



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS ARARAQUARA**

**Resposta imuno-bioquímica e avaliação histológica da
cartilagem articular de ratos artrose induzidos, frente ao
tratamento com iontoforese isolada e de ácido L -
ascórbico.**

Mauricio Ferraz de Arruda

Tese apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho - UNESP”, como requisito para defesa e obtenção do título de doutor em (Biociências e Biotecnologia aplicadas a Farmácia).

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. OLGA MARIA MASCARENHAS DE FARIA OLIVEIRA.

CO-ORIENTADORA: PROF^a. DR^a MARIA RITA PACHECO.

Araraquara, 2010

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

A779r Arruda, Mauricio Ferraz de
Resposta imuno-bioquímica e avaliação histológica da cartilagem articular de ratos artrose induzido, frente ao tratamento com iontoforese isolada e de ácido L – ascórbico. / Mauricio Ferraz de Arruda. – Araraquara, 2010
97 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia
Orientador: Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira
Co-orientador: Maria Rita Pacheco

1. Iontoforese. 2. Cartilagem. 3. Ácido ascórbico. 4. Reparo. I. Oliveira, Olga Maria Mascarenhas de Faria, orient. II. Pacheco, Maria Rita, co-orient.. III. Título.

CAPES: 40300005

Agradecimentos

-A Deus por me fornecer saúde para que pudesse cumprir com minhas responsabilidades e vontades.

-A Professora Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira que tanto contribuiu com seu conhecimento e seriedade.

-A Professora Maria Rita Pacheco pela co-orientação

-Aos meus pais, Nilton e Maria que me apresentaram com muita decência o caminho da educação.

-A minha namorada Vanessa, pela paciência empregada em muitos momentos dos quais necessitava da mesma.

-Ao aluno de iniciação científica Everton Rodrigo Fermino pelo auxílio experimental.

Resumo

Introdução: A osteoartrose se caracteriza pela degeneração articular, perda de cartilagem e alterações no osso subcondral. Pouco se sabe sobre a patogênese e mudanças que ocorrem na osteoartrose como também em seu reparo. As técnicas terapêuticas disponíveis podem resultar em alívio dos sintomas, mas não na regeneração do tecido lesado. Um dos métodos usuais para pesquisa em osteoartrose com o preceito de mimetizar esta situação e também realizada neste trabalho, é o modelo experimental utilizando a inoculação intra-articular de zymosan (*Saccharomyces cerevisiae*), gerando artrite em grau progressivo. A eletroterapia potencializa a reparação de tecidos conjuntivos representando uma alternativa na reparação de lesões da cartilagem hialina. O ácido ascórbico é um dos precursores do colágeno que junto com outras estruturas complexas como a trama de glicosaminoglicanas e proteoglicanas constitui a cartilagem. A utilização dessa técnica para administração do ácido ascórbico em tecido biológico é fator substancial do presente trabalho. **Objetivo:** O objetivo do presente estudo foi verificar a resposta imuno-bioquímica e avaliar microscopicamente a cartilagem articular de ratos artrose induzidos, frente ao tratamento com iontoforese na presença e ausência de ácido L-ascórbico. **Materiais e Métodos:** Ratos wistar machos divididos em 6 grupos de 6 animais cada um, diferenciados em grupos: controle positivo C+, controle negativo C-, gavagem com solução fisiológica GSF, gavagem com ácido ascórbico GAA, iontoforese solução fisiológica IFSF, iontoforese com ácido ascórbico IFAA. **Resultados:** Histológicos demonstraram em coloração *Hematoxilina e Eosina* que com o grupo IFAA obteve normalidade da variável celularidade ($40.1 \mu\text{m}^2$), e manutenção da cartilagem não calcificada ($75.5 \mu\text{m}$) ($p < 0.05$), sugerindo espessuras normais. Quanto ao grupo não tratado C+ apresentou-se menor média quanto a número de condrócitos ($13.0 \mu\text{m}^2$), e quanto a espessuras da cartilagem apresentou maior média para cartilagem calcificada com espessura de ($104.8 \mu\text{m}$), e menor média de cartilagem não calcificada de ($53.3 \mu\text{m}$) ($p < 0.05$), em coloração Tricrômico de Masson verificaram-se o clones de condrócitos apresentando maior média ($12.0 \mu\text{m}^2$) ($P < 0.05$) no grupo IFSF, em relação aos outros grupos. Imunológico Verificou-se que o grupo C+, apresentou menor valor (1.097 pg/mL), enquanto que o C-, GSF, GAA, IFSF e IFAA, podem ser considerados iguais, com valores respectivos de (2.033 , 1.698 , 1.535 , 2.014 pg/mL e 1.728 pg/mL) ($p < 0.05$). Bioquímicos as variáveis das dosagem de cálcio, fosfatase alcalina e lactato desidrogenase foram iguais estatisticamente, com exceção do grupo IFAA que apresentou menor média (985 , 667 UA/mL) para fosfatase alcalina ($p < 0.05$). **Conclusão:** A corrente elétrica com l-ascórbico foi benéfica para a cartilagem, havendo normalidade da variável celularidade e manutenção da espessura da cartilagem não calcificada. Quanto ao grupo não tratado apresentou redução celular e da camada cartilaginosa não calcificada e aumento da calcificada. A IL-10 aumentou no grupo IFAA em detrimento ao C+ sugerindo controle inibitório à lesão e seguindo as análises séricas, não houve diferença entre os grupos quanto a dosagens bioquímicas quando se levou em conta a comparação das médias, mas houve contribuição na diferença entre as amostras se comparados alguns animais de forma isolada. **Palavras-chave:** iontoforese, cartilagem, ácido ascórbico, reparo.

