. A aplicação iontoforética durou cerca de 30 minutos, com intensidade em rampa ascendente de 1,0 a 8,0 mA.

### **3.2- Métodos para análise dos fármacos: ácido $\epsilon$ -aminocapróico (EACA), ácido hialurônico (HA) e oxitetraciclina (OTC).**

Com o objetivo de avaliarmos a presença e a concentração no líquido sinovial dos fármacos administrados por via iontoforética, foi desenvolvido um modelo experimental suíno para realização da iontoforese na articulação do tornozelo e posterior análise da presença dos fármacos (em soro e líquido sinovial) por espectrometria de massas.

### 3.2.1- Avaliação da iontoforese no modelo animal suíno *in vivo*.

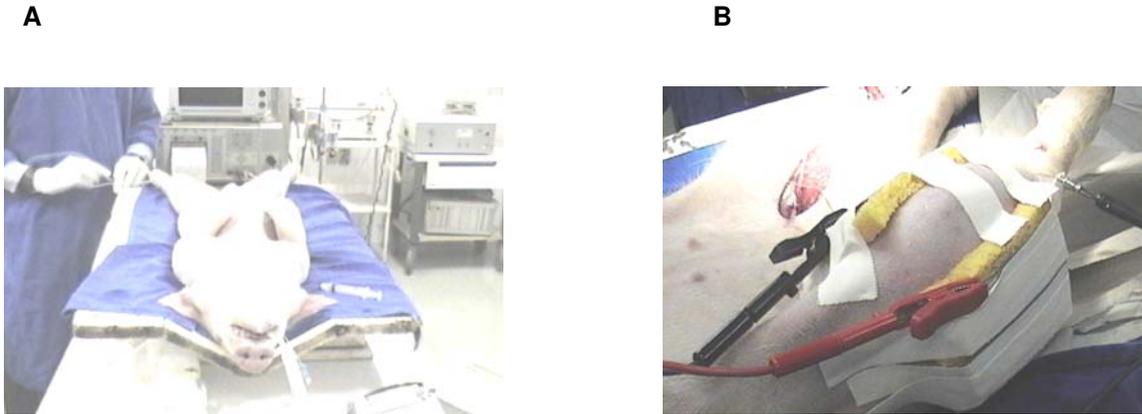
Os experimentos no modelo animal *in vivo* utilizaram a articulação do tornozelo de suínos. Os animais utilizados eram porcos da linhagem Large-White, com procedência de suinocultor em Holambra, SP. Os animais tinham aproximadamente 10 semanas de vida e 40 Kg de peso.

O procedimento foi realizado através do Protocolo de aplicação iontoforética em suínos e está demonstrado na figura 7. Essas medidas foram necessárias para que os sinais vitais do animal pudessem ser acompanhados antes, durante e depois do procedimento. Este protocolo analisou a utilização das drogas: ácido  $\epsilon$ -aminocapróico (EACA), ácido hialurônico (HA) e cloridrato de oxitetraciclina (OTC) através da aplicação iontoforética em suínos para posterior emprego destas drogas em protocolo murino.

#### Protocolo de aplicação iontoforética em suínos:

- Anestesia: o animal recebeu um pré-anestésico (ketamina 250mg) administrado por via intramuscular e posteriormente foi mantido anestesiado por cerca de 2 horas com dose única intra-venosa de tiopental 25mg/kg associado a fentanil 0,25ml/kg.
- Posicionamento do animal em decúbito dorsal.
- Intubação orotraqueal do animal com ventilação mecânica e monitoramento da frequência respiratória (aproximadamente 16 rpm).
- Controle da pressão arterial central: foi realizado incisão de aproximadamente 6 cm na região proximal interna do membro posterior contralateral para acesso da artéria femoral e monitoramento da pressão arterial central.
- Monitoramento cardíaco através de quatro eletrodos colocados em cada membro do animal.

- A região a ser submetida à aplicação foi a articulação do tornozelo. O local foi tricotomizado e higienizado com álcool isopropil. Os eletrodos foram colocados medial e lateralmente à articulação.



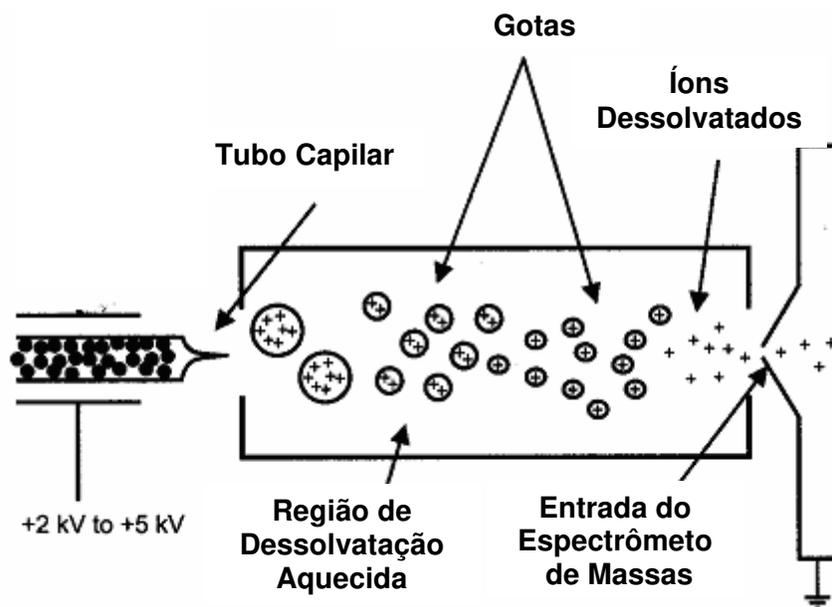
**Figura 7-** Demonstração da aplicação iontoforética em suínos. **A.** Posicionamento do animal em decúbito dorsal após sedação e intubação orotraqueal. **B.** Posicionamento dos eletrodos em membro posterior direito (articulação do joelho D). Uma incisão de aproximadamente 6 cm foi realizada para monitoramento da pressão arterial central, através da artéria femoral contralateral.

### 3.2.2- Espectrometria de massas em fluidos biológicos

Nesta fase contamos com a colaboração do Instituto de Química da UNICAMP, mais especificamente do Laboratório Thompson de Espectrometria de Massas (MS: *mass spectrometry*).

A espectrometria de massa ou MS é uma técnica amplamente divulgada que permite entre outras características, a análise de biomoléculas encontradas em fluidos biológicos. Entre as tecnologias utilizadas para esta finalidade há a técnica de ionização por “*electrospray*” (ESI) e por “*matrix-assisted laser desorption ionization*” (MALDI).

Na ionização por eletrospray no modo positivo, uma solução contendo a substância de interesse é acidificada, formando moléculas protonadas e os seus respectivos contra-ânions. Esta solução é nebulizada através de um tubo capilar onde se aplica uma alta voltagem, como mostra a figura 8.



**Figura 8-** Ionização por eletrospray: solução contendo moléculas protonadas é nebulizada através de um capilar onde é aplicado uma alta voltagem, formando gotículas carregadas. O solvente dessas gotículas carregadas é evaporado formando a molécula protonada na fase gasosa.

Desse modo, os ânions presentes na solução serão neutralizados pelo capilar e as gotas formadas pela nebulização conterão excesso de cargas positivas (moléculas protonadas). O solvente presente nas gotículas é evaporado restando assim a molécula protonada na fase gasosa. Analogamente, pode-se utilizar uma solução básica e um potencial negativo no capilar para se produzir íons negativos. Entre as características da ionização por eletrospray, pode-se citar a baixa energia dos íons formados e a possibilidade da formação de íons multicarregados (multiprotonados) (Eberlin *et al.*, 2002).

Neste estudo, utilizamos a técnica de ESI-MS, particularmente no modo negativo (ESI(-)-MS modo negativo) para caracterização do ácido hialurônico, ESI(+)-MS modo positivo para o ácido  $\epsilon$ -aminocapróico e ESI(+)-MS modo positivo para o cloridrato de oxitetraciclina. Para o desenvolvimento desta técnica foi utilizado o equipamento *Q-TOF mass spectrometer* (Micromass, Manchester, UK).

Para a análise da presença dos fármacos em amostras de soro e líquido sinovial de suínos foi utilizada a técnica de *fingerprinting*, que se caracteriza pela análise direta de inserção de misturas complexas.

### **3.3- Avaliação da ação do ácido $\epsilon$ -aminocapróico, do ácido hialurônico e do cloridrato de oxitetraciclina na artropatia hemofílica em modelo animal (camundongos portadores de hemofilia A)**

Para a avaliação *in vivo* da ação do antifibrinolítico, do ácido hialurônico e do cloridrato de oxitetraciclina foi optado pela realização do modelo experimental, induzindo a ocorrência de hemartroses e conseqüente sinovite crônica em camundongos portadores de hemofilia, conforme anteriormente descrito por Valentino et al., 2004.

Os animais estudados são camundongos *knockout* hemofílicos A (linhagem C57/BL6, deficientes dos fatores VIII da coagulação), que foram doados pela Dra Katherine High, *The Children's Hospital of Philadelphia*. Estes animais foram recebidos e foi iniciada a formação das colônias. Atualmente o CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica), fornece os animais para a realização dos experimentos e mantém as matrizes. Os animais em experimentação são mantidos no biotério do Hemocentro da Unicamp (Certificado de Biosegurança do Hemocentro: CQB 0072/98, com data de publicação em 30 de setembro de 1998), onde permaneceram com dieta *ad libitum*; ração para roedores: purina e água esterilizada até 8 semanas de idade.

### 3.3.1- Genotipagem dos camundongos *knockout* deficientes do fator VIII (hemofílicos A).

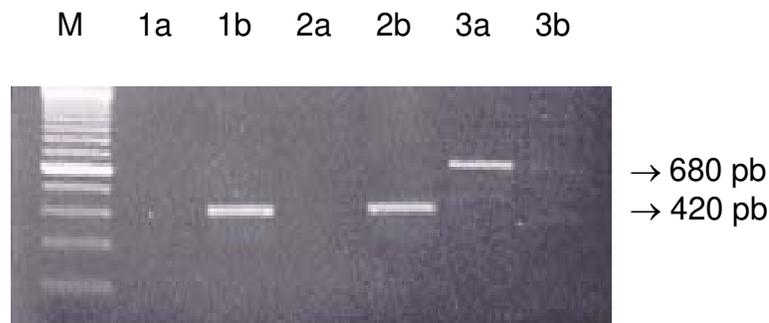
Todos os camundongos deficientes do FVIII (hemofílicos A) utilizados neste estudo foram genotipados para confirmação da utilização de animais onde o fenótipo fosse relacionado à hemofilia. Neste estudo selecionamos apenas animais machos, portanto hemizigotos para o gene deficiente do FVIII.

#### 3.3.1.1- Genotipagem para os alelos do gene do FVIII (Bi *et al*, 1996)

A reação para genotipagem dos animais hemofílicos A foi realizada utilizando para cada reação com volume final de 25µl: 1,0 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dGTP, dTTP, dCTP); tampão da enzima polimerase (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM KCl); MgCl<sub>2</sub>: 0,8µl e 2 U de Taq DNA polimerase. A identificação do gene do FVIII murino normal ou mutante foi realizada a partir de 1,5µl do DNA genômico, utilizando-se os oligonucleotídeos:

- **MC-19:** 5'TgCAAggCCTgggCTTATTT3' extremidade 5' do éxon 16 (sense)
- **NEO:** 5'TgTgTCCCgCCCCTTCCTTT 3' *neo* éxon 17 (sense).
- **MC-18:** 5'gAgCAAATTCCTgTACTgAC 3' éxon 17 (antisense)

Usando a combinação dos produtos destes PCRs (MC-18 e MC-19 e MC-18 e NEO), é feita a distinção entre os genótipos. O fragmento de 680 pb representa o cromossomo X normal, e o fragmento com 420 pb representa a amplificação dos éxons 16 e 17 contendo a *neo* seqüência utilizada nos animais deficientes de FVIII. Os produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) são submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose 1,5% (figura 9).



**Figura 9- Representação da genotipagem dos animais hemofílicos A.** Eletroforese em gel de agarose (1,5%), onde nas linhas 1a, 2a, 3a estão os produtos de PCRs utilizando os oligonucleotídeos referentes ao alelo normal (MC-18 e MC-19). Nas linhas 1b, 2b, 3b, estão os produtos de PCR utilizando oligonucleotídeos da *neo* seqüência (MC-18 e NEO). As reações 1 e 2 são de animais hemofílicos A, que não têm amplificação de fragmento na primeira linha (1a e 2a), apenas o fragmento de 420pb na segunda linha (1b e 2b), relativo ao *neo* gene inserido. A reação 3, é de um animal hemofílico B, utilizado como controle, que só amplifica o fragmento com 680pb (3a), do cromossomo X normal. M: marcador (100pb DNA Ladder, Gibco BRL).

### 3.3.2- Indução de hemartrose nos camundongos hemofílicos

Para a indução de hemartrose nas articulações dos camundongos hemofílicos A machos, foi necessária a elaboração de dispositivos que causassem o sangramento intra-articular de maneira controlada e padronizada nos animais. Assim, era imprescindível que a força do impacto pudesse ser mensurada e reproduzida em todos os procedimentos. Foram desenvolvidos dois dispositivos diferentes com o intuito de induzir hemartrose em modelo experimental murino: a) dispositivo com sistema de molas; b) dispositivo com sistema de pesos.

Para a indução do trauma e durante os experimentos, os animais foram sedados através de via inalatória (figura 10); indução da anestesia à 3% de halotano; 3 litros de oxigênio/minuto, manutenção da anestesia à 2% de halotano; 3 litros de oxigênio/minuto (Wixson e Smiler, 1997).

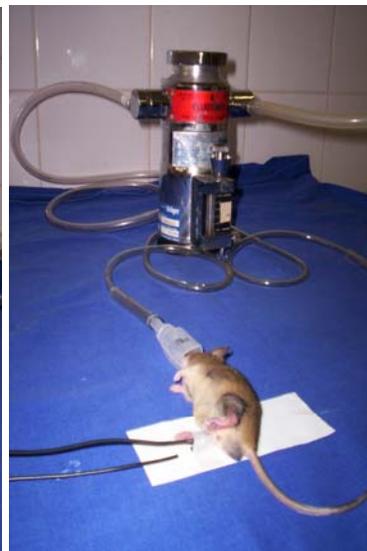
A



B



C



**Figura 10-** Sedação inalatória. **A:** Equipamento utilizado, **B:** câmara para indução da anestesia, **C:** manutenção da anestesia.

### 3.3.2.1- Dispositivo para indução de hemartrose pelo sistema de molas

Um dispositivo com sistema de molas foi construído com o intuito de provocar trauma articular levando a ocorrência de hemartrose em camundongos hemofílicos. Este dispositivo era constituído por uma mola de 60mm, com diâmetro de 0,6mm, posicionada no interior de um tubo (figura 11).



**Figura 11-** Dispositivo para indução de hemartrose através de um sistema de mola.

Antes e após o trauma, os animais passaram por perimetria articular, com o auxílio de um paquímetro (figura 12). A avaliação foi feita através da mensuração da articulação por 3 vezes e a média desses valores foram anotados como o padrão da perimetria articular. A articulação contralateral foi o controle para comparação da evolução do trauma.



**Figura 12-** Paquímetro utilizado para avaliação articular do camundongo.

### 3.3.2.2- Dispositivo para indução de hemartrose pelo sistema de pesos

Um outro dispositivo foi desenvolvido para a indução de hemartrose em camundongos, desta vez baseado em uma força “traumática”, através de peças (de diferentes tamanhos e pesos) atiradas de maneira direta na articulação (figura 13). Este dispositivo foi desenvolvido a partir de uma haste de aço medindo 30 cm de altura (h=30cm).

**A**



**B**



**Figura 13-** Dispositivo para indução de hemartrose através de um sistema de pesos.

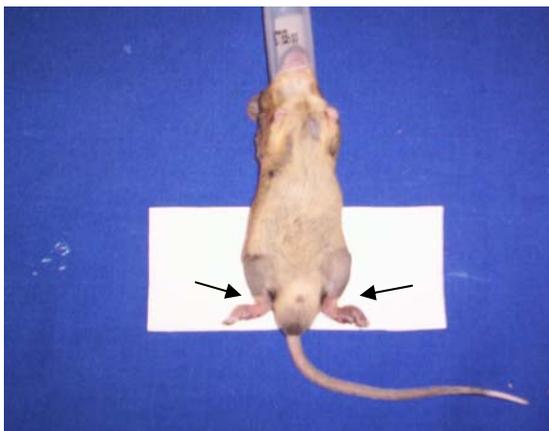
**A:** Demonstração do sistema montado. **B:** Haste medindo 30 cm, onde os pesos são posicionados e soltos em queda livre sobre a articulação.

### 3.3.3- Adequação do equipamento de iontoforese para tratamento iontoforético em camundongos

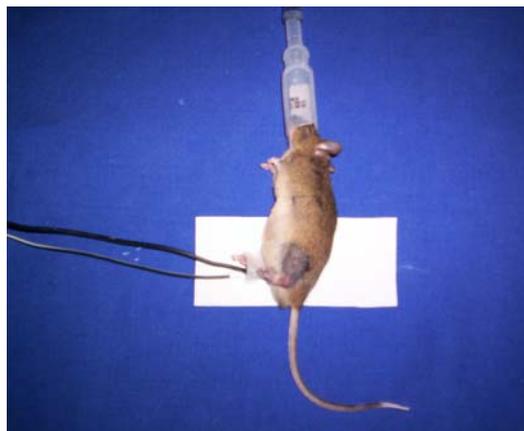
A proposta de realização do procedimento iontoforético em áreas muito pequenas (tal como a articulação do tornozelo do camundongo, figura 14 A) tornou-se um desafio. Para tanto, foi necessária a adequação do equipamento comumente utilizado em humanos.

O aparelho selecionado para a realização da iontoforese foi um gerador de pulsos digital, modelo NEURODYN-10 canais, Ibramed (figura 15 A). O mesmo opera com tecnologia microcontrolada com visor de cristal líquido  $\alpha$ -numérico.

**A**



**B**



**Figura 14-** **A:** Região do tornozelo tricotomizada para aplicação iontoforética. **B:** Posicionamento do animal durante aplicação iontoforética.