Abstract

Introduction: Osteoarthritis is characterized by joint degeneration, loss of cartilage and subchondral bone changes. Little is known about the pathogenesis and changes that occur in osteoarthritis as well as in its repair. Available therapeutic techniques can result in relief of symptoms but not in the regeneration of injured tissue. One of the usual methods for research used in this study is the experimental model which uses intra-articular inoculation of zymosan (*Saccharomyces cerevisiae*), causing arthritis in progressive degree. Electrotherapy enhances the healing of tissues representing an alternative in the repair of hyaline cartilage injuries. Ascorbic acid is one of the forerunners of collagen which along with other complex structures like the chains of glycosaminoglycans and proteoglycans form the cartilage. The use of this technique for administration of ascorbic acid in biological tissue is a substantial factor in this study. **Objective:** The objective of this study was to investigate the immune-biochemical reply and evaluate microscopically the histology of articular cartilage in rats arthritis induced, compared to treatment with iontophoresis in the presence and absence of L - ascorbic acid. **Methods:** Male wistar rats were divided into 6 groups of 6 animals each, in different groups: positive control C+, negative control C-, gavage with saline solution GSS, gavage with ascorbic acid GAA, saline iontophoresis IPSS, iontophoresis with ascorbic acid IPAA. **Results:** Histological it was demonstrated that in hematoxylin and eosin staining the group that received IPAA obtained normality of variable ($40.1 \mu\text{m}^2$), and maintenance of non calcified cartilage ($75.5\mu\text{m}$) ($p<0.05$), suggesting normal thickness. Regarding the untreated group C+, it presented lower average in the number of chondrocytes ($13.0\mu\text{m}^2$), and with regard to the thickness of cartilage it had a higher average of calcified cartilage with thickness of ($104.8\mu\text{m}$), and lower average of non calcified cartilage of ($53.3\mu\text{m}$) ($p<0.05$), in masson trichrome staining it was found that the clones of chondrocytes showed higher average ($12.0\mu\text{m}^2$) ($P<0.05$) in IPSS group, compared to other groups. Immune it was verified that the group C+, showed the lowest value ($1,097 \text{ pg / mL}$), whereas the C-, GSS, GAA, IPSS and IFAA, can be considered equal, with respective values of ($2,033, 1,698, 1,535, 2,014 \text{ pg / ml}$ and 1728 pg / mL) ($p <0.05$). Biochemical it was seen that the variables of calcium, alkaline phosphatase and lactate dehydrogenase dosage were statistically equal, except for the IPAA group that presented the lowest ($985, 667 \text{ AU / mL}$) alkaline phosphatase ($p <0.05$). **Conclusion:** The electrical current with l-ascorbic acid was beneficial to cartilage, with normality of variable cellularity and maintenance of the non calcified cartilage thickness. The untreated group showed a reduction of cells and of non calcified cartilage layer and an increase of the calcified one. IL-10 increased in the group IPAA over the C+ group, suggesting inhibitory control to injury and following serum analysis. There was no difference among the groups regarding biochemical dosages when the statistical analysis was taken into account, but there was a contribution to the difference between samples comparing some animals in isolation.

Keywords: Iontophoresis, cartilage, ascorbic acid, repair

Sumário

Índice de Figuras

Índice de Tabelas

Lista de Abreviaturas

Capítulo1	13
1-Introdução	13
2-Revisão de literatura	16
2.1 Cartilagem Articular: Características Morfológicas e Fisiológicas.....	16
2.2 Osteoartrose: Características estruturais e imuno-patológicas.....	21
2.3 Alterações na Cartilagem Resultante da inoculação do Zymosan.....	27
2.4 Ácido L - Ascórbico (Vitamina C) propriedades na biossíntese do colágeno.....	28
2.5 Iontoforese: propriedades bioestimulantes.....	31
2.6 Modelos de avaliação do dano a Cartilagem.....	39
2.6.1 Dosagens bioquímicas no dano a cartilagem.....	39
2.6.2 Ensaio Imunológico no dano a cartilagem.....	40
2.6.3 Histologia na avaliação do dano a cartilagem.....	41
3-Objetivos	43
3.1 Geral.....	43
3.2 Específicos.....	43
4-Material e Métodos	44
4.1 Animais.....	44
4.2 Grupos Experimentais.....	45
4.3 Pesagem dos Animais e indução anestésica	46
4.4 Protocolo de Indução da Artrose.....	46
4.5 Protocolos de Tratamento com Acido ascórbico por Iontoforese e Gavagem.....	48
4.5.1 Iontoforese.....	48
4.5.2 Gavagem.....	49
4.6 Coleta e separação do Material para Análise.....	50
4.6.1 Sangue.....	50
4.6.2 Patas.....	51
4.7 Análise bioquímica de cálcio (Ca), fosfatase alcalina (FS) e lactato desidrogenase (LDH).....	52
4.8 Análise imunoenzimática de interleucina IL-10.....	52
4.9 Análise Histológica da Cartilagem.....	53
5-Análise Estatística	57
6-Resultados	58
6.1 Pesos dos Animais.....	58
6.2 Análise estatística e qualitativa da celularidade e espessura da cartilagem em H&E.....	58

6.3 Análise estatística e qualitativa, Clones de Condrocitos, em Tricrômico de Masson.....	63
6.4 Análise estatística dos índices de interleucina 10 IL-10.....	66
6.5 Análise estatística de íons cálcio (Ca), fosfatase alcalina (FS) e lactato desidrogenase (LDH)...	67
7-Discussão	70
8-Conclusão.....	76
9-Referencias Bibliográficas.....	77
ANEXO I	
ANEXO II	
ANEXO III	
ANEXO IV	
ANEXO V	
ANEXO VI	
ANEXO VII	
ANEXO VIII	
Capitulo 2	99
Artigo científico.....	99