**A**



**B**



**Figura 15-** Adequação dos equipamentos utilizados na realização da iontoforese no camundongo. **A:** aparelho utilizado acoplado ao par de eletrodos. **B:** Par de eletrodos (cabo preto, polaridade negativa; cabo vermelho, polaridade positiva) confeccionados para a utilização em camundongos.

Vale lembrar que para o emprego da iontoforese, alguns fatores devem ser considerados, tais como: intensidade da corrente, tempo de aplicação e tamanho do eletrodo. O equipamento utilizado opera com dois canais isolados de dosimetria. A intensidade varia de 01 a 25 mA. O diâmetro dos eletrodos confeccionados varia de 03 a 05 milímetros, dependendo da área do tornozelo do camundongo (figura 15. B). Os eletrodos comumente utilizados têm aproximadamente 15 cm. Portanto, além da adequação dos eletrodos, também foi necessária uma adaptação no software do equipamento para que o mesmo pudesse operar com intensidade de correntes menores.

Após contatos com o engenheiro responsável pelo equipamento, o mesmo foi encaminhado para o fabricante que, neste caso, reduziu a dose da corrente utilizada em 10 vezes (1:10). Desta forma, pudemos operar com intensidades entre 0,1 a 2,5 mA, sendo possível a utilização nos camundongos.

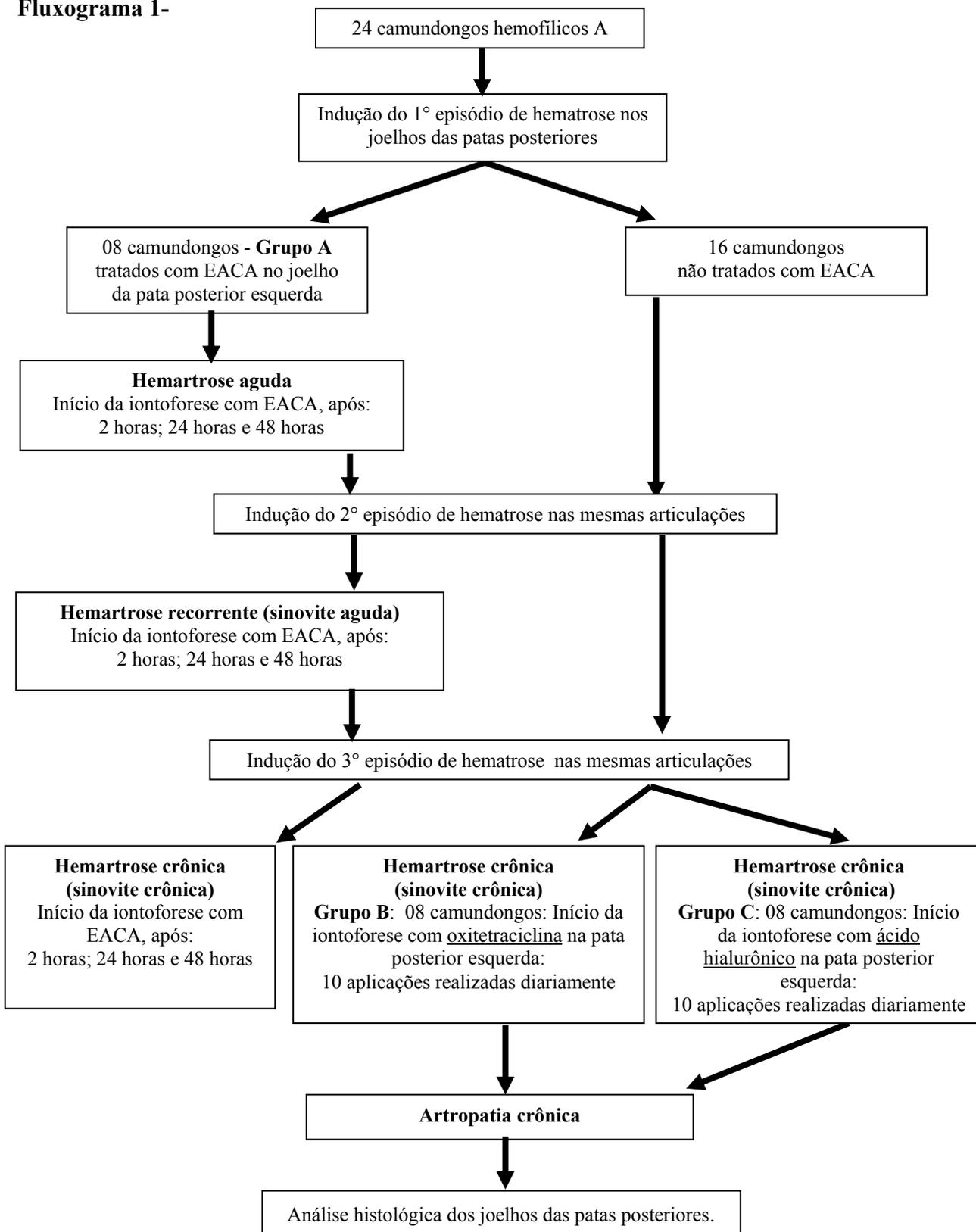
#### 3.3.4- Esquema para avaliação da aplicação iontoforética de fármacos após indução de hemartrose em modelo experimental murino

No fluxograma 1 estão relacionados os diferentes grupos formados para a realização desta fase do estudo.

Vinte e quatro camundongos machos hemofílicos A foram submetidos à indução de hemartrose no tornozelo de ambas as patas posteriores (dia 0). Estes animais foram divididos em três grupos: **Grupo A** – 08 camundongos recebem aplicação iontoforética com EACA no tornozelo da pata posterior direita (2 horas após a indução da hemartrose, repetido 24 horas e 48 horas após), **Grupo B** - 08 camundongos não são tratados e **Grupo C** – 08 camundongos que também não são tratados. No 7º dia todos os 24 animais são submetidos ao segundo episódio de hemartrose no tornozelo posterior bilateralmente. Novamente o grupo previamente tratado com EACA recebe aplicação iontoforética no tornozelo posterior direito nos mesmos momentos após hemartrose. No 14º dia, todos os 24 animais são submetidos ao terceiro episódio de hemartrose no tornozelo posterior bilateralmente. Neste momento é provável que estes animais apresentem sinovite crônica. Enquanto o grupo tratado com EACA (Grupo A) recebe o terceiro ciclo de aplicações, o grupo B, com 08 camundongos inicia o tratamento com aplicação

iontoforética de cloridrato de oxitetraciclina e o grupo C, com 08 camundongos, inicia o tratamento com o ácido hialurônico, ambos no tornozelo da pata posterior direita (total de 10 aplicações realizadas diariamente entre o 15° ao 24° dia). Todos os vinte e quatro animais são sacrificados no 40° dia e posteriormente são realizadas as avaliações histológicas de ambos os tornozelos posteriores de cada animal.

**Fluxograma 1-**



### 3.3.5- Análise histológica da articulação do tornozelo nos camundongos hemofílicos após aplicação iontoforética.

Após o 40º dia a partir do primeiro dia quando foi realizada a indução da hemartrose, todos os camundongos hemofílicos foram sacrificados, através do aprofundamento da anestesia com halotano.

Foram retirados ambos os tornozelos posteriores de cada animal, onde os tornozelos da pata posterior direita nos animais do grupo A, correspondia à articulação que recebeu aplicação iontoforética de EACA; no grupo B, foram tratados com cloridrato de oxitetraciclina e no grupo C. com ácido hialurônico. Os tornozelos posteriores esquerdo de cada animal foram considerados a articulação controle (local de hemartrose não “tratada”).

A articulação do tornozelo do camundongo foi isolada através de um corte no terço distal da fíbula e tíbia. O material passou pelas seguintes etapas: descalcificação, tratamento do tecido (diafanização), inclusão ou incrustação, confecção das lâminas e coloração.

A descalcificação foi realizada por um período de 8 horas de imersão do material no descalcificador (EDTA tetrasódio: 0,7g, tartarato de sódio e potássio: 8g, tartarato de sódio: 0,14g, ácido clorídrico: 120ml, diluído em 900ml de água destilada).

O tratamento do tecido (diafanização) foi realizado pelo equipamento Shandon Citadil 1000. O material passou por 12 banhos de 1 hora cada. A seqüência da diafanização foi realizada por 6 banhos de álcool absoluto (99,5%), 4 banhos de xilol histológico, 2 banhos de parafina líquida à 60°. O tempo total do tratamento foi de 12 horas.

Após o tratamento, o material foi repousado em parafina derretida a 65°C por aproximadamente 20 minutos. A inclusão ou incrustação foi feita em formas, com impregnação do material na parafina líquida a 63°C.

Os blocos de parafina com a inclusão do material foram repousados em gelo e posteriormente cortados a 4 micras (“820” Spencer Microtome American Optical Corporation). Em seguida passaram pelo banho histológico (água aquecida a 56°C) para esticamento uniforme do corte. Após, as lâminas foram lavadas em detergente neutro – Extran e levadas para estufa histológica (Fabbe Primar) a 55°C por 24 horas.

A coloração das lâminas foi realizada por dois métodos: a) corantes hematoxilina-de-Harris e eosina e b) tricômico de Mansson.

O método de hematoxilina-de-Harris e eosina seguiu os seguintes procedimentos: com as lâminas em temperatura ambiente, foram realizados 2 banhos de xilol – 5 minutos cada, 2 passagens de álcool absoluto (99,5%), lavagem em água corrente por 5 minutos. Após, coloração em hematoxilina-de-Harris por 25 segundos, lavando em seguida com água corrente por 5 minutos. Coloração em eosina por 20 segundos seguida de lavagem em água corrente. Foram realizadas 4 passagens em álcool absoluto (99,5%), 2 passagens em xilol, sendo a última aproveitada para imersão das lâminas. Após, as lâminas foram montadas em resina (Entellan) e lamínulas 24x40mm.

O método do tricômico de Mansson seguiu os seguintes procedimentos: desparafinação e hidratação, lavagem em água corrente por 5 minutos, imersão em solução de Bouin (solução saturada de ácido pícrico – 75ml; formaldeído puro – 25ml; ácido acético glacial – 5ml) por 1 hora na estufa a 60°C ou preferencialmente era deixado por uma noite em temperatura ambiente. Após, o material era lavado em água corrente até desaparecer o amarelo deixado pela solução de Bouin seguido de passagem em água destilada. Coloração pela solução de hematoxilina férrica de Weigert - A e B (solução A: hematoxilina pó- 1g, álcool 95% - 100ml; solução B: solução aquosa de cloreto férrico a 29% - 4ml, água destilada – 95ml, ácido clorídrico concentrado – 1ml) por 10 minutos. Lavagem em água corrente por 10 minutos e uma passagem de água destilada. Coloração pela solução escarlata de Briebrich (solução aquosa de escarlata de Biebrich 1% - 90ml, solução aquosa de fucsina ácida 1% - 10ml, adido acético glacial – 1ml) por 5 minutos e passagem em água destilada. Diferenciar pela solução de ácido fosfotungstico-fosfomolibídico (ácido fosfotungstico – 2,5g, ácido fosfomolibílico – 2,5g, água destilada – 100ml) durante 10 a 15 minutos e passagem por água destilada. Coloração pela solução de azul de anilina (azul de anilina – 2,5g, ácido acético glacial – 2ml, água destilada – 100ml) durante 5 a 10 minutos e passagem em água destilada. Passar pela solução de ácido acético glacial 1% (água destilada – 100ml, ácido acético glacial – 1ml) por 3 a 5 minutos e passagem em água destilada. O procedimento foi seguido de desidratação, diafanização e montagem em resina.

A visualização das lâminas foi realizada através do microscópio Axiophot ZEISS (West Germany) e a digitalização das imagens através do equipamento fotográfico: Power Shot G5 (Canon, 5 mega pixels). A digitalização das imagens foi realizada de maneira dirigida, isto é, escolhemos a área onde detectamos as alterações mais exuberantes. Um mínimo de 2 fotos de cada lâmina foram digitalizadas para análise em programa (Image J ® 1.36) dos valores médios de lesão encontrados.

A avaliação histológica foi realizada através de dois examinadores, onde apenas um deles tinha conhecimento do grupo e de qual articulação correspondia cada lâmina avaliada (articulação tratada ou controle).

### 3.3.6- Métodos estatísticos

Os achados histológicos obtidos entre as articulações do tornozelo, nos camundongos hemofílicos tratados ou não tratados com aplicação iontoforética dos fármacos estudados, foram avaliados através das médias e desvios padrões (DP) das áreas que apresentavam lesões. Foi utilizado método não paramétrico (teste de Mann-Whitney) para a avaliação da significância estatística. Esta análise foi realizada através do programa GraphPad InSta® para Windows versão 3.05 (GraphPad Software, Inc., 2000). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando valor de  $P \leq 0,05$ .



## ***4- RESULTADOS***



#### 4.1- Avaliação do transporte transdérmico via iontoforese

O transporte transdérmico em articulações através da iontoforese pôde ser comprovado através de dois experimentos cintilográficos.

No primeiro experimento (com duas etapas), foi utilizado o radioisótopo  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , que habitualmente acumula-se em diversos órgãos, dentre eles, na glândula tireóide. Assim nosso objetivo foi avaliar a presença desta substância na tireóide em duas situações distintas:

- a) Simulação da aplicação iontoforética, porém com o aparelho iontoforético desligado. O  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  foi aplicado no eletrodo e após colocado em contato com a pele do joelho em posição neutra. Os eletrodos foram posicionados medial e lateralmente à articulação do joelho direito. Foram observados critérios tais como: local de aplicação e tempo, para que pudessem ser posteriormente reproduzidos. Os voluntários foram monitorados simultaneamente com captura de imagens pela câmera de cintilação por cerca de 20 minutos. Não se observou em nenhum dos voluntários alguma imagem que indicasse a presença da substância radioativa na tireóide, excluindo a penetração passiva da substância.
- b) Aplicação iontoforética propriamente dita. O  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  foi aplicado no eletrodo negativo e após, colocado em contato com a pele do joelho direito em posição neutra. Os eletrodos foram posicionados medial e lateralmente à articulação do joelho. O aparelho de iontoforese foi ligado e os voluntários permaneceram cerca de 20 minutos, com intensidade baseada em uma rampa ascendente de 1,0 a 8,0 mA. Os mesmos foram monitorados simultaneamente, com a captura de imagens pela câmera de cintilação, e em todos observamos a presença do radiofármaco não só na tireóide, como também nas paredes do estômago e da bexiga, comprovando que houve absorção do material via iontoforese.

Desta forma, pudemos concluir que a iontoforese é uma técnica que viabiliza a penetração por meio da corrente galvânica, de substâncias no organismo através da pele.

Um outro experimento foi realizado para analisar o mecanismo inverso ao da iontoforese. Na iontoforese, os íons medicamentosos são colocados nos eletrodos, para que, a partir da pele e das mucosas, através do estímulo da corrente contínua, sejam introduzidos no interior dos tecidos, pela criação de um campo eletrostático unidirecional constante entre os eletrodos, o que permite a transmissão ininterrupta da medicação. Já o que analisamos neste experimento, foi a possibilidade de uma substância aplicada via endovenosa, concentrar-se na área de colocação dos eletrodos, com a aplicação simultânea da corrente galvânica.

Neste experimento com outros cinco voluntários, foram realizadas administrações endovenosas de uma substância radioativa (Tc99m Sestamibi) que tem a capacidade de acumular-se nos músculos. Os eletrodos foram posicionados medial e lateralmente à articulação do joelho direito. O voluntário foi monitorado simultaneamente com a captura de imagens pela câmera de cintilação, para que pudéssemos avaliar a possibilidade de que com o aparelho de iontoforese ligado, houvesse uma concentração maior da substância injetada na área onde os eletrodos foram posicionados. A aplicação iontoforética durou cerca de 30 minutos, com intensidade em rampa ascendente de 1,0 a 8,0 mA, e não foi observada nenhuma alteração no campo de imagens referentes à área dos eletrodos em nenhum dos voluntários.

#### **4.2- Determinação das concentrações no líquido sinovial e no soro dos fármacos administrados por via iontoforética em articulação do modelo experimental suíno.**

Com o objetivo de avaliarmos a presença e a concentração no líquido sinovial dos fármacos administrados nas articulações por via iontoforética, foi desenvolvido neste estudo um modelo experimental suíno. Estes animais foram escolhidos por apresentarem a articulação do tornozelo favorável à obtenção de amostras de líquido sinovial suficientes

para a análise posterior da presença das drogas através da técnica de espectrometria de massa. Além disso, a utilização de suínos em protocolos iontoforéticos é aceita como modelo, pois em geral os porcos têm características de absorção semelhantes aos humanos (Monteiro-Riviere *et al.*, 1994, Pannus *et al.*, 1997; Pannus *et al.*, 1999; Riviere e Papich, 2001).

Para tanto, este experimento necessitou de várias etapas, incluindo a caracterização das drogas isoladamente (substância padrão), a determinação da polaridade e após estabelecido estes parâmetros, a realização do experimento propriamente dito, para a obtenção das amostras de líquido sinovial e soro para a realização das análises comparativas (presença ou não do fármaco baseado em um padrão purificado da substância).

#### 4.2.1- Caracterização e padronização do método de quantificação das drogas

A caracterização das drogas foi realizada através da análise pela espectrometria de massa da droga isolada (substância padrão) para determinar o pico de intensidade correspondente a cada droga quando identificada pela técnica de espectrometria de massa.