Índice de figuras

Figura 1: Diagrama mostrando a estrutura molecular das fibras de colágeno na cartilagem: Moléculas de colágeno II (linhas pretas) e colágeno tipo XI (linhas amarelas). As moléculas de colágeno tipo IX estão localizadas na superfície das fibrilas.Fonte: (OLSEN, 1997).....	15
Figura 2: Cartilagem articular subdivisão em camadas. Fonte: Adaptado de www.drmenbone.com/meniscus.html	20
Figura 3: Via catabólica no processo de lesão de células cartilaginosas Fonte: http://www.trbpharma.com	25
Figura 4: Distribuição química e representação molecular do ácido L – Ascórbico. Fonte: (DAVID, 2005).....	29
Figura 5: Corrente contínua (galvânica).....	35
Figura 6: Foto do procedimento de Indução da osteoartrose no joelho esquerdo de ratos machos albinos wistar após lateralização da patela.....	47
Figura 7: Foto do procedimento de Iontoforese em ratos machos albinos wistar, onde se observa o eletrodo positivo no dorso e o eletrodo negativo contendo acido ascórbico no joelho esquerdo do animal.....	49
Figura 8: Foto do procedimento de gavagem em ratos machos albinos wistar, demonstrando o posicionamento da agulha e seringa.....	50
Figura 9: Desenho esquemático dos cortes realizados na articulação do joelho. A: Linha divisória entre as regiões medial e lateral, vista anterior.....	54
Figura 10: Fotomicrografias de fêmures distais em (H&E) A, B, C, D: Mostrando análise da espessura da cartilagem calcificada medida da interface do osso sub-condral até <i>Tidemark</i> e cartilagem não calcificada da <i>Tidemark</i> ate superfície da cartilagem articular, mostra também o método de análise morfométrica para contagem manual de células para variável celularidade, dentro de uma área central de $700.09\mu\text{m}^2$.(Barra = $50\mu\text{m}$). A: grupoC- celularidade normal grau 0, B: GrupoC+ hipocelularidade grau 3, C: Grupo IFSF hiper celularidade grau 1 D: grupo GSF hiper celularidade difusa grau 2, de acordo com tabela <i>Mankin et al (1971)</i>	62
Figura 11: Fotomicrografias de fêmures distais em (H&E) E, F: Mostrando análise da espessura da cartilagem calcificada medida da interface do osso sub-condral ate <i>Tidemark</i> e cartilagem não calcificada da <i>Tidemark</i> ate superfície da cartilagem articular, mostra também o método de análise morfométrica para contagem manual de células para variável celularidade, dentro de uma área central de $700.09\mu\text{m}^2$. (Barra = $50\mu\text{m}$) E: grupo GAA hiper celularidade grau 1 F: grupo IFAA celularidade normal grau 0 de acordo com tabela <i>Mankin et al (1971)</i>	63

Figura 12 : Fotomicrografias de fêmures distais em Tricromico de Masson, mostrando o método de análise morfométrica para contagem manual de células para variável clones, dentro de uma área central de 700.09µm². (Barra = 50 µm). **A**: grupo C-ausência de clones grau 0,**B**:Grupo C+ ausência de clones grau 0,**C**: Grupo GSF a **seta indica** grupo isogênico, densos pares grau 2 grau **D**: grupo IFSF ausência de clones grau 0 **E**:grupo GAA ausência grau 0 **F**: grupo IFAA ausência de clones, de acordo com tabela *Mankin et al (1971)*.....65

Índice de tabelas

Tabela 1: Pesos dos animais (g) no início e no final do experimento.....58

Tabela 2: Dados dos valores do numero de células/ μm^2 , obtidas em relação a cada animal nos grupos C⁺ controle positivo; C⁻ controle negativo; GSF gavagem soro fisiológico; GAA gavagem acido ascórbico IFSF iontoforese soro fisiológico; IFAA iontoforese acido ascórbico.....59

Tabela 3: Dados dos valores obtidos para a variável espessura da cartilagem calcificada, em micrometros (μm), em relação a cada animal e média, nos grupos C⁺ controle positivo; C⁻ controle negativo; GSF gavagem soro fisiológico; GAA gavagem acido ascórbico IFSF iontoforese soro fisiológico; IFAA iontoforese acido ascórbico.....60

Tabela 4: Dados dos valores obtidos para a variável espessura da cartilagem não calcificada, em micrometros (μm), em relação a cada animal e média, nos grupos C⁺ controle positivo; C⁻ controle negativo; GSF gavagem soro fisiológico; GAA gavagem acido ascórbico IFSF iontoforese soro fisiológico; IFAA iontoforese acido ascórbico61

Tabela 5: Dados dos valores do numero de clones de condrocitos/ μm^2 , obtidos em relação a cada animal nos grupos C⁺ controle positivo; C⁻ controle negativo; GSF gavagem soro fisiológico; GAA gavagem acido ascórbico IFSF iontoforese soro fisiológico; IFAA iontoforese acido ascórbico.....64

Tabela 6: Dados dos valores obtidos para a variável interleucina IL-10 em picogramas por mililitro (pg/mL), individual e média, em relação a cada animal dos grupos C⁺ controle positivo; C⁻ controle negativo; GSF gavagem soro fisiológico; GAA gavagem acido ascórbico IFSF iontoforese soro fisiológico; IFAA iontoforese acido ascórbico.....66

Tabela 7: Dados dos valores obtidos para a variável íons cálcio em miligramas por mililitro (mg/mL), individual e média, em relação a cada animal dos grupos C⁺ controle positivo; C⁻ controle negativo; GSF gavagem soro fisiológico; GAA gavagem acido ascórbico IFSF iontoforese soro fisiológico; IFAA iontoforese acido ascórbico.....67