Outro parâmetro avaliado foi a determinação da polaridade das drogas utilizadas na aplicação iontoforética. Esta é uma variável essencial para a realização da técnica de iontoforese, no entanto nem sempre este parâmetro é facilmente obtido apenas pela avaliação da composição química do medicamento. Portanto com a caracterização do padrão do EACA, do cloridrato de oxitetraciclina e do ácido hialurônico por espectrometria de massas, foi possível também determinar a polaridade das drogas através dos experimentos de aplicação iontoforética no modelo animal *in vivo*, na articulação do tornozelo de suínos. Com este intuito, foram analisadas amostras do soro do porco, após o mesmo ter sido submetido a aplicação iontoforética na articulação do tornozelo, de acordo com o protocolo anteriormente descrito. Esta análise consistiu em duas fases: a) colocando o medicamento no eletrodo positivo e b) repetindo o experimento com o medicamento no eletrodo negativo. A densidade de corrente foi 160mA x minuto (4mA durante 40 minutos),

não ultrapassando 0.28mA/cm<sup>2</sup>. Ao término da aplicação iontoforética por 40 minutos, foram coletados 5 ml de sangue arterial através da artéria femoral contralateral ao tratamento iontoforético (já previamente puncionada para monitoramento da pressão arterial central, conforme descrito no “Protocolo de aplicação iontoforética em suínos”). Estas amostras foram centrifugadas a 850 x g, 25°C, durante 5 minutos para separação das amostras de soro. As mesmas foram posteriormente analisadas para determinação da presença de cada droga através da técnica de espectrometria de massa. Este experimento foi repetido separadamente para cada droga analisada.

Com a determinação da polaridade de cada droga, foi possível a realização do experimento propriamente dito, tendo sido realizado cerca de 45 experimentos (total de 8 animais). Cada experimento consistiu da aplicação iontoforética dos fármacos seguida da coleta de 2 amostras de líquido sinovial coletadas da articulação do tornozelo tratado e 2 amostras de sangue total coletadas da artéria femoral contralateral.

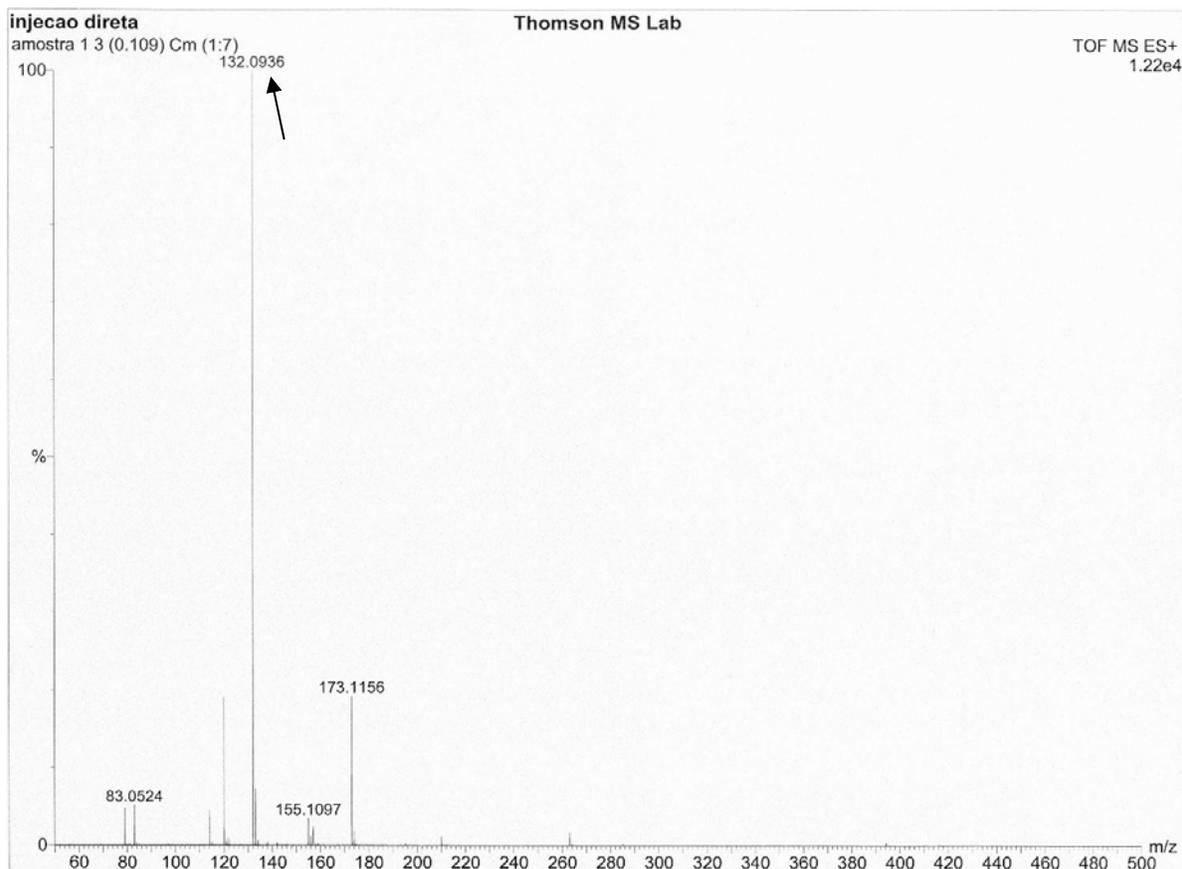
A coleta das amostras de sangue periférico do protocolo suíno foi realizada em 4 tempos distintos. A primeira amostra foi obtida antes do início do procedimento. A segunda e a terceira amostra foram coletadas em 20 ± 1 minuto e 40 ± 1 minuto, respectivamente. A amostra final foi obtida 30 ± 1 minuto após o término do procedimento. Estas amostras foram armazenadas no gelo por aproximadamente 30 minutos e após, centrifugadas a 850 x g, 25°C, durante 5 minutos (Panus *et al.*, 1999). O soro foi separado e armazenado (-80°C). Antes da análise através da espectrometria de massa, as amostras foram centrifugadas de 2500 a 3000 g, a 4°C, durante 10 minutos. As amostras de líquido sinovial foram coletadas em 20 ± 1 minuto e 40 ± 1 minuto e armazenadas em -80°C.

#### 4.2.1.1- Ácido ε-aminocapróico (EACA)

##### 4.2.1.1.1- Caracterização do ácido ε-aminocapróico (EACA) pela técnica de ESI-MS

A caracterização do EACA foi possível através da utilização de um padrão comercial do EACA com 99% de pureza (6-aminoheptanoic acid, SigmaUltra, 99% - Sigma-Aldric, Inc., Japão). Para a realização da análise foi obtida uma amostra de EACA

99% na concentração de 1ng/ml, utilizando como diluente água destilada e metanol na proporção 1:100 e posterior análise através da técnica de espectrometria de massas (gráfico 1). Foram realizadas diluições seriadas desta solução (1:10; 1:100 e 1:1000) que foram posteriormente analisadas através do equipamento *Q-TOF mass spectrometer* (Micromass, Manchester, UK) para a obtenção de uma curva de calibração.



**Gráfico 1- Caracterização do ácido aminocapróico (EACA) por espectrometria de massa.** Análise do EACA 99% diluído em água e metanol (1:100) na concentração final de 1ng/ml. Os sinais de maior intensidade: m/z 132.09 (seta), correspondem à presença do EACA.

#### 4.2.1.1.2- Determinação da polaridade do ácido $\epsilon$ -aminocapróico (EACA)

Para a determinação da polaridade do EACA foi realizada a administração iontoforética no tornozelo de porco previamente sedado e monitorizado conforme protocolo previamente descrito para esta finalidade. Um total de 5ml do EACA na concentração de 50 mg/ml foi colocado no eletrodo do pólo positivo e realizado a aplicação iontoforética por 40 minutos, seguida da coleta de 5 ml de sangue arterial da artéria femoral contralateral. Após o mínimo de 48hs do término do experimento, o mesmo foi repetido em outra articulação do tornozelo no mesmo animal, no entanto desta vez o EACA foi colocado no eletrodo do pólo negativo.

As amostras de soro obtidas em cada um destes experimentos revelaram a presença do EACA apenas quando o mesmo foi aplicado a partir do eletrodo no pólo positivo. Outras amostras obtidas durante a execução da iontoforese com a colocação da droga no eletrodo negativo não revelaram a presença do ácido  $\epsilon$ -aminocapróico. Vale lembrar que a ausência da substância foi observada em todas as amostras analisadas ( $20 \pm 1$  minuto e  $40 \pm 1$  minuto, durante o procedimento e  $30 \pm 1$  minuto após o procedimento).

Contudo, pudemos observar através do conjunto de resultados obtidos, que o ácido aminocapróico (EACA) é uma substância de polaridade positiva (a droga foi colocada no eletrodo positivo e foi encontrada na amostra) e que é possível a sua utilização e emprego pela via iontoforética.

#### 4.2.1.1.3- Análise quantitativa do ácido $\epsilon$ -aminocapróico (EACA)

Ao início da análise quantitativa do EACA foram realizadas cinco leituras consecutivas da substância padrão em uma mesma concentração conhecida (1ng/ml). A área de cada amostra foi observada e os resultados obtidos foram: 1ª amostra: 776 m/z, 2ª amostra: 885 m/z, 3ª amostra: 806 m/z, 4ª amostra 772 m/z, 5ª amostra 626 m/z. A média da área da substância padrão foi de 773 m/z, portanto correspondente a concentração do EACA de 1ng/ml.

Após, foram analisadas as amostras de soro e líquido sinovial coletadas em  $40 \pm 1$  minuto após o início da aplicação iontoforética. Os resultados referentes às áreas das amostras de soro aos  $40 \pm 1$  minuto durante o procedimento foram: 1ª amostra: 5 m/z (0,006 ng/ml), 2ª amostra: 17 m/z (0,021 ng/ml), 3ª amostra: 47 m/z (0,060 ng/ml), 4ª amostra: 63 m/z (0,081 ng/ml). As áreas observadas nas amostras obtidas simultaneamente do líquido sinovial foram: 1ª amostra: 70 m/z (0,090 ng/ml), 2ª amostra: 59 m/z (0,076 ng/ml), 3ª amostra: 50 m/z (0,064 ng/ml), 4ª amostra 71 m/z (0,091 ng/ml) (tabela 4).

Comparando-se os dados referentes às amostras simultaneamente obtidas da circulação sistêmica (soro) e do líquido sinovial observamos que as áreas correspondentes ao líquido sinovial foram sempre maiores que as observadas na circulação sistêmica. Portanto podemos concluir que a concentração da droga no líquido sinovial é maior do que a concentração desta no soro, fato que justificaria a prática clínica da iontoforese com o EACA.

**Tabela 4-** Comparação dos resultados do EACA obtido no soro e no líquido sinovial.

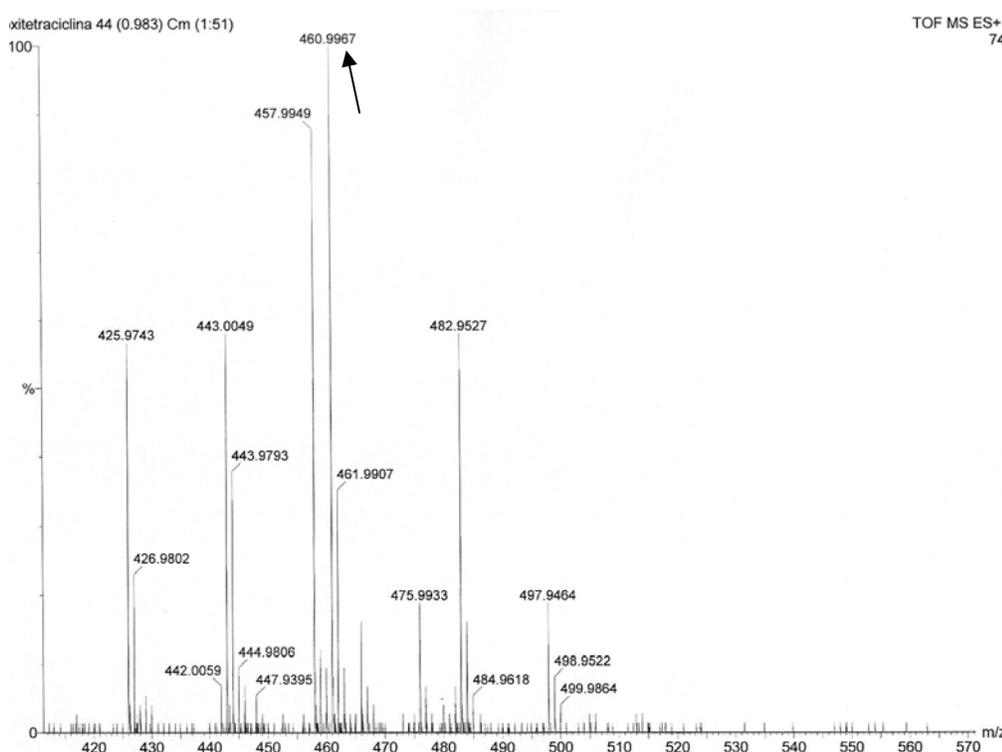
Amostra	Soro		Líquido sinovial	
	Área (m/z)	Concentração (ng/ml)	Área (m/z)	Concentração (ng/ml)
1	5	0,006	70	0,090
2	17	0,021	59	0,076
3	47	0,060	50	0,064
4	63	0,081	71	0,091
Média (± DP)		0,04 ± 0,03		0,08 ± 0,01 *

\* Mann-Whitney test: P=0.1

#### 4.2.1.2- Cloridrato de oxitetraciclina

##### 4.2.1.2.1- Caracterização do cloridrato de oxitetraciclina pela técnica de ESI-MS

A caracterização da oxitetraciclina utilizando a técnica de espectrometria de massas seguiu o mesmo padrão realizado anteriormente. Utilizamos para análise uma amostra da oxitetraciclina (oxytetracycline dihydrate 998mcg/mg, INC Biomedical Inc – USA) na concentração de 50µg/ml e diluída em água destilada e metanol na proporção 1:100. Ao final 0,1 µg/ml foi analisado resultando em um pico de maior intensidade de 460.9 m/z (gráfico 2).



**Gráfico 2- Caracterização da oxitetraciclina por espectrometria de massa.** Análise do fármaco diluído em água e metanol (1:100) na concentração final de 0,1 µg/ml. O pico de maior intensidade 460.9 m/z corresponde a oxitetraciclina.

#### 4.2.1.2.2- Determinação da polaridade do cloridrato de oxitetraciclina

Para a determinação da polaridade do cloridrato de oxitetraciclina foi realizada a administração iônica no tornozelo de porco previamente sedado e monitorizado conforme protocolo previamente descrito. Um total de 4,0 ml do cloridrato de oxitetraciclina na concentração de 50mg/ml foi colocado no eletrodo do pólo positivo.

A aplicação iontoforética foi realizada por 40 minutos, seguida da coleta de 5 ml de sangue arterial da artéria femoral contralateral. Após o mínimo de 48hs do término do experimento, o mesmo foi repetido em outra articulação com a droga colocada no eletrodo do pólo negativo.

As amostras de soro obtidas em cada um destes experimentos revelaram a presença do cloridrato de oxitetraciclina apenas quando a mesma foi aplicada a partir do eletrodo no pólo positivo. Outras amostras obtidas durante a execução da iontoforese com a colocação da droga no eletrodo negativo não revelaram a presença do fármaco. Vale lembrar que a ausência da substância foi observada em todas as amostras analisadas ( $20 \pm 1$  minuto e  $40 \pm 1$  minuto, durante o procedimento e  $30 \pm 1$  minuto após o procedimento). Portanto, o cloridrato de oxitetraciclina é uma substância de polaridade positiva.

#### 4.2.1.2.3- Análise quantitativa da oxitetraciclina

A análise quantitativa da oxitetraciclina foi realizada através de cinco leituras consecutivas da substância padrão em uma mesma concentração ( $0,1 \mu\text{g/ml}$ ). A área de cada amostra foi observada. Os resultados obtidos foram: 1ª amostra: 24 m/z, 2ª amostra: 32 m/z, 3ª amostra: 46 m/z, 4ª amostra: 37 m/z, 5ª amostra 33 m/z. A média da área da substância padrão foi de 34,4 m/z.

Após, foram analisados dados referentes às amostras de sangue obtidas da circulação sistêmica através da artéria femoral contralateral ao tratamento iontoforético e também do líquido sinovial retirado da articulação ipsilateral. Ambas amostras foram coletadas em  $40 \pm 1$  minuto durante o procedimento.

Os resultados referentes às áreas das amostras obtidas da circulação sistêmica aos  $40 \pm 1$  minuto durante o procedimento foram: 1ª amostra: 212 (6,162  $\mu\text{g/ml}$ ), 2ª amostra: 197 (5,726  $\mu\text{g/ml}$ ), 3ª amostra: 199 (5,784  $\mu\text{g/ml}$ ), 4ª amostra 201 (5,843  $\mu\text{g/ml}$ ). As áreas observadas nas amostras obtidas simultaneamente do líquido sinovial foram: 1ª amostra: 83 (2,412  $\mu\text{g/ml}$ ), 2ª amostra: 125 (3,633  $\mu\text{g/ml}$ ), 3ª amostra: 91(2,645  $\mu\text{g/ml}$ ), 4ª amostra 171(4,970  $\mu\text{g/ml}$ ) (tabela 5).

Comparando-se os dados referentes às amostras simultaneamente obtidas da circulação sistêmica e do líquido sinovial observamos que as áreas correspondentes a circulação sistêmica foram maiores em todas as amostras. Tal fato não impede o uso do cloridrato de oxitetraciclina via iontoforese, pois o uso conjunto de substâncias potencializadoras da iontoforese devem ser exploradas em outras pesquisas a fim de maximizar o nível de penetração da droga, e com isso aumentar sua concentração em locais mais profundos, tal como o líquido sinovial.

**Tabela 5-** Comparação dos resultados do cloridrato de oxitetraciclina obtido no soro e no líquido sinovial.

Amostras	Soro		Líquido sinovial	
	Área (m/z)	Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	Área (m/z)	Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	212	6,162	83	2,412
2	197	5,726	125	3,633
3	199	5,789	91	2,645
4	201	5,843	171	4,970
Média ( $\pm$ DP)		5,88 $\pm$ 0,19		3.41 $\pm$ 1.16 *

\* Mann-Whitney test: P=0.02

#### 4.2.1.3- Ácido hialurônico.

##### 4.2.1.3.1- Caracterização do ácido hialurônico pela técnica de ESI-MS

A caracterização do ácido hialurônico utilizando a técnica de espectrometria de massas seguiu o mesmo padrão realizado para o EACA. Utilizamos uma amostra do ácido hialurônico (fabricado pela Nikkol, origem China e distribuído pela Galena Química e Farmacêutica Ltda.) na concentração de 0,1µg/ml, utilizando como diluente água destilada e metanol na proporção 1:100 (gráfico 3).



**Gráfico 3- Caracterização do ácido hialurônico por espectrometria de massa.** Análise do HA diluído em água e metanol (1:100) na concentração final de 0,1µg/ml. Os picos de maior intensidade são o hexâmero do HÁ (1136.1m/z) e seu fragmento (933.5m/z).

O ácido hialurônico (HA) é um polissacarídeo que contém de 4 a 12 unidades/açúcar. Para cada unidade, existe uma identificação através da espectrometria de massa (Kuhn, 2003). A porção deste polissacarídeo que identificamos pela espectrometria de massa, após várias tentativas de calibração do aparelho a fim de buscar otimização do

método, foi o hexâmero do HA (1136.1m/z). Este hexâmero por sua vez, dissocia-se em um outro íon, que é um fragmento do hexâmero do HA. O fragmento é identificado através da leitura 933.5m/z. Para que a avaliação das análises não apontasse resultados falso-positivos, analisamos os íons 1136.1 m/z e 933.5 m/z.

#### 4.2.1.3.2- Determinação da polaridade do ácido hialurônico

Para a determinação da polaridade do ácido hialurônico foi realizada a administração iontoforética no tornozelo de porco previamente sedado e monitorizado conforme protocolo previamente descrito. Um total de 2,5 ml de ácido hialurônico na concentração de 10 mg/ml foi colocado no eletrodo do pólo positivo.

A aplicação iontoforética foi realizada por 40 minutos, seguida da coleta de 5ml de sangue arterial da artéria femoral contralateral. Após o mínimo de 48hs do término do experimento, o mesmo foi repetido em outra articulação do tornozelo no mesmo animal, no entanto desta vez, um total de 2,5 ml de ácido hialurônico (10mg/ml) foi colocado no eletrodo do pólo negativo.

As amostras de soro obtidas em cada um destes experimentos revelaram a presença do HA apenas quando o mesmo foi aplicado a partir do eletrodo no pólo negativo. Outras amostras obtidas durante a execução da iontoforese com a colocação da droga no eletrodo positivo não revelaram a presença do ácido hialurônico. Vale lembrar que a ausência da substância foi observada em todas as amostras analisadas ( $20 \pm 1$  minuto e  $40 \pm 1$  minuto, durante o procedimento e  $30 \pm 1$  minuto após o procedimento). Portanto, o ácido hialurônico é uma substância de polaridade negativa (a droga foi colocada no eletrodo negativo e foi encontrada na amostra) e que é possível a sua utilização e emprego pela via iontoforética.

#### 4.2.1.3.3- Análise semi quantitativa do ácido hialurônico

Nesta etapa foram desenvolvidos métodos para a análise do ácido hialurônico. Não foi possível a análise quantitativa do ácido hialurônico utilizando a espectrometria de massas, devido à inexistência de métodos na literatura para determinação quantitativa de tal analito, visto que existem vários íons que compõe este grande molécula e a identificação e análise isolada de apenas um íon nas amostras do experimento pode induzir a resultados falso-positivos, uma vez que o fenômeno de supressão iônica altera e mimetiza a leitura dos compostos.

Desta forma, a análise semi quantitativa foi realizada de acordo com a interpretação dos maiores picos observados no espectro de massa após a iontoforese (transformados e representados em pontos percentuais), em relação aos maiores picos de m/z observados no composto do medicamento em sua forma pura.

Em um primeiro momento, foram analisados os gráficos da substância isolada correspondente ao ácido hialurônico diluído em água e metanol, em uma concentração final de 0,1µg/ml e as amostras do soro e do líquido sinovial obtidos no experimento *in vivo* durante aplicação iontoforética do ácido hialurônico no eletrodo negativo posicionado na articulação do tornozelo do porco.

A análise quantitativa de 1µl da substância isolada do ácido hialurônico 0,1µg/ml revelou que quando o íon 933.5 m/z atinge 291 de intensidade, corresponde a 100% da presença da droga na amostra. O resultado das porcentagens relativas revelou 20,96% da substância presente na amostra do soro e 25,08% da substância presente na amostra do líquido sinovial.

#### **4.3- Resultados da avaliação da administração dos fármacos por via iontoforética após indução de hemartrose na articulação do tornozelo em camundongos hemofílicos.**

Uma vez confirmada a presença dos fármacos EACA, cloridrato de oxitetraciclina e ácido hialurônico no líquido sinovial, quando as mesmas foram administradas por via iontoforética na articulação de suínos, decidimos avaliar a ação destas drogas em modelo experimental de hemartrose aguda e artropatia hemofílica, utilizando camundongos hemofílicos.

#### 4.3.1- Indução de hemartrose nos camundongos hemofílicos

O primeiro desafio nesta fase do estudo foi estabelecer e padronizar um dispositivo capaz de provocar trauma articular levando a ocorrência de hemartrose em camundongos hemofílicos. Foram desenvolvidos dois dispositivos, um deles baseado em um sistema de molas, conforme descrito por Valentino *et al.* (2004) e posteriormente outro dispositivo foi construído para a indução de hemartrose baseado em uma força “traumática”.

##### 4.3.1.1- Dispositivo para indução de hemartrose pelo sistema de molas

O dispositivo com sistema de molas foi constituído por uma mola de 60mm, com diâmetro de 0,6mm, posicionada no interior de um tubo.

Foi necessário estabelecer o controle e padronização da força aplicada durante a indução da hemartrose utilizando este dispositivo desenvolvido. Para este cálculo foi utilizada a fórmula  $F = K \times X$  onde:  $K = 0,014 \text{ Kg/mm}$  ( $K$  é a constante da mola) e  $X$  = a distância em milímetros aplicado na mola (indicados pela régua acoplada) e representa a carga aplicada. Com isto foi possível estabelecer que a distância entre uma volta da mola e outra ( $p$ ) era de 2,7mm.

Inicialmente, a articulação eleita para a execução do trauma foi o joelho. Os animais foram posicionados abaixo do aparato com a mola de modo que a articulação do joelho ficasse exposta durante a execução do trauma.

A aplicação do trauma foi pontual, obedecendo sempre a mesma área articular. Foram feitos vários grupos para otimização do trauma, onde diversas forças foram utilizadas para a indução da hemartrose, conforme representado na tabela 6.

**Tabela 6-** Demonstrativo dos grupos de animais para otimização do trauma.

<u>Dispositivo de mola</u>	<u>Carga utilizada</u>	<u>Força do trauma</u>
	$F = K \times X$	
Grupo M1	X = 10 mm	0,14kg / 140g
Grupo M2	X = 20 mm	0,28kg / 280g
Grupo M3	X = 30 mm	0,42kg / 480g
Grupo M4	X = 40 mm	0,56kg / 560g

Antes e após o trauma, os animais passaram por perimetria articular, com o auxílio de um paquímetro. A avaliação foi feita através da mensuração da articulação. As medidas foram realizadas três vezes e a média desses valores foram anotados como o padrão da perimetria articular. A articulação eleita contralateral foi o controle para comparação da evolução do trauma.

Nos grupos M1 e M2 não foi observado nenhuma alteração, tanto na avaliação visual: hematomas, análise da deambulação do animal; quanto na mensuração da perimetria articular. No grupo M3, observamos hematomas esporádicos, ausência de edema e nenhum sinal de debilidade do animal. No grupo M4 notou-se a presença de pequenos hematomas, edema mínimo e hemartoses eventuais.

A constante de força máxima do equipamento foi utilizada, porém, os animais nem sempre desenvolviam a hemartrose. O que nos chamou atenção foi o fato de serem utilizadas cargas com força de trauma superior a aproximadamente 20 vezes o peso do animal (os camundongos pesavam em média 25 g e utilizamos cargas de até 0,56kg / 560g) que nem sempre desencadeavam o processo de hemartrose. Os resultados observados não foram homogêneos.

Desta forma, a hipótese levantada foi que a força empregada neste dispositivo de molas, isto é, uma força “compressiva”, embora tenha sido o mesmo mecanismo descrito por Valentino *et al.* (2004), não seja a forma ideal de indução de hemartrose para nosso modelo.

#### 4.3.2- Dispositivo para indução de hemartrose pelo sistema de pesos

Considerando a dificuldade em reproduzir de forma sistemática as lesões que desencadeassem o processo de hemartrose, elaboramos outro dispositivo baseado em uma força “traumática”, através de peças (de diferentes tamanhos e pesos) atiradas de maneira direta na articulação.

O dispositivo foi desenvolvido a partir de uma haste de aço medindo 30 cm de altura. (h=30cm). Para calcular a força de trauma que o animal recebe, temos que calcular o impulso, que são quantos quilogramas de massa são deslocados na unidade metros por segundo. Para calcular o impulso, é necessário sabermos a massa e a velocidade, pois impulso ( i ) = massa x velocidade. Para chegarmos na velocidade, precisamos do conceito de que a energia potencial ( m g h ) se transforma em energia cinética ( m v<sup>2</sup>/2 ) e a fórmula  $m g h = \frac{m v^2}{2}$  precisa ser empregada, onde g = gravidade (9,8 m/s<sup>2</sup>).

Foram feitos vários grupos com a utilização de pesos distintos para otimização do trauma, conforme tabela 7.

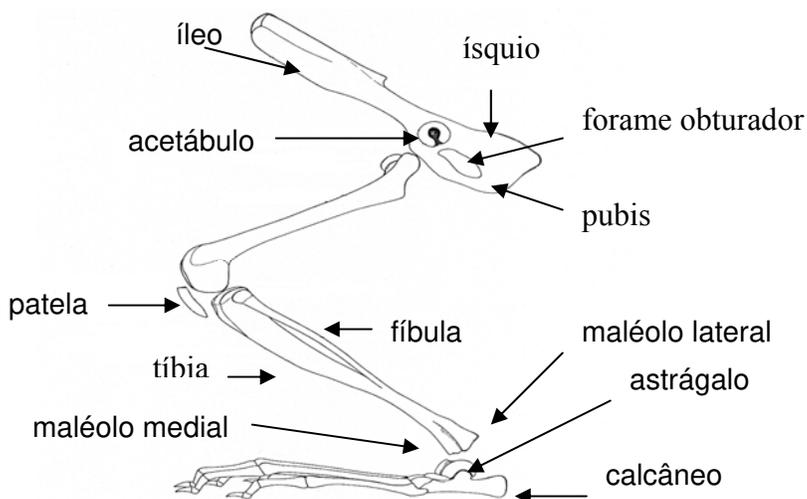
**Tabela 7-** Demonstrativo de dados do dispositivo de pesos.

<b>Dispositivo de pesos</b>	<b>Tamanho e peso das peças</b>	<b>Força do trauma</b> $m g h = \frac{m v^2}{2}$
Grupo P1	10 mm / 5.3281g	i = 0,013 kg . m/s
Grupo P2	20mm / 11.3504g	i = 0,027 kg . m/s
Grupo P3	30mm / 17.2823g	i = 0,042 kg . m/s
Grupo P4	40mm / 22.0457g	i = 0,053 kg . m/s
Grupo P5	50mm / 28.6390g	i = 0,069 kg . m/s

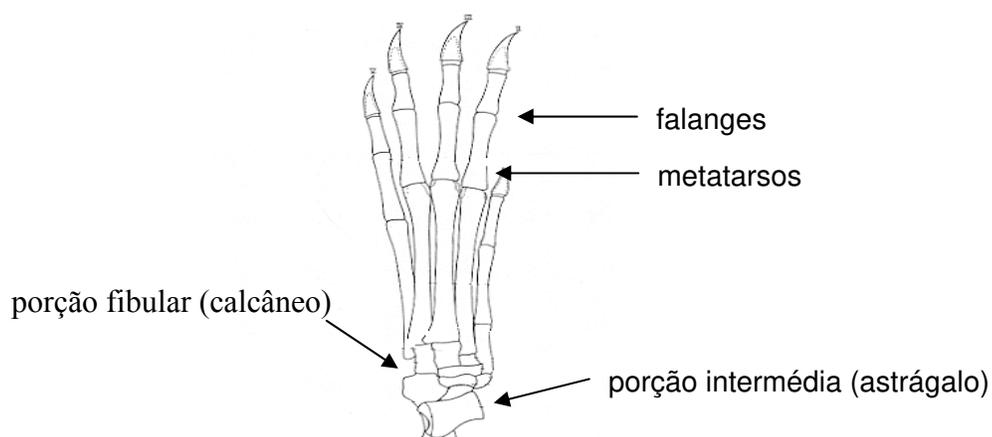
Após sedação, os animais foram posicionados abaixo da haste do novo dispositivo por sistema de pesos, de modo que a articulação do joelho ficasse exposta durante a execução do trauma.

No entanto, observamos que o trauma aplicado na articulação do joelho era acompanhado pelo desenvolvimento de sangramentos musculares importantes, com complicações que na maioria das vezes levaram o animal ao óbito.

Foram realizadas análises histológicas destes animais e observamos que a indução do trauma na articulação do joelho nem sempre desencadeava o desenvolvimento da hemartrose (que é o nosso objetivo principal) e sim, severos sangramentos musculares em musculatura adjacente. Em virtude disso, optamos pela indução de hemartrose na articulação do tornozelo (figuras 16 e 17).



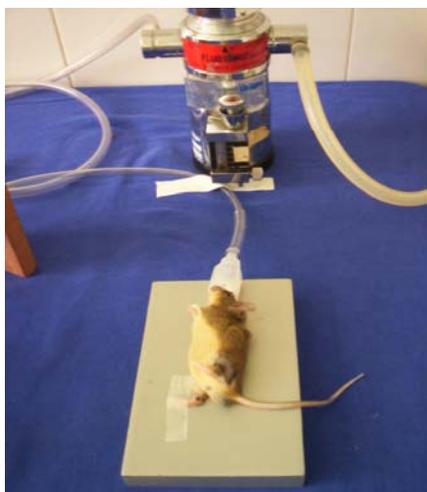
**Figura 16-** Membro inferior e pelve do camundongo: vista lateral. (Adaptado de Rowett, 1957)



**Figura 17-** pé do camundongo: vista superior. (Adaptado de Rowett, 1957)

Assim novamente seguindo o mesmo padrão de intensidade de força do trauma conforme descrito na tabela 5, foi realizada indução do trauma, desta vez na articulação do tornozelo murino. Antes e após o trauma, os animais passaram por perimetria articular, com o auxílio de um paquímetro da mesma forma descrita anteriormente. A aplicação do trauma foi pontual, obedecendo sempre a mesma área articular (figura 18).

A



B



**Figura 18- A e B:** Demonstração do posicionamento do animal para indução da hemartrose no tornozelo utilizando o dispositivo por sistema de pesos.

Realizando a indução de trauma no tornozelo dos camundongos, observamos que nos grupos P1 (0,013 kg x m/s) e P2 (0,027 kg x m/s) não houve sinais e sintomas compatíveis com a indução de hemartrose. No grupo P3 (0,042 kg x m/s) os camundongos apresentaram edema imediato após o trauma e pequena restrição ao movimento, isto é, após terem sido submetidos ao trauma, procuravam ficar isolados na gaiola, com discreta diminuição da deambulação. Já no grupo P4 (0,053 kg x m/s) os animais observados demonstraram edema imediato após o trauma, hematoma e restrição significativa do movimento. Os mesmos ficaram menos ativos na gaiola e tendiam a permanecer nos cantos da mesma, movendo-se esporadicamente. Os camundongos do grupo P5 (0,069 kg x m/s) desenvolveram severo quadro de edema acompanhado de hematomas, abrangendo não só a região articular como também toda extensão do membro inferior do lado onde foi desencadeado o trauma. Os sinais de restrição ao movimento foram mais intensos, muitos animais faleceram após o trauma.

A intenção do trauma, em todos os grupos, foi desencadear um quadro agudo de hemartrose sem que, no entanto houvesse dano à estrutura óssea e cartilaginosa agudamente. Portanto, de acordo com os dados obtidos nos diferentes grupos, o grupo P4 apresentou os resultados mais próximos ao esperado, isto é, o desenvolvimento de quadro agudo de hemartrose sem dano ósseo ou cartilaginoso imediato.

#### 4.3.3- Parâmetros da iontoforese para tratamento iontoforético em camundongos

O uso da iontoforese na prática clínica depende da padronização e elucidação de algumas variáveis fundamentadas em princípios físicos que são imprescindíveis para a fundamentação da técnica, pois possibilitam o cálculo da quantidade teórica de massa do princípio ativo a ser introduzida nos tecidos.

Para o cálculo de todas variáveis de cada droga a ser utilizada nos experimentos, foi levado em conta: peso dos animais média 30 g (0,03 kg), área da circunferência de 3 mm (compatível com a articulação do tornozelo do camundongo) do eletrodo utilizado =  $7,7013 \text{ mm}^2$  ( $0,77013 \text{ cm}^2$ ). O cálculo da área do eletrodo foi

necessário para calcular a intensidade máxima de corrente a ser empregada durante a aplicação iontoforética (a fim de não lesar a pele) e o tempo de exposição à corrente elétrica que o animal seria submetido. A padronização do protocolo iontoforético foi realizada para a administração do EACA e do cloridrato de oxitetraciclina (tabela 6). Esta padronização não foi realizada com o ácido hialurônico, pois a valência do elemento não pode ser identificada. Desta forma, o não conhecimento de uma das variáveis do cálculo teórico do protocolo iontoforético prejudicou a padronização para uso do ácido hialurônico no protocolo murino.

**Tabela 8-** Padronização do protocolo iontoforético.

Substância	Massa molar (kg/mol)	Valência do elemento	Dose terapêutica	Massa introduzida (ml)	Tempo de aplicação
EACA	131.2	2	6mg/0,006Kg	0,12ml	T <sub>1</sub> – 22,78s T <sub>2</sub> – 1minuto
OTC	496.5	6	0,75mg/0,00000075Kg	0,02ml	T <sub>1</sub> – 230,05s (3.85s) T <sub>2</sub> – 4minutos

EACA: ácido ε-aminocapróico; OTC: oxitetraciclina

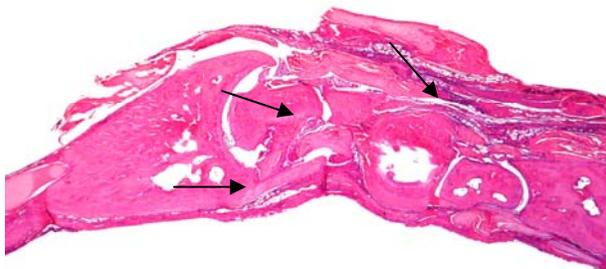
A intensidade da corrente não pode ultrapassar 0,28 mA/cm<sup>2</sup> (Singh e Maibach, 1993) de área de eletrodo ativo, pois isso poderia causar queimaduras no local da aplicação. Da mesma forma locais com escoriações ou úlceras não permitem o uso da iontoforese, pois podem concentrar fluxo iônico e causar aumento da lesão. Desta forma, a intensidade de corrente utilizada foi 0,2 mA/cm<sup>2</sup> e o tempo de aplicação oscilou de acordo com a droga utilizada pois para este cálculo os valores de massa molar e a valência de cada substância variam.