Tabela 8: Dados dos valores obtidos para a variável enzima fosfatase alcalina unidade arbitraria por mililitro (UA/mL), individual e média, em relação a cada animal dos grupos C⁺ controle positivo; C⁻ controle negativo; GSF gavagem soro fisiológico; GAA gavagem acido ascórbico IFSF iontoforese soro fisiológico; IFAA iontoforese acido ascórbico.....68

Tabela 9: Dados dos valores obtidos para a variável enzima lactato desidrogenase unidade arbitraria por mililitro (UA/mL), individual e média, em relação a cada animal dos grupos C⁺ controle positivo; C⁻ controle negativo; GSF gavagem soro fisiológico; GAA gavagem acido ascórbico IFSF iontoforese soro fisiológico; IFAA iontoforese acido ascórbico.....69

Abreviaturas

CEBEA	Comitê de Bem Estar e Ética Animal
Ca	Cálcio
C+	Controle Positivo
C-	Controle Negativo
Co	Compani
Desv Pad	Desvio Padrão
FS	Fosfatase Alcalina
GAA	Gavagem Ácido Ascórbico
GAGs	Glicosaminoglicanas
GSF	Gavagem Soro Fisiológico
(H&E)	Hematoxilina e Eosina
IFAA	Iontoforese Acido Ascórbico
IL-10	Interleucina 10
IL-1	Interleucina 1β beta
I.P	Intraperitoneal
IFSF	Iontoforese Soro Fisiológico
LDH	Lactato Desidrogenase
MEC	Matriz Extra Celular
MMPs	Metaloproteinases
OA	Osteoartrose
rpm	Rotações por minuto
(SF)	Soro Fisiológico
(SGHH)	Sistema de graduação Histológico-Histoquímico
TIMP	Anti-Metaloproteinases
Zy	Zymosan

1- INTRODUÇÃO

Hunter (1743) afirmou que “desde Hipócrates se acredita que a cartilagem articular lesada tem baixo potencial de regeneração”. Por este motivo, clínicos e pesquisadores têm procurado meios artificiais ou naturais para a reparação das lesões cartilaginosas em articulações sinoviais. A reparação tecidual é um fenômeno de grande interesse para os profissionais da área da saúde. Sua eficiência acelera o processo de reabilitação, com retorno mais rápido do paciente ao trabalho, atividades de lazer e até o convívio social (SAY et al., 2003).

A reparação tecidual normal é uma integração de processos interativos dinâmicos que envolvem mediadores químicos; elementos figurados do sangue, produção de matriz extracelular e células parenquimatosas (COTRAN et al., 2000).

No processo de reparação, a regeneração e a cicatrização, devem ser consideradas como eventos distintos, no entanto, ambos os processos estão ligados, ocorrendo conjuntamente (BRASILEIRO-FILHO et al., 1998) e (CLARK, 1988).

A osteoartrose (OA) foi considerada, no passado, uma doença do grupo dessas doenças degenerativas que por sua vez acometia as articulações diartrodiais, fazendo parte do envelhecimento natural. Entretanto, atualmente, é considerado um processo de intensa atividade metabólica das células da cartilagem articular, que induz aumento da produção de elementos estruturais, na tentativa de reparar a perda de componentes degradados pela doença. Tal atividade de regeneração, quando sobrepujada por uma degradação em ritmo acelerado, leva a um estado de

insuficiência osteocartilaginosa, concepção que atualmente melhor define a osteoartrose (VELOSA, WALLY, NATALINO, 2003).

Apesar de inúmeras pesquisas clínicas e experimentais nesta área, pouco se sabe sobre a patogênese e mudanças que ocorrem na osteoartrose, como também em seu reparo.

Deste modo, o estudo deste tecido durante o desenvolvimento da osteoartrose representa uma das maneiras mais adequadas para a compreensão da patogênese desta doença. As técnicas disponíveis atualmente para o tratamento de lesões de cartilagem articular podem resultar em alívio dos sintomas, mas não na regeneração do tecido lesado (VELOSA, WALLY, NATALINO, 2003).