#### 4.4- Resultados da análise histológica da articulação do tornozelo nos camundongos hemofílicos.

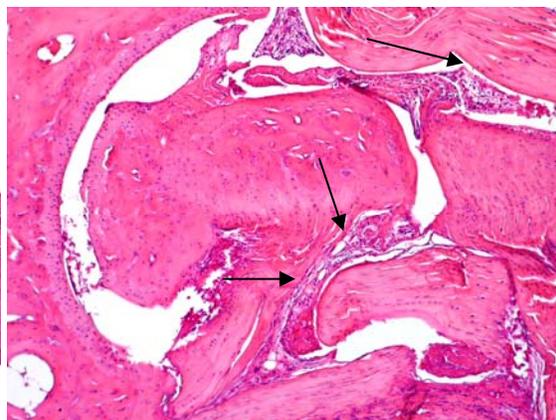
Para a verificação concreta do nível de lesão articular provocada pelo trauma através do dispositivo de pesos padronizado conforme descrito anteriormente, foi realizado inicialmente um grupo piloto previamente ao estudo. Para este grupo, o peso utilizado para provocar o trauma foi o de 40 mm, com 22.0457g, o que corresponde a uma força de impacto de  $i = 0,053 \text{ kg} \times \text{m/s}$ , capaz de desencadear uma hemartrose sem dano ósseo ou cartilaginoso imediato.

A avaliação através de análise histológica da articulação do tornozelo de camundongos hemofílicos A deste grupo piloto, ou seja, com lesão articular, mas que não receberam tratamento iontoforético, foi realizada em animais que foram sacrificados após 10 dias da primeira entre três induções de hemartrose (figuras 19 e 20).

**A:**



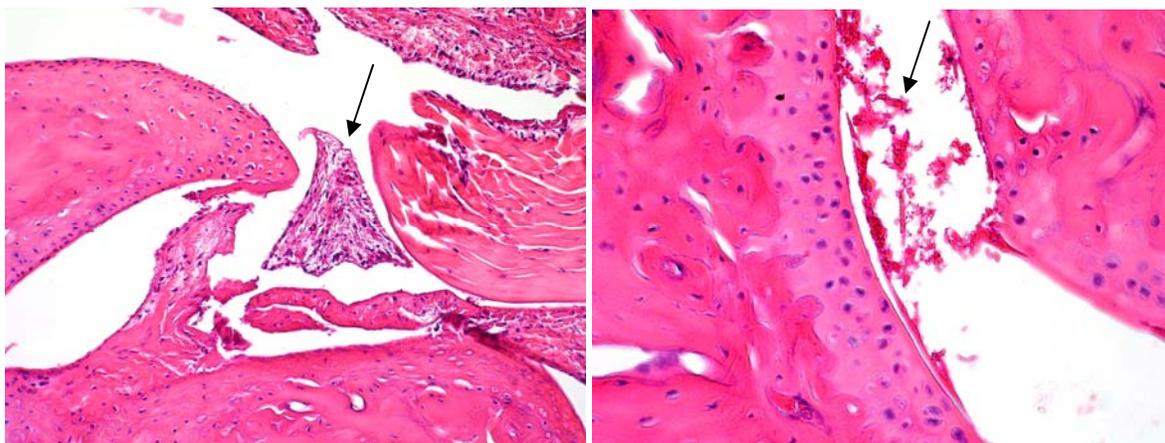
**B:**



**Figura 19-** Articulação do tornozelo de camundongo do grupo piloto, após 10 dias da primeira indução de hemartrose por trauma. **A:** lesão proliferativa nos espaços articulares (aumento:16x). **B:** Tecido osteocartilaginoso jovem exuberante, áreas de células mesenquimatosas imaturas (aumento: 64x).

**A:**

**B:**



**Figura 20-** Articulação do tornozelo do camundongo após 10 dias da primeira indução de hemartrose por trauma. **A:** Proliferação do tecido sinovial (aumento: 64x). **B:** Infiltração de neutrófilos (aumento:128x).

A avaliação do grupo piloto foi imprescindível para a padronização do mecanismo de indução da hemartrose e através deste grupo foi possível comprovar a ocorrência de lesão proliferativa 10 dias após a primeira das três lesões traumáticas.

Após esta etapa foi possível iniciar a avaliação dos grupos submetidos ao tratamento iontoforético conforme proposto no fluxograma deste estudo. No grupo A os animais receberam aplicação iontoforética com EACA no tornozelo da pata posterior direita (total 08 animais), no grupo B os animais foram tratados com o cloridrato de oxitetraciclina (08 animais), e no grupo C com ácido hialurônico (08 animais), ambos também no tornozelo da pata posterior direita. Todos os camundongos (grupos A, B e C) foram sacrificados no 40º dia (fluxograma 1).

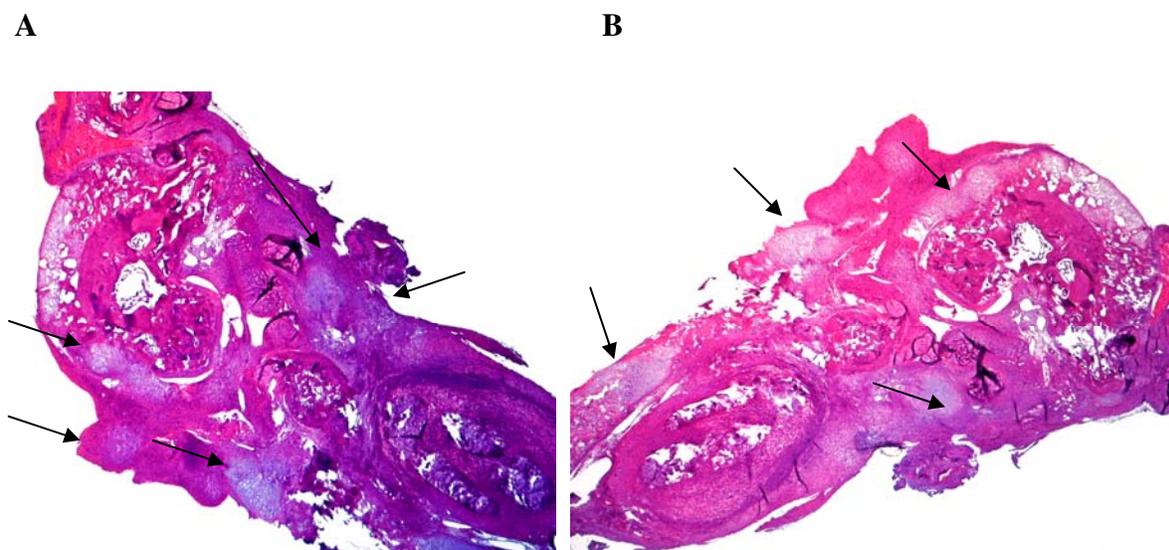
Os animais do grupo A receberam um total de 09 aplicações iontoforéticas com EACA no tornozelo da pata posterior direita, realizadas 2 horas, 24 horas e 48 horas após cada um dos 3 episódios de indução de hemartrose. O grupo B recebeu um total de 10 aplicações iontoforéticas com cloridrato de oxitetraciclina e o grupo C recebeu 10

aplicações iontoforéticas com ácido hialurônico, ambos no tornozelo da pata posterior direita realizadas diariamente (início do tratamento após o terceiro episódio de hemartrose) entre o 15° ao 24° dia do protocolo.

No 40° dia, cinco animais do grupo A, ou seja, EACA, cinco animais do grupo B tratados com cloridrato de oxitetraciclina, e oito animais do grupo C tratados com ácido hialurônico foram sacrificados para avaliação do tratamento empregado através de análise histológica da pata posterior direita (articulação da indução do trauma) e da pata posterior esquerda (articulação controle do próprio animal). Três animais dos oito animais do grupo A e C não puderam ser avaliados neste momento pois faleceram antes do período previsto por causa não determinada.

A avaliação histológica foi realizada através de dois examinadores, onde apenas um deles tinha conhecimento do grupo ao qual pertencia cada articulação analisada. Além disto foi realizada a digitalização das imagens de cada lâmina analisada, realizada de maneira dirigida, isto é, escolhemos a área onde detectamos as alterações mais exuberantes. Um mínimo de duas fotos de cada lâmina foram digitalizadas para análise (programa: Image J ® 1.36 b, National Institutes of Health, USA) dos valores médios de lesão encontrados.

No grupo A os valores médios encontrados da área de lesão proliferativa em cada uma das lâminas analisadas demonstraram que no animal 1, a área de lesão na articulação tratada com EACA foi de 88.372 pixels<sup>2</sup> e na articulação não tratada a área foi de 105.444 pixels<sup>2</sup>, no animal 2 observamos 121.171 e 125.324 pixels<sup>2</sup>, no animal 3: 128.672 e 116.458 pixels<sup>2</sup>, animal 4: 101.982 e 131.160 pixels<sup>2</sup> (figura 21), animal 5: 107.213 e 128.882 pixels<sup>2</sup> respectivamente (tabela 9). Observamos que apenas um camundongo (animal 3) apresentou maior área de lesão correspondente a articulação tratada do que na articulação controle. A análise estatística das médias das áreas de lesão proliferativa avaliadas histologicamente entre os grupos: tratado com EACA e não tratado, não evidenciou diferença estatisticamente significativa, embora a área de lesão tenha sido maior no grupo não tratado (109,48 pixels<sup>2</sup> ± 15.9 v 121,45 pixels<sup>2</sup> ± 10.5, média ± DP entre grupo tratado e não tratado respectivamente;  $P = 0,22$ ) (gráfico 4).

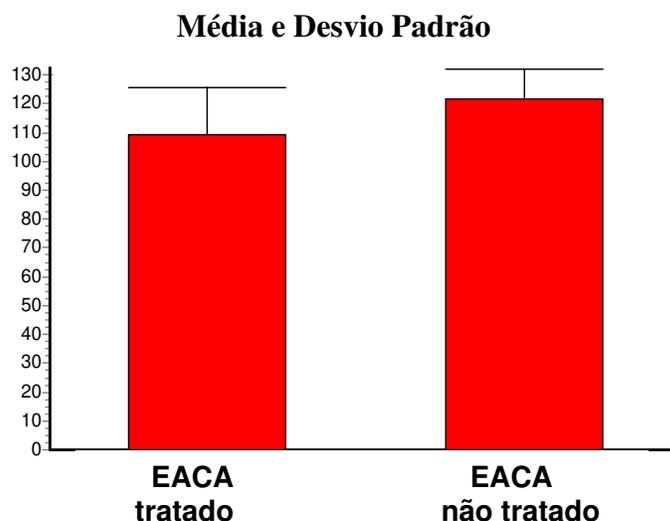


**Figura 21-** Lâminas do animal 4 do grupo submetido à iontoforese com ácido aminocapróico na articulação do tornozelo (aumento:16x). **A:** tornozelo do camundongo do grupo não tratado (área total de lesão. 131.160 pixels<sup>2</sup>) **B:** camundongo tratado (área total de lesão: 101.982 pixels<sup>2</sup>). As setas são referentes às áreas de maior lesão.

**Tabela 9-** Grupo A: camundongos tratados com EACA

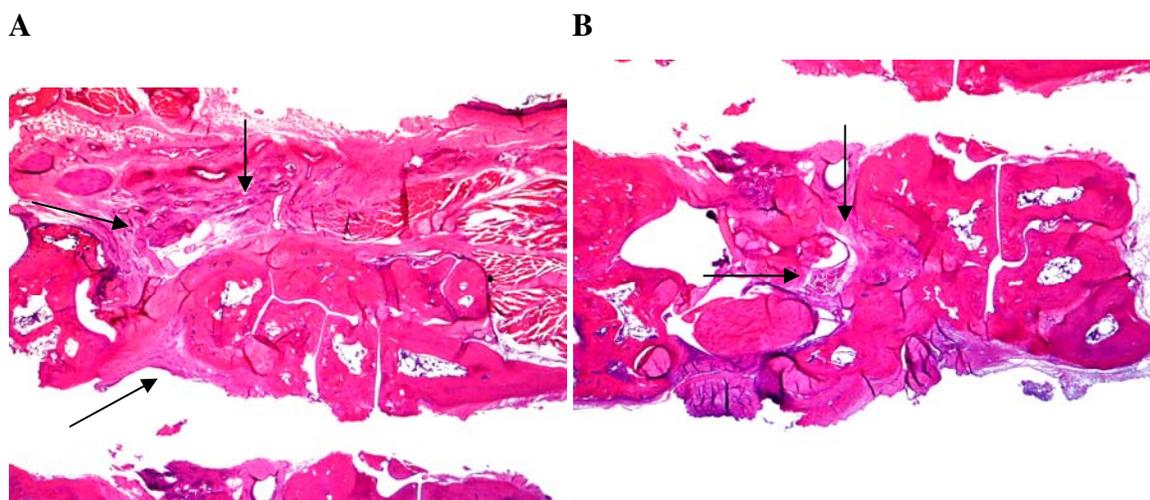
Animal	Tratado (pixels <sup>2</sup> )	Não tratado (pixels <sup>2</sup> )	
Média ± DP*	109,48 ± 15.9	121,45 ± 10.5	<i>P</i> = 0,22
1	88,372	105,444	
2	121,171	125,324	
3	128,672	116,458	
4	101,982	131,160	
5	107,213	128,882	

\*Média da área proliferativa dos 5 animais analisados. DP: desvio padrão



**Gráfico 4-** Análise das médias e desvio padrão correspondentes às áreas de lesão proliferativas entre os animais tratados e não tratados com EACA.

No grupo B foi possível analisar as articulações de todos os oito animais inicialmente incluídos neste grupo. Na figura 22 estão demonstradas as lesões encontradas em um dos animais pertencente a este grupo. Os valores médios encontrados da área de lesão proliferativa em cada uma das lâminas analisadas entre as articulações tratadas e não tratadas com cloridrato de oxitetraciclina está demonstrado na tabela 10. Entre os oito animais analisados, dois deles (animal 2 e 8) apresentaram a área de lesão proliferativa correspondente à articulação tratada maior do a área de lesão da articulação não tratada (tabela 10). Os outros seis animais apresentaram lesão menor quando a lesão foi tratada com cloridrato de oxitetraciclina. No entanto, as médias das áreas de lesão proliferativa avaliadas histologicamente das patas tratadas e não tratadas com cloridrato de oxitetraciclina não evidenciou diferença ( $131,74 \text{ pixels}^2 \pm 8,1$  v  $134,33 \text{ pixels}^2 \pm 8,8$ ; média  $\pm$  DP entre grupo tratado e não tratado respectivamente;  $P = 0,57$ ) (gráfico 5).

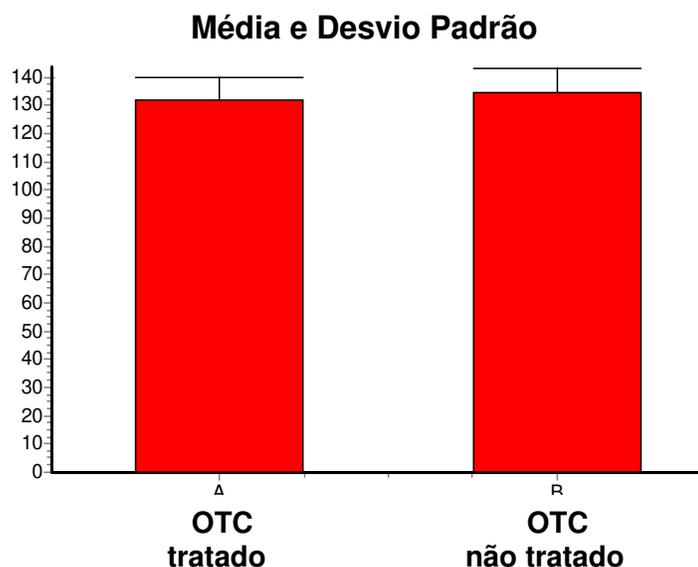


**Figura 22-** Lâminas do animal 5 do grupo submetido à iontoforese com cloridrato de oxitetraciclina (aumento:16x). **A:** Lâmina referente ao tornozelo do camundongo do grupo não tratado (área total de lesão 143.919 (pixels<sup>2</sup>) **B:** camundongo tratado (área total de lesão: 125.852 (pixels<sup>2</sup>). As setas são referentes às áreas de maior lesão.

**Tabela 10-** Grupo B: camundongos tratados com cloridrato de oxitetraciclina

Animal	Tratado (pixels <sup>2</sup> )	Não tratado (pixels <sup>2</sup> )	
Média ± DP*	131,74 ± 8,1	134,33 ± 8,8	<i>P</i> = 0,57
1	130.429	145.478	
2	147.831	119.214	
3	127.926	135.679	
4	131.235	132.473	
5	125.852	143.919	
6	132.820	135.850	
7	120.830	136.639	
8	136.977	125.371	

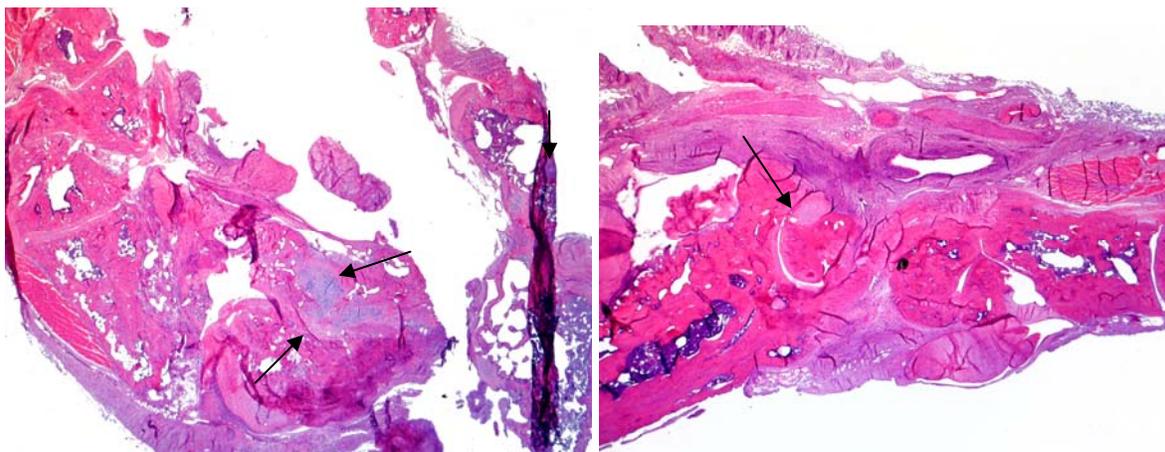
\*Média da área proliferativa dos 8 animais analisados. DP: desvio padrão



**Gráfico 5-** Análise das médias e desvio padrão correspondentes às áreas de lesão proliferativas entre os animais tratados e não tratados com cloridrato de oxitetracilina (OTC).

No grupo C foi possível analisar cinco dos oito animais inicialmente incluídos neste grupo. Na figura 23 estão demonstradas as lesões encontradas em um dos animais pertencente a este grupo. Os valores médios encontrados da área de lesão proliferativa em cada uma das lâminas analisadas entre as articulações tratadas e não tratadas com o ácido hialurônico, estão demonstrados na tabela 11.

Entre os cinco animais analisados, apenas um deles (animal 2) apresentou a área de lesão proliferativa correspondente à articulação tratada maior do a área de lesão da articulação não tratada (tabela 11). Os outros quatro animais apresentaram lesão menor quando esta foi tratada com o ácido hialurônico. No entanto, quando avaliadas as médias das áreas de lesão proliferativa das patas tratadas e não tratadas com ácido hialurônico não houve diferença ( $121,71 \text{ pixels}^2 \pm 15,1$  v  $130,48 \text{ pixels}^2 \pm 8,1$ ; média  $\pm$  DP entre grupo tratado e não tratado respectivamente;  $P = 0,15$ ) (gráfico 6).

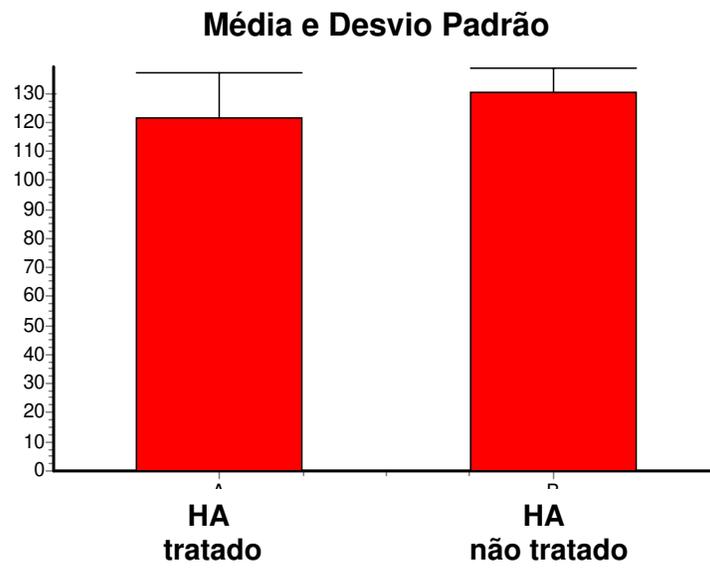
**A****B**

**Figura 23-** Lâminas do animal 3 do grupo submetido à iontoforese com ácido hialurônico (aumento:16x). **A:** Lâmina referente ao tornozelo do camundongo do grupo não tratado (área total de lesão 132,408 (pixels<sup>2</sup>) **B:** camundongo tratado (área total de lesão: 105,436 (pixels<sup>2</sup>). As setas são referentes às áreas de maior lesão.

**Tabela 11-** Grupo C: camundongos tratados com ácido hialurônico

Animal	Tratado (pixels <sup>2</sup> )	Não tratado (pixels <sup>2</sup> )	
Média ± DP*	121,71 ± 15.1	130.48 ± 8.1	<i>P</i> = 0,15
1	122,755	127,457	
2	146,128	143,732	
3	105,436	132,408	
4	114,619	122,793	
5	119,609	126,014	

\*Média da área proliferativa dos 5 animais analisados. DP: desvio padrão



**Gráfico 6-** Análise das médias e desvio padrão correspondentes às áreas de lesão proliferativas entre os animais tratados e não tratados com ácido hialurônico (HA).





## ***5- DISCUSSÃO***



A hemofilia é um distúrbio da coagulação resultante de uma deficiência congênita do FVIII (hemofilia A) ou do FIX (hemofilia B). As manifestações hemorrágicas mais freqüente na hemofilia são os episódios de sangramentos articulares, também chamados hemartroses. As articulações freqüentemente acometidas são os joelhos, tornozelos e cotovelos (Rodriguez-Merchan, 2002).

Os episódios recorrentes de hemartroses nesses pacientes levam progressivamente à degeneração da cartilagem articular e lesão proliferativa da sinóvia, resultando em dor e disfunção da articulação, situação que é conhecida clinicamente como artropatia hemofílica (Caviglia *et al.*, 2006).

A fisiopatologia da artropatia hemofílica é considerada multifatorial e inclui além da degeneração da cartilagem articular a reação inflamatória sinovial. A presença de sangue intra-articular causa uma alteração direta na cartilagem como resultado de uma reação catalítica devido à deposição de ferro, levando a apoptose dos condrócitos. Simultaneamente, a presença da hemossiderina promove uma reação sinovial, resultando uma lesão proliferativa (hipertrofia e hiperplasia) da sinóvia e neovascularização local (Roosendaal e Lafeber, 2006). Portanto, de certa forma a artropatia hemofílica apresenta o mesmo conceito de destruição degenerativa articular da osteoartrite, assim como o processo de reação inflamatória presente na artrite reumatóide.

Os episódios recorrentes de hemartroses levam à um ciclo vicioso: hemartrose ↔ sinovite crônica ↔ hemartrose. Como consequência há o desenvolvimento de uma patologia articular progressiva e incapacitante conhecida como artropatia hemofílica crônica (Valentino *et al.*, 2004). A artropatia é a causa mais importante de morbidade em pacientes hemofílicos (Rodriguez-Merchan, 2000).

Embora o tratamento principal utilizado na hemofilia seja a terapia de reposição, sabemos que é um tratamento de alto custo e que é ainda escasso na maioria dos países, sobretudo nos países em desenvolvimento. Qualquer intervenção adotada nesse sentido, isto é, através da terapia de reposição do concentrado de fator resulta em uma diminuição da prevalência da artropatia crônica (Fischer *et al.*, 2002). Todavia, isto não é capaz de conter a progressão do dano cartilaginoso (Hooiveld, 2003).

Em paralelo ao desenvolvimento de concentrados de fatores mais seguros e efetivos tem-se observado nas últimas décadas uma melhora sensível nas condições clínicas e na qualidade de vida dos pacientes hemofílicos. No entanto, estima-se que cerca de 80% desses pacientes não tenham acesso adequado ao tratamento (Rodriguez-Merchan *et al.*, 2000). Os cuidados ortopédicos especializados ainda são restritos a um pequeno número de hemofílicos, assim como a terapia de reposição profilática é uma realidade em apenas alguns países desenvolvidos.

Além da terapia de reposição, os procedimentos fisioterapêuticos têm sido imprescindíveis no tratamento e prevenção das lesões articulares em hemofílicos. Embora não seja possível determinar um procedimento fisioterapêutico único capaz de trabalhar esses aspectos. Há diversos protocolos que podem ajudar, como: indicação do uso de órteses (Stephensen, 2000; Querol-Fuentes *et al.*, 2000), crioterapia (Querol-fuentes e Lucea, 2002), hidroterapia (Tiktinsky e Barnatz, 2000), cinesioterapia (Hilberg *et al.*, 2001) e alguns recursos da eletroterapia (iontoforese, ondas curtas pulsado, ultra-som e estimulação nervosa transcutânea) (Higginbottom e Leckie, 2000). Todos esses procedimentos são extremamente úteis no controle e na prevenção das seqüelas articulares em hemofílicos, especialmente considerando o alto custo do tratamento de reposição (de demanda ou profilático).

Entretanto, as opções de tratamento disponíveis para o controle do grau de comprometimento articular na sua grande maioria são invasivas, isto é, muito agressivas, sobretudo quando falamos de condutas associadas a um bom prognóstico em hemofilia.

A sinoviórtese química ou radioativa é a principal opção de tratamento para a sinovite crônica associada a hemartroses recorrentes. No entanto, existem várias limitações envolvendo esse tipo de procedimento.

Embora os melhores resultados relacionados a sinoviórtese no tratamento da sinovite crônica para pacientes com hemofilia tenham sido obtidos com uso de radiofármacos (Rodrigues-Merchan, 2003), esse procedimento apresenta alguns inconvenientes, como a dificuldade e os cuidados relacionados à manipulação dos produtos radioativos, seu alto custo e baixa disponibilidade em diversos locais. Além disso, há riscos

potenciais da utilização desses produtos, sobretudo na faixa etária pediátrica, na qual se encontra a maioria dos pacientes com maior potencial de melhora com esse procedimento. Recentemente foram relatados dois casos de leucemia observados em crianças hemofílicas que haviam recebido tratamento de radiosinoviórtese com fósforo, P32 (Dunn, 2005). Assim, embora esse procedimento tenha consideráveis benefícios, diversas questões de segurança e factibilidade ainda devem ser consideradas.

A sinoviórtese química por sua vez representa um tratamento mais seguro e disponível. No entanto, seus efeitos benéficos apenas são observados após várias aplicações intra-articulares, além de ser um procedimento extremamente doloroso e necessitar de reposição de fator devido seu caráter invasivo.

Nesse contexto acreditamos que a sinoviórtese química pode ser ainda uma boa alternativa no controle da sinovite crônica em pacientes hemofílicos, sobretudo se for possível o controle dos principais inconvenientes relacionados a sua baixa efetividade, como a necessidade de múltiplas punções dolorosas.

O objetivo desse estudo foi avaliar e discutir outras modalidades terapêuticas na hemofilia que permitissem uma intervenção direta no quadro agudo de hemartrose e na sinovite crônica através de métodos não invasivos. Para tanto elegemos a iontoforese como terapêutica coadjuvante no transporte intra-articular de fármacos.

Entre os procedimentos fisioterapêuticos, a iontoforese destaca-se como opção de tratamento por promover a indução medicamentosa de maneira não invasiva, utilizando-se para tanto, as propriedades da corrente galvânica. A corrente galvânica caracteriza-se por criar um campo eletrostático unidirecional constante entre os eletrodos, permitindo dessa forma transmissão ininterrupta da medicação (Ciccione, 2001).

O emprego da iontoforese corrobora a idéia de intervenção direta nos quadros agudos de hemartrose e na sinovite crônica, na medida em que propõe diminuição de efeitos colaterais sistêmicos; permitindo a ação localizada dos medicamentos administrados, de forma mais efetiva e prolongada (Guirro e Guirro, 1996). O uso de fármacos com poder hemostático durante os episódios agudos de hemartrose, além do

tratamento da sinovite crônica, permitem a longo e curto prazo uma recuperação mais rápida da articulação, além de otimizar o consumo final de hemoderivados ou qualquer outra forma de reposição de fator.

Embora a iontoforese seja um método amplamente descrito na literatura, seu uso clínico ainda encontra-se limitado. Tal fato pode ser justificado pelo não conhecimento das características físico-químicas das drogas passíveis de serem utilizadas por via iontoforética, bem como a necessidade de padronização do método ao modelo de estudo escolhido.

Com o intuito de avaliarmos a aplicabilidade da iontoforese através da comprovação do seu mecanismo de ação, desenvolvemos e padronizamos em colaboração com os profissionais do Departamento da Medicina Nuclear do Hospital das Clínicas da Unicamp alguns experimentos cintilográficos que avaliaram dinamicamente a capacidade do transporte transdérmico pela iontoforese. O protocolo foi realizado com voluntários sadios, que após avaliação física e radiológica mostraram-se aptos para o estudo. Os experimentos demonstraram através da captura de imagens em tempo real, pela câmera de cintilação, a absorção do material aplicado por via iontoforética (que foi detectado na tireóide, paredes do estômago e bexiga), comprovando o mecanismo que viabiliza a penetração de drogas por meio da corrente galvânica através da pele e demonstrando da mesma forma que não há penetração passiva do fármaco utilizado.

Comprovado o mecanismo de transmissão transdérmica de drogas através da iontoforese, a etapa seguinte consistiu na escolha das drogas utilizadas no estudo. A mesma baseou-se na facilidade e disponibilidade dos fármacos para uso rotineiro em planos de tratamento.

Existem poucas alternativas, além da terapia de reposição do fator, para o controle dos quadros agudos de hemartrose em pacientes hemofílicos. Nesse estudo, nossa sugestão foi avaliar o uso adjuvante dos antifibrinolíticos administrados com essa finalidade. Embora haja poucos relatos na literatura sobre o benefício desses fármacos quando administrados para o controle das hemartroses, esse grupo de medicamentos são potencialmente úteis, uma vez que sua ação hemostática local é amplamente observada em

diversas situações. Tais medicamentos são utilizados na maioria das vezes como terapêutica adjuvante, sua ação local é observada em especial nas mucosas, em situações associadas ou não a distúrbios hemorrágicos.

Em hemofílicos o uso combinado dos agentes antifibrinolíticos e dos concentrados de fator VIII ou IX parece apresentar riscos mínimos de complicações trombóticas. No entanto, o uso sistêmico de antifibrinolíticos associado aos produtos *bypass*, como os concentrados protrombínicos (CP) e concentrados protrombínicos parcialmente ativados (CPPa), utilizados, sobretudo em hemofílicos com inibidor, é desaconselhado pelo risco aumentado de complicações trombóticas e mesmo do desenvolvimento de coagulação intravascular disseminada (CIVD) (Green, 1999).

Para o tratamento da sinovite crônica optamos por drogas utilizadas na sinoviórtese química que tivessem características que possibilitassem o protocolo iontoforético (facilidade de aquisição e disponibilidade de apresentação na forma líquida).

O cloridrato de oxitetraciclina conforme descrito anteriormente é um antibiótico derivado da tetraciclina com ação bacteriostática (Goodman e Gilman, 2003). O cloridrato de oxitetraciclina quando utilizado intra-articular causa um efeito fibrótico da membrana sinovial com menor formação de vasos locais (Fernandez-Palazzi *et al.*, 2004).

O ácido hialurônico induz a melhora da fluidez e da viscoelasticidade do líquido sinovial por meio da ativação da regeneração tecidual na cartilagem comprometida (Fernandez-Palazzi *et al.*, 2002). Como conseqüência, o ácido hialurônico leva indiretamente a efeitos analgésicos e antiinflamatórios em pacientes com comprometimento articular, como acontece nos casos das osteoartrites e em algumas lesões encontradas em pacientes hemofílicos (Athanasassiou-Metaxa *et al.*, 2002; Roosendaal *et al.*, 1999).

Posteriormente à escolha das drogas que pudessem ser administradas por via iontoforética, foi necessário estabelecer e padronizar métodos que permitissem avaliar os parâmetros necessários para sua aplicação (como dose e polaridade), além de avaliar a eficácia desses fármacos quando aplicados por iontoforese durante episódios de hemartrose aguda e para tratamento da sinovite crônica hemofílica.

Além disso, a forma de apresentação da substância é um pré-requisito essencial para viabilizar a administração de drogas por via iontoforética. A apresentação das substâncias refere-se ao estado como a droga está disponível, ou seja, apenas quando os fármacos estão em estado líquido é possível haver interação e dissociação iônica (drogas disponíveis em cápsulas ou comprimidos, não poderiam em um primeiro momento, serem aplicadas por essa via).

Para a determinação da polaridade das drogas utilizadas em nosso estudo, assim como para avaliar a presença e concentração das drogas no líquido sinovial e no soro após sua aplicação iontoforética, foi necessário a padronização de um protocolo experimental, tendo sido escolhido o modelo utilizando suínos. Essa escolha foi baseada em dados da literatura, uma vez que, estudos anteriores utilizaram esse modelo em protocolos de aplicação transdérmica, sobretudo por características da pele desses animais (Pannus *et al.*, 1999; Riviere e Papich, 2001). Além disso, devido ao padrão anatômico e fisiológico desses animais, é possível a coleta de líquido sinovial que permita a análise necessária após a realização do procedimento iontoforético articular.

Os primeiros experimentos foram realizados com suínos pesando aproximadamente 20 kg. Mas devido à dificuldade para obtenção de quantidade suficiente de líquido sinovial coletado no mesmo experimento em tempos diferentes (aos 20 minutos durante o experimento e ao término do experimento, aos 40 minutos) passamos a utilizar porcos maiores, com cerca de 40 kg.

Outra questão avaliada para a padronização do protocolo de aplicação iontoforética em suínos foi em relação à articulação escolhida. Considerando que o joelho representa uma das maiores articulações sinoviais do corpo humano, inicialmente o local das aplicações iontoforéticas no protocolo suíno foi a articulação do joelho. No entanto, apesar de trabalharmos com animais maiores, continuávamos com dificuldade de obter volumes adequados de líquido sinovial dessa articulação. Entretanto, analisando a biomecânica articular de suínos, observamos que a articulação que o animal mais usa durante sua deambulação é a articulação do tornozelo, isto é, as maiores amplitudes de flexão e extensão necessárias durante a marcha são realizadas nesse animal pela articulação do tornozelo e como o movimento articular desempenha função primordial na lubrificação

da articulação, o tornozelo por sua vez, tem nesses casos, quantidade maior do líquido sinovial. Conseqüentemente, o protocolo de aplicação iontoforética em suínos foi padronizado na articulação do tornozelo. Além disso, cuidado especial foi dado ao risco de contaminação do líquido sinovial com sangue. Este fato ocorreu em algumas ocasiões em decorrência das repetidas punções. Havendo contaminação do líquido sinovial com sangue, as amostras foram desprezadas e o experimento foi repetido.

As análises para a determinação da presença e concentração de fármacos em amostras de soro e líquido sinovial, foram realizadas por meio da técnica de espectrometria de massas. Essa análise dependeu da padronização prévia de cada fármaco individualmente, através da leitura de picos de intensidade (m/z). Além disso, através de diluições seriadas de uma amostra padrão conhecida, foi possível realizar a determinação posterior da concentração dessas drogas nas amostras analisadas.

A determinação da polaridade das drogas é uma variável essencial para sua administração por via iontoforética (Riviere e Papich, 2001; Panchagnula *et al.*, 2000; Helmstadter, 2001; Wang *et al.*, 2003; Prausnitz *et al.*, 2004). Entretanto, a polaridade das drogas não é uma informação facilmente obtida, visto que geralmente a farmacopéia descreve tais características apenas do princípio ativo da droga e não de forma global associando todos os componentes da fórmula, tais como solventes e diluentes. Nesse estudo a determinação da polaridade das drogas foi realizada a partir da análise da presença desses fármacos em amostras de soro através da técnica de espectrometria de massas, após aplicação iontoforética das mesmas quando aplicadas no pólo positivo ou negativo.

Após a elucidação da polaridade de cada fármaco (positivo para EACA e cloridrato de oxitetraciclina e negativo para ácido hialurônico), foi possível a administração dessas drogas por via iontoforética. Esses experimentos demonstraram a concentração das drogas utilizadas no soro e no líquido sinovial.

No protocolo de aplicação iontoforética do EACA em suínos, a média das concentrações obtidas no soro foi de  $0,04 \pm 0,03$  ng/ml e no líquido sinovial:  $0,08 \pm 0,01$  ng/ml ( $P=0,1$ ). Dessa maneira, podemos observar que, conforme esperado, as concentrações obtidas no soro suíno foram inferiores às obtidas no líquido sinovial desses

animais após sua aplicação iontoforética. Portanto, na aplicação iontoforética articular dessa droga seus efeitos sistêmicos estarão diminuídos, o que pode representar uma vantagem evitando possíveis eventos adversos da droga.

Dados na literatura revelam que a concentração terapêutica de EACA necessária para inibição da fibrinólise sistêmica varia entre 100 e 400 µg/ml da droga no plasma (Moffat *et al.*, 1986). No entanto, a dose terapêutica determinada é referente à concentração plasmática e não a dose necessária para ação local (no caso a concentração da droga no líquido sinovial). Embora nesse estudo a concentração de EACA encontrada no soro dos suínos durante protocolo de aplicação iontoforética tenha sido inferior ao descrito como dose terapêutica, é possível que haja benefícios devido a maior concentração observada no local de ação desejado, ou seja, intra-articular.

Embora não tenha sido objetivo do presente estudo analisar a dose terapêutica necessária (via iontoforese) de EACA, realizamos um experimento utilizando camundongos hemofílicos submetidos à lesão articular (hemartrose) e posterior tratamento iontoforético com EACA para avaliar a resposta terapêutica articular.

No protocolo de aplicação iontoforética de cloridrato de oxitetraciclina em suínos, observamos que a média da concentração da droga no líquido sinovial foi menor quando comparada às amostras de soro ( $3,41 \pm 1,16$  µg/ml e  $5,88 \pm 0,19$  µg/ml respectivamente,  $P=0,02$ ). Concentrações semelhantes foram observadas em estudos com aplicação endovenosa e intramuscular em suínos (El Korchi *et al.*, 2001).

Na literatura é descrita uma ampla faixa de concentração plasmática em humanos, observada em diversos indivíduos quando o cloridrato de oxitetraciclina é administrado por via oral (Goodman e Gilman, 2003). Após 2 a 3 horas da administração oral de uma dose única de 500 mg do cloridrato de oxitetraciclina as concentrações plasmáticas observadas foram de 1,2 a 3,4 µg/ml (média de 2,1 µg/ml) (Moffat *et al.*, 1986). Além disso, foi descrito que as concentrações do cloridrato de oxitetraciclina no líquido sinovial e na mucosa do seio maxilar assemelham-se às observadas no plasma humano (Goodman e Gilman, 2003). É importante salientar que essas concentrações referem-se ao efeito antibacteriostático da droga. No nosso estudo, o efeito desejado da

oxitetraciclina é a fibrose do plexo sinovial hipertrófico encontrada na artropatia hemofílica. Os estudos clínicos que utilizaram este fármaco intra-articular mostraram vantagens tais como: baixo custo, efeito terapêutico imediato e curto período de tratamento (Fernandez-Palazzi *et al.*, 2004). Em nenhum desses estudos é relatado a quantificação simultânea do fármaco em plasma para avaliar efeitos colaterais sistêmicos.

O protocolo de aplicação iontoforética em suínos utilizando o ácido hialurônico foi realizado, porém não foi possível a análise quantitativa da droga nas amostras de soro e líquido sinovial devido à inexistência de métodos na literatura para determinação quantitativa de tal analito, visto que existem vários íons que compõe esse grande molécula.

O ácido hialurônico é um polissacarídeo que contém de quatro a doze unidades/açúcar (Kuhn *et al.*, 2003). A identificação e a análise isolada de apenas um íon nas amostras do experimento poderia induzir a resultados falso-positivos, uma vez que o fenômeno de supressão iônica altera e mimetiza a leitura dos compostos. Dificuldade adicional foi observada na tentativa de encontrar nas amostras, os mesmos picos de identificação da droga encontrados na leitura dos íons previamente identificados na caracterização da droga. Mesmo após métodos de purificação das amostras, pois as mesmas apresentavam excessiva quantidade de sais, o que faz com que os sinais sejam suprimidos no espectrômetro de massas, não foi possível o estabelecimento de parâmetros comparativos. Tal fato pode ser justificado pelo fenômeno de supressão iônica, que faz com que cada substância apresente uma resposta diferencial quando determinada, isto é, como o ácido hialurônico é um grande mucopolissacarídeo, a supressão iônica entre os vários íons da substância quando analisada nas amostras, mascarou a identificação isolada de tais íons. Para a quantificação das amostras, novas metodologias de estudo precisam ser elaboradas.

Mesmo com as dificuldades encontradas no protocolo suíno, os dados obtidos foram favoráveis à continuidade da avaliação do comportamento das drogas. Em virtude disso, elaboramos um desenho de estudo para análise da resposta terapêutica das drogas anteriormente descritas, em protocolo murino. Esses camundongos hemofílicos obtidos por técnicas de engenharia genética e gentilmente doados ao nosso laboratório de Hemostasia do Hemocentro da UNICAMP pela Profa Dra Katherine High (*The Children's Hospital of Philadelphia*) abriram perspectivas de estudo possibilitando a realização de grupos de pesquisa no Brasil com esse tipo de animal.

Para analisar a resposta terapêutica em decorrência da hemartrose e nos quadros de sinovite crônica em camundongos hemofílicos foi necessária a indução de trauma que mimetizasse a situação clínica correspondente. Com esse objetivo elaboramos inicialmente um sistema composto de um aparato com molas capaz de induzir quadros traumáticos que causassem sangramento articular no joelho desses camundongos hemofílicos. Apesar da literatura descrever esse tipo de trauma articular (Valentino *et al.*, 2004; Hakobyan *et al.*, 2005), não foi possível em nosso grupo piloto reproduzir a hemartrose de forma sistemática através desse sistema. Durante o uso do sistema de molas, observamos que mesmo com a aplicação de força compressiva na articulação superior ao peso corpóreo do próprio animal, não era suficiente para desencadear a hemartrose.

Para tanto, foi desenvolvido outro aparato mecânico através de um sistema de pesos cuja função foi a indução de hemartrose na articulação do joelho em modelo murino de forma controlada e padronizada. Todavia, observamos que o trauma aplicado na articulação do joelho era acompanhado pelo desenvolvimento de sangramentos musculares importantes, com complicações que na maioria das vezes levaram o animal ao óbito. O quadro de sangramento na musculatura adjacente à articulação do joelho era mais evidente e incapacitante do que a própria hemartrose. Em virtude disso, optamos pela indução de hemartrose na articulação do tornozelo dos camundongos hemofílicos. Foram então formados novos grupos pilotos para a otimização e padronização do trauma ideal para a articulação proposta. Dessa forma, o comprometimento articular foi sempre mais importante que possíveis sangramentos musculares simultâneos, quando o trauma foi aplicado na articulação do tornozelo.

Posteriormente, elaboramos um desenho de estudo formado por 24 camundongos hemofílicos divididos ao longo do processo em três grupos que passaram por três episódios de indução de hemartrose, sendo: grupo A: 08 camundongos que receberam aplicação iontoforética com EACA após cada episódio de indução de hemartrose; grupo B: 08 camundongos que foram tratados com cloridrato de oxitetraciclina, após o estabelecimento da lesão crônica resultante dos três episódios de hemartrose; grupo C: 08 animais que receberam aplicação iontoforética com ácido hialurônico, também após ocorrência da lesão crônica. Portanto, esses grupos simularam diferentes situações clínicas,

isto é: o grupo A foi um modelo de tratamento para o quadro agudo de hemartrose e os grupos B e C para o tratamento da sinovite crônica. Dessa maneira foi possível estabelecer um modelo para a avaliação da resposta terapêutica articular após a aplicação iontoforética das drogas propostas nesse estudo.

Embora em nenhum dos grupos estudados, os resultados observados entre os animais tratados e não tratados tenham evidenciado uma diferença estatisticamente significativa, foi possível notar uma tendência de melhora sempre que as medicações foram administradas através da iontoforese. Isso foi possível pela análise da área de lesão proliferativa correspondente à articulação tratada e não tratada.

No grupo A que recebeu aplicações iontoforéticas com EACA para tratamento do quadro agudo de hemartrose, a média das áreas de lesão proliferativa da articulação tratada e não tratada foi de  $109,48 \pm 15,9$  e  $121,45 \pm 10,5$  pixels<sup>2</sup> respectivamente ( $P=0,22$ ). Embora não haja significância estatística notamos que sempre houve a tendência de melhora na articulação que recebeu as aplicações iontoforéticas. Mesmo tendo observado as diferenças nas concentrações séricas da droga quando aplicadas no protocolo suíno, em relação às concentrações plasmáticas descritas na literatura, notamos que houve diminuição da área de lesão quando comparamos a articulação tratada com o EACA em relação a que não recebeu tratamento iontoforético.

No grupo de camundongos hemofílicos tratados com ácido hialurônico, a média das áreas de lesão proliferativa foi de  $121,71 \pm 15,1$  na articulação tratada e  $130,48 \pm 8,1$  pixels<sup>2</sup> na articulação não tratada ( $P = 0,15$ ). Apesar da aplicação iontoforética em suínos utilizando o ácido hialurônico, ter sido realizada, não foi possível, como descrito anteriormente, a análise quantitativa da droga nas amostras de soro e líquido sinovial dos animais. Mesmo sem os recursos quantitativos disponíveis para avaliar a concentração dessa droga no soro e no líquido sinovial, foi comprovado em etapas anteriores que o ácido hialurônico é uma substância que pode ser administrada por via iontoforética, de acordo com os dados qualitativos previamente obtidos. Sendo assim, mesmo sem o protocolo de padronização da utilização da droga ter sido concluído o emprego do ácido hialurônico atuou como mais um recurso para o tratamento da sinovite crônica (artropatia hemofilia) apesar de observarmos que nesse grupo não houve diferença estatisticamente significativa durante a avaliação da resposta terapêutica.

Resposta semelhante foi observada no grupo que recebeu as aplicações iontoforéticas com o cloridrato de oxitetraciclina, onde a média de lesão proliferativa foi de  $131,74 \pm 8,1$  na articulação que recebeu as aplicações e  $134,33 \pm 8,8$  pixels<sup>2</sup> referente à articulação controle ( $P = 0,57$ ).

Nesse sentido, acreditamos que novos estudos responderão questões levantadas a partir da análise dos resultados apresentados nesse estudo, envolvendo todos os grupos submetidos a iontoforese com as diferentes drogas. Essas questões abrangem hipóteses tais como: será que com o aumento do número de animais poderíamos observar resposta terapêutica diferente e mais fidedigna às situações clínicas estudadas? Ou ainda: considerando que a iontoforese utiliza as propriedades da corrente galvânica para a indução medicamentosa, será que, mesmo sem que a droga tenha atingido concentração necessária para ação terapêutica a própria corrente galvânica tenha induzido a resposta terapêutica observada? O galvanismo por si só também pode influenciar a resposta clínica? Sendo assim, acreditamos que desenhos de estudo abrangendo grupos de animais que receberem tratamento iontoforético e outros que só receberem as aplicações da corrente galvânica possam correlacionar dados para análise e avaliação do nível de melhora em relação às áreas de lesão proliferativa através da corrente utilizada com a droga e sem a droga.

Outro fator que também merece atenção encontra-se em meios para minimizar os efeitos protetores da epiderme. A principal barreira do transporte transdérmico encontra-se na baixa permeabilidade da epiderme, a camada mais externa da pele que limita a passagem transdérmica de muitas drogas (Scheuplein & Blank, 1971). A pele é o maior órgão do corpo; atinge aproximadamente uma área de  $2\text{m}^2$  e recebe cerca de um terço do suprimento sanguíneo corpóreo (Wang *et al.*, 2003). A epiderme é composta por aproximadamente 20% de água, enquanto que muitos tecidos têm 70% (Guyton e Hall, 2000). Isso aumenta a barreira de prevenção da passagem de água e substâncias iônicas através da pele; a iontoforese atua como facilitadora do transporte dessas substâncias para o interior dos tecidos.

Diferentes acessos físicos (Marro *et al.*, 2001; Denet *et al.*, 2003; Uitto & White 2003) e químicos (Finin e Morgan, 1999; Conjeevaram *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003) têm sido desenvolvidos a fim de ultrapassar a barreira da pele e ter melhor controle do transporte da droga através da pele.

O uso de aditivos químicos, que são substâncias empregadas na pele previamente ao tratamento iontoforético ou juntamente com a administração da droga (Prausnitz *et al.*, 2004; Akimoto e Nasase, 2003), pode ser uma alternativa no aumento da penetração do cloridrato de oxitetraciclina em locais mais profundos, tal como o líquido sinovial. Essas substâncias interferem no fluxo, retenção e difusão das drogas aplicadas transdermicamente, pois afetam as propriedades da barreira da pele (Rosado *et al.*, 2003), no entanto, altas concentrações desses potencializadores devem ser evitadas, pois podem desencadear quadros importantes de irritação na pele, o que os tornam fisiologicamente incompatíveis (Kanikkannan *et al.*, 2000).

A terapia combinada da iontoforese e da eletroporação (Denet *et al.*, 2003) também poderia produzir um efeito sinérgico no transporte transdérmico da oxitetraciclina. A iontoforese emprega corrente elétrica de baixa densidade (0,1 a 0,5 mA/cm<sup>2</sup>) aplicada por um período relativamente longo (minutos à horas). A eletroporação consiste na aplicação de curtos (100 us a menos de 1 segundo) pulsos de alta voltagem (de 100 a 1000 V) (Pikal, 2001; Kim *et al.*, 1993). Devido às diferenças entre os mecanismos de ação da eletroporação e da iontoforese, estudos que combinem essas duas forças elétricas poderiam padronizar protocolos de tratamento com as drogas utilizadas nesse estudo a fim de potencializar o uso dessas substâncias via iontoforese.

Em virtude do grande número de questões elucidadas no decorrer do estudo e levando em conta um número ainda maior de informações que precisam ser levantadas e discutidas é imprescindível a realização de estudos complementares para se obter efetividade na prática clínica da iontoforese com as drogas estudadas bem como através da utilização de outras drogas, uma vez que o processo de padronização já está estabelecido.

Nos últimos vinte anos, observamos uma explosão na criação e descoberta de novas substâncias na medicina. As inovações descritas na literatura no avanço dos sistemas de administração de drogas, têm sido não só capazes de implementar grande parte dos novos agentes farmacológicos, como também permitir o desenvolvimento de novas opções de tratamento com as drogas já existentes (Prausnitz *et al.*, 2004), proporcionando dessa forma redução do tempo de recuperação e melhora das condições clínicas.



## ***6- CONCLUSÕES***



De acordo com os objetivos inicialmente propostos neste estudo, foi possível concluir que:

Objetivo 1. Avaliação do transporte transdérmico através da administração de fármacos por via iontoforética

- Através da análise dinâmica da aplicação iontoforética de radiofármacos em joelho de indivíduos saudáveis, foi possível comprovar a eficiência desta via de administração de fármacos. Embora a iontoforese seja uma técnica utilizada por vários anos, não encontramos na literatura nenhum relato de avaliação dinâmica através da captura de imagens cintilográficas.

Objetivo 2. Padronização e análise, através de modelo experimental suíno, da aplicação iontoforética de fármacos com potencial uso nos episódios agudos de hemartrose e na artropatia hemofílica.

- Através do estudo experimental em suínos foi possível realizar a análise qualitativa dos fármacos: EACA, cloridrato de oxitetraciclina e ácido hialurônico no líquido sinovial. Já a análise quantitativa foi possível apenas durante a utilização do EACA e do cloridrato de oxitetraciclina.
- A avaliação do ácido hialurônico através do estudo experimental suíno de aplicação iontoforética não pode ser conclusiva. Este fármaco é utilizado exclusivamente intra-articular, não sendo possível nenhuma outra via de administração. No entanto, em modelo experimental não foi possível a quantificação pela espectrometria de massa deste fármaco, embora tenha sido possível a identificação da presença do ácido hialurônico em todas as amostras séricas e de líquido sinovial analisadas.

Objetivo 3. Avaliação do efeito da aplicação iontoforética dos fármacos: EACA em hemartrose aguda; ácido hialurônico e cloridrato de oxitetraciclina na sinovite crônica, no modelo experimental murino (camundongos *knockout* portadores de hemofília A).

Embora, em nenhum dos grupos estudados os resultados entre os animais tratados e não tratados tenham evidenciado uma diferença estatisticamente significativa, foi possível notar uma tendência de melhora sempre que as medicações foram administradas através da iontoforese. Essa baixa resposta pode ser em consequência do número reduzido de animais, além da dificuldade em padronizar o modelo ideal de indução do trauma necessário para o desenvolvimento da artropatia hemofílica.



## ***7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***



Akimoto T, Nagase Y. Novel transdermal drug penetration enhancers: synthesis and enhancing effect of alkyldisiloxane compounds containing glucopyranosyl group. **J. Control. Rei.** 2003; 88: p. 243-52.

Arnold W D, Hilgartner M W. Hemophilic arthropathy. Current concepts of pathogenesis and management. **J. Bone Joint Surg.** (Am) 1977; 59: 287-305.

Athanassiou-Metaxa M, Koussi A, Economou M, Tsagias I, Badouraki M, Trachana M, Christodoulou. Chemical synoviorthesis with rifampicin and hyaluronic acid in haemophilia children. **Haemophilia.** 2002; 6: p. 815-16.

Ayral X. Chemical synoviorthesis with osmic acid in haemophilia. **Haemophilia.** 2001; 7: p. 20-25.

Bi L, Sarkar R, Naas T, Lawler A, Pain J, Shumaker S, Bedian V, Kazazian Jr HH. Further characterization of factor VIII-deficient mice created by gene targeting: RNA and protein studies. **Blood.** 1996; 88: 3446-50.

Bithell T C. Distúrbios Hereditários da Coagulação. In: Lee, G R; Bithell, TC; Foester, J; Athens, JW; Lukens, JM. **Wintrobe – Hematologia Clínica.** vol.II, ed. Manole. 1998; p.1562-616.

Brettler D B, Levine PH. Clinical manifestations and Therapy of inherited coagulation factor deficiencies. In: Colman, R W; Hirsh, J; Marder, V J; Clowes, A W; George, J N. **Haemostasis and Thrombosis. Basics principles and clinical practice.** Fourth Edition. Ed. Lippincott Williams & Wilken. 2001; p. 815-20.

Caviglia H. Tissue engineering in musculoskeletal problems related to haemophilia. **Haemophilia.** 2006; 3: p.122-7.

Caviglia H A, Fernandez-Pallazzi F, Galatro G, Perez-Bianco R. Chemical synoviorthesis with rifampicin in haemophilia. **Haemophilia.** 2001; 7: p. 26-30.

Ciccione, C D. Iontoforese. In: Robinson, A J; Mackler, L.S. Eletroterapia e Teste Eletrofisiológico. **Eletrofisiologia Clínica.** 2.<sup>a</sup> ed. Ed. Artmed. 2001; p.297-317.

Conjeevaram R, Chaturvedula A, Betageri G V, Sunkara G, Banga A K. Iontophoretic in vivo transdermal delivery of  $\beta$  blockers in hairless rats and reduced skin irritation by liposomal formulation. **Pharmaceutical Research**. 2003; 20: p.1496-1501.

Denet A R, Ucakar B, Preat V. Transdermal Delivery of Timolol and Atenolol using electroporation and iontophoresis in combination: A Mechanistic Approach. **Pharmaceutical Research**. 2003; 20: p.1946-51.

Dimichele D, Neufeld E J. A New Approach to an Old Disease **Hematology / Oncology Clinics of North America. Hemophilia** –. 1998; 12: p.1315-44.

Dunn A L, Manco-Johnson M, Busch M T, Balark K L, Abshire T C. Leukemia and P32 radionuclide synovectomy for hemophilic arthropathy. **J Thromb Haemost**. 2005; 7: p. 1541-2.

Eberlin M N, Rocha L R, Araújo A. *Analyst* to be submitted; (b) P. Mauri MMinaggio, P Simonetti, C Gardana and P Pietta. **Rapid Commun. Mass Spectrom**. 2002; 16: 743.

Eickhoff H H, Raderschadt G, Koch W, Brackmann H H. Control of the synovium in haemophilia. **Haemophilia**. 1998; 4: p. 511-513.

El Korchi G, Prats C, Arboix M, Pérez B. Disposition of oxytetracycline in pigs after i.m. administration of two long-acting formulation. **J. Vet. Pharmacol. Therap**. 2001; 24: 247-250.

Fernandez-Palazzi F, Capetillo G, Caviglia H, Bernal R, Da Rocha Loures Pacheco L. Multicentric study on oxytetracycline clorhydrate as a new material for chemical synovectomy: medium term follow up. In: 8<sup>th</sup> Congress of the Musculoskeletal Committee of the WFH. Bonn, Germany – 28 to 31 May 2003. **Haemophilia**. 2004; 10: 102-113.

Fernandez-Palazzi F, Viso R, Boadas A, Ruiz-Sàez A, Caviglia H, Blumenfeld De Bosch N. Intra-articular hyaluronic acid in the treatment of haemophilic chronic arthropathy. **Haemophilia**. 2002; 8: 375-381.

Fernandez-Palazzi F, Caviglia H. On safety of synoviorthesis in haemophilia. **Haemophilia**. 2001; 7: p. 50-53.

Fernandez-Palazzi F. Treatment of acute and chronic synovitis by non-surgical means. **Haemophilia**. 1998; 4: p. 518-23.

Fischer K, Van den Berg H M, Thomas R, Kumar S et al. Dose and outcome of care in haemophilia--how do we define cost-effectiveness? **Haemophilia**. 2004; 4: p. 216-20.

Finnin C B, Morgan M T. Transdermal penetration enhancers: applications, limitations and potential. **J. Pharm Sci**. 1999; 88: p. 955-968.

Gilbert M S, Cornwall R. The history of synoviorthesis in haemophilia. **Haemophilia**. 2001; 7: p. 3-5.

Goodman L S, Gilman A G. Fármacos Antimicrobianos. **As bases farmacológicas da terapêutica**. In: Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2003; 741-46.

Green D. Complications associated with the treatment of haemophiliacs with inhibitors. **Haemophilia**. 1999; 3: p. 11-7.

Guirro E C O, Guirro, R R J. Recursos Fisioterápicos. In: Guirro, E C O; Guirro, R R J. **Fisioterapia em Estética: Fundamentos, Recursos e Patologias**. 2ª.ed. São Paulo. Manole. 1996. p.97-107.

Guyton A C, Hall J E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Guanabara Koogan. 9ª ed. 1997; p. 41-48.

Hakobyan N, Kazarian, T, Valentino, L A. Synovitis in a murine model of human factor VIII deficiency. **Haemophilia**. 2005; 11: p. 227-232.

Hakobyan N, Kazarian T, Jabbar A A, Jabbar K J, Valentino L. Pathobiology of hemophilic synovitis I: overexpression of mdm2 oncogene. **Blood**. 2004; 104: Number 7.

Hawan Su M, Srinivasan V; Ghanem AH; Higuchi WI. Quantitative in vivo iontophoretic studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. 1994; 83: p. 12-7.

Heim M. The treatment of intra-articular synovitis by the use of chemical and radioactive substances. **Haemophilia**. 2002; 8: p. 369-371.

Helmstädter A. The history of electrically-assisted transdermal drug delivery (“iontophoresis”). **Pharmazie**. 2001; 7: p. 583-7.

Higginbottom M, Leckie V. Electrotherapy and its use in Haemophilia. In: **Physiotherapy Management of Haemophilia**. Blackwell Science. 2000; p.39-49.

Hilberg L, Heijnen L, Caviglia H et al. Rehabilitation in Haemophilia. **Haemophilia**. 2001; 4: p. 486-90.

Hooiveld M J, Roosendal G, Jacobs K M et al. Initiation of degenerative joint damage by experimental bleeding combined with loading of the joint: a possible mechanism of hemophilic arthropathy. **Arthritis Rheum**. 2003; 6: p. 2024-31.

(<http://portal.saude.gov.br/saude>)

Junqueira L C, Carneiro J. **Histologia Básica**. Guanabara Koogan. 2004. p.137-53.

Kanikkannan N, Kanimalla K, Lamba S S, Singh M. Structure activity relationship of chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery. **Curr. Med. Chem**. 2000; 7: p.593-608.

Kin A, Green P G, Rao G, Gy R H. Conective solvent flor across the skin during iontophoresis. **Pharm. Res**. 1993; 10: p. 1315-20.

Kuhn A V, Raith K., Sauverland V, Neubert R H H.. Quantification of hyaluronic acid fragments in pharmaceutical formulations using LC-ESI-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 2003; 30: p.1531-1537.

Lin H F, Maeda N, Smithies O, Straight D L, Stafford D W. A coagulation factor IX – deficient mouse model for human hemophilia B. **Blood**. 1997; 90: p. 3962-66.

Lorenzi T F. Patologia da Hemostasia. In:Lorenzi T F. **Manual de Hematologia: Propedêutica e Clínica**. 2.<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro. Medsi. 1999; p. 521-601.

Mannucci P M. Drug therapy: Hemostatic Drugs. **The New England Journal of Medicine**. 1998; 4: p. 245-53.

Moffat et al. Pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material. In: **Clarke's isolation and identification of drug's**. London: Pharmaceutical. 1986; p. 847.

Monteiro-Riviere N A, Inman A O, Riviere J E. Identification of the pathway of iontophoretic drug delivery: light and ultrastructural studies using mercuric chloride in pigs. **Pharm. Res.** 1994; 2: p. 251-6.

Marro D, Kalia Y N, Delgado-Charro M B, Guy R H. Contributions of electromigration and electroosmosis to iontophoretic drug delivery. **Pharm Res.** 2001; 12: p. 1701-8.

Panchagnula R, Pillai O, Nair V B, Ramarao P. Transdermal iontophoresis revisited. **Nex generation therapeutics**. 2000; p.468-73.

Pannus C P, Ferslew K E, Tober-Meyer B, Kao RL. Ketoprofen tissue permeation in swine following cathodic iontophoresis. **Physical Therapy**. 1999; 79: p. 1118-30.

Pannus P C, Caanpbell J, Kulkarni S B, Herrick R T, Ravis W R, Banga A K. Transdermal iontophoretic delivery of ketoprofen through human cadaver skin and in humans. **Journal of Controlled Realease**. 1997; 44: p. 113-121.

Prausnitz M R, Mitragotri S, Langer R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**. 2004; 3: p.115-24.

Pettersson H, Ahlberg A, Nilsson I M. A radiologic Classification of Hemophilic Arthropathy. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. 1980; 149: p.153-9.

Pettersson C J. Synoviorthesis with radioactive gold in haemophilia. **Haemophilia**. 2001; 2: p. 31-3.

Pikal M J. The role of electroosmotic flow in transdermal iontophoresis **Adv. Drug Delivery**. 2001; 46: p. 281-305.

Higginbottom M, Leckie V. Electrotherapy and its use in Haemophilia. In: **Physiotherapy Management of Haemophilia**. Blackwell Science. 2000; p.39-49.

Querol F, Aznar J A, Haya S, Cid A. Orthoses in haemophilia. **Haemophilia**. 2002; 3: p. 407-12.

Radossi P, Baggio R, Petris U, et al. Intra-articular rifamycin in haemophilic arthropathy. **Haemophilia**. 2003; 1: p. 60-3.

Riviere J E, Papich M G. Potential and problems of developing transdermal patches for veterinary applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 2001; 50: p.175-203.

Roberts H R, Hoffman M. Haemophilia and related conditions – inherited deficiencies of prothrombin (factor II), factor V and factors VII to XII. In: Beutler E, Lichtman M A, Coller B S, Kipps T J. **Willians Hematology**. 5<sup>th</sup> ed. Ed. Mc Graw Hill. 1995; p.1413-39.

Rodriguez-Merchan E C. Radionuclide Synovectomy (Radiosynoviorthesis) in Hemophilia: A very efficient and single procedure. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**. 2003; 29: p. 78-90.

Rodriguez-Merchan E C. Orthopaedic Surgery of Haemophilia in the 21st Century: An Overview. **Haemophilia**. 2002; 8: p. 360-68.

Rodriguez-Merchan E C, Wiedel J D. General principles and indications of synoviorthesis medical (synovectomy) in haemophilia. **Haemophilia**. 2001; 2: p. 6-10.

Rodriguez-Merchan E C. Methods to treat chronic haemophilic synovitis. **Haemophilia**. 2001; 7: p. 1-5.

Rodriguez-Merchan E C. Goddard J. Muscular bleeding, soft tissue haematomas and pseudotumours. In: Rodriguez-Merchan E C, Goddard N J, Lee C A. **Musculoskeletal Aspects of Haemophilia**..Ed. Blackwell Science. Oxford. 2000; p.85-105.

Rodriguez-Merchan E C. Orthopaedic Surgery in Haemophilia. In: Buzzard B, Beton K. **Physiotherapy Management of Haemophilia**. Oxford. Ed. Blackwell Science. 2000; p.111-20.

Roosendaal G, Lafeber F. Pathogenesis of haemophilic arthropathy. **Haemophilia**. 2006; 3: p.117-21.

Roosendaal G, van Riinsum AC, Vianen M E, van den Berg H M, Lafeber F P J G, Bijlma J W J. Haemophilic Arthropathy Resembles Degenerative rather than Inflammatory Joint Disease. **Histopathology**. 1999; 34: p.144-53.

Roosendaal G, Mauser-Bunschoten E P, Kleinn P, Heijnen L, van den Berg H M, Van Rinsum A C, Lafeber F P J G, Bijlsma W J. Sinovium in haemophilic artropathy. **Haemophilia**.1998; 4: p. 502-5.

Rosado C, Cross S E, Pugh W J et al. Effect of vehicle pretreatment on the flux, retention, and diffusion of topically applied penetrants in vitro. **Pharmaceutical Research**. 2003; 20: 1142-56.

Rowett, H G Q. With notes on the mouse. **The Rat**. Mart and Winston, New York. 1957.

Scheuplein R J, Blank I H. Permeability of the skin. **Physiol**. 1971; 51: p. 702-47.

Sherry S, Marder V J. Therapy with antifibrinolytic agents. In: Colman, R W, Hirsh J, Marder V J, Clowes A W, George J N. **Haemostasis and Thrombosis**. Basics principles and clinical practice. Fourth Edition. Ed. Lippincott Williams & Wilken. 2001; p. 795-815.

Silva M, Luck Jr J V, Llinas A. Sinovitis Hemofílica crónica: el papel de la radiosinovectomía. Tratamiento de la Hemofilia. **Federación Mundial de Hemofilia**. 2004; Abril. n.º 33.

Silva M, Luck Jr J V, Siegel E. <sup>32</sup>P chronic phosphate radiosynovectomy for chronic haemophilic synovitis. **Haemophilia**. 2001; 7: p. 240-9.

Singh J, M aibach H I. Topical Iontophoretic Drug Delivery in vivo: Historical Development, Devices and Future Perspectives. **Dermatology**. 1993; 187: p. 235-38.

Stephensen D. Biomechanics of the lower limb in Haemophilia. In: **Physiotherapy Management of Haemophilia**. Blackwell Science. 2000; p.77-87.

Tiktinsky R, Barmatz C. Hydrotherapy and its use in haemophilia. In: **Physiotherapy Management of Haemophilia**. Blackwell Science. 2000; p.27-38.

Uitto O D, White H S. Electroosmotic pore transport in human skin. **Pharmaceutical Research**. 2003; 4: p.886-98.

Valentino L A, Hakobyan N, Kazarian T, Jabbar K J, Jabbar A A. Experimental haemophilic synovitis: rationale and development of murine model of human factor VIII deficiency. **Haemophilia**. 2004; 10: p. 280-287.

Villar A, Jimenez-Yuste V, Quintana M, Hernandez-Navarro F. The Use of Haemostatic Drugs in Haemophilia: Desmopress and Antifibrinolytic Agents. **Haemophilia**. 2002; 8: p.189-93.

Wallny T, Brackman H H, Semper H, Schumpe G, Effenberg W. Heb I, Seuser A. Intra articular hyaluronic acid in treatment of haemophilic arthropathy of knee. Clinical, radiological and sonographical assessment. **Haemophilia**. 2000; 6: p. 566-570.

Wang Y, Fan Q, Song Y, Michniak B. Effect of fatty acids and iontophoresis on the delivery of midrodrine hydrochloride and the structure of human skin. **Pharmaceutical Research**. 2003;10: p.1612-18.

Watson T. Current concepts in electrotherapy. **Haemophilia**. 2002; 3: p. 413-8.

Wixson S K, Smiler K L. Anesthesia and analgesia in rodents. In: **Anesthesia and analgesia in laboratory animals**. Academic Press. 1997.

White G C, Roosendaal F, Aledort L M, Lusher J M, Rothschild C, Ingerslev J. Recommendation of the Scientific Subcommittee on factor VIII and factor IX of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. **Thromb haemost. Definitions in haemophilia**. 2002; vol. 85 (3). p. 560.



## ***8- ANEXOS***



---

**Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP.**


UNICAMP

Universidade Estadual de Campinas  
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

---

**Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA-IB-UNICAMP**
**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº **631-2**, sobre "ESTUDO DA LONTOFORESE COMO VIA DE ADMINISTRAÇÃO DE ANTIFIBRINOLÍTICOS NOS QUADROS AGUDOS DE HEMARTROSE EM PACIENTES HEMOFÍLICOS – PROTOCOLO EM PORCOS" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Joyce Maria Annichino Bizzacchi/Janaina Bosso J. Silva está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 01 de Julho de 2004.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº **631-2**, entitled " \_\_\_\_\_ ", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on July 1st, 2004.

Campinas, 1º. e Julho de 2004.

Profa. Dra. Liana Verinaud  
Presidente

Fátima Alonso  
Secretária



**Trabalho: “Transdermal Iontophoretic Drug Delivery as an Alternative Choice in Hemophilia Synovitis Treatment.”**

**“Transdermal Iontophoretic Drug Delivery as an Alternative Choice in Hemophilia Synovitis Treatment.”**

Autores: Janaina B. J. Silva, Rodrigo R. Catharino, Erich V. de Paula, Márcia A. P. Matta, Marcos N. Eberlin, Joyce M. Anicchinno-Bizzacchi, Margareth Castro Ozelo

Submetido para publicação no *Journal of the American Physical Therapy Association* em junho de 2006.