Um dos métodos usuais para pesquisa em osteoartrose, com o preceito de mimetizar esta situação, é o modelo experimental animal utilizando a inoculação intra-articular de (Zy) zymosan, onde este leva de forma determinante a perda de glicosaminoglicanos da matriz, gerando artrite em grau progressivo (FRASNELLI, 2005).

O ácido ascórbico é um dos precursores do colágeno que junto com a elastina e outras estruturas complexas como a trama de glicosaminoglicanas e proteoglicanas constitui a cartilagem (FENSKE, LOBER, 1986). Este colágeno fica embebido em um firme gel hidratado de proteoglicanas. A proteoglicana é formada por um núcleo protéico central e possui glicosaminoglicanas sulfatadas (GAGs) ligadas a esse núcleo. Essas proteoglicanas podem ser encontradas como monômeros e também na forma agregada. O agregado de proteoglicanas é composto de uma cadeia de ácido hialurônico central e (GAG) glicosaminoglicanas não sulfatadas com múltiplos monômeros de proteoglicana ligados a ele, ilustrado na

Figura 1.

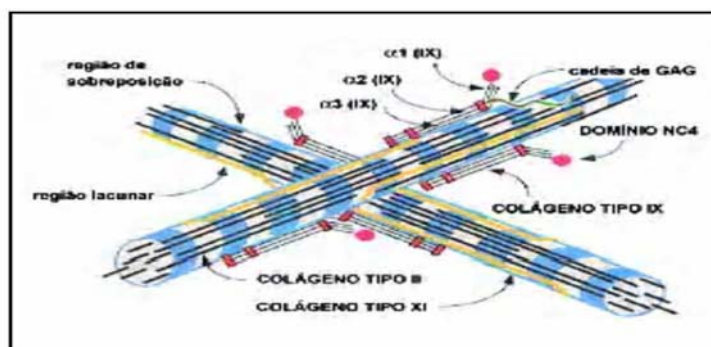


Figura 1: Diagrama mostrando a estrutura molecular das fibras de colágeno na cartilagem: Moléculas de colágeno II (linhas pretas) e colágeno tipo XI (linhas amarelas). As moléculas de colágeno tipo IX estão localizadas na superfície das fibrilas. Fonte: (OLSEN, 1997)

Acredita-se que os fatores que influenciam o processo de cicatrização, local ou sistêmico, também influenciam na aparência final da cicatriz, assim os fatores sistêmicos como a desnutrição e falta de vitamina C, inibem a síntese de colágeno, e influencia em diversos componentes da inflamação (BRASILEIRO-FILHO et al., 1998; ROSS, REITH, ROWNELL, 1993).

A obtenção de uma técnica de administração do ácido ascórbico em tecido biológico é fator substancial do presente trabalho, onde se propõe mostrar como uma terapêutica não invasiva baseada na passagem transdérmica ionizada pode contribuir com possíveis vantagens nos resultados deste tipo de lesão cartilágnea, se comparado a outros mecanismos de administração como a de infiltração articular terapêutica. Essa forma trata-se da iontoforese. Deste modo, não há descrição na literatura científica sobre: i) a utilização de corrente polarizada como vetor para um substrato biológico, que possa processar um reparo de cartilagem articular em modelo animal; e: ii) verificação da resposta imunológica quando se aplica a corrente polarizada.

2-REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cartilagem Articular: Características Morfológicas e Fisiológicas

A cartilagem articular é um tecido conjuntivo especializado desprovido de vascularização e aneural, com grande quantidade de matriz extracelular (MEC), composto exclusivamente por células chamadas condrócitos. Enquanto a MEC é o componente funcional da cartilagem articular, os condrócitos são responsáveis pela homeostase deste tecido (AIGNER, SOEDER, HAAG, 2006) De uma forma geral, as funções principais da cartilagem articular são absorver o impacto, distribuir o peso axial ao longo da superfície articular durante a descarga do mesmo e proporcionar uma coaptação e movimentos livres e rítmicos das ações articulares nos arcos de movimento. O que permite que isso aconteça é a composição, a organização existente em sua matriz extracelular e sua superfície lisa com baixo coeficiente de fricção (FELICE et al., 2002).

A matriz é composta por uma densa rede de fibras colágenas, proteoglicanas agregadas e não-agregadas, água, sais inorgânicos e pequenas quantidades de outras proteínas, glicoproteínas e lipídios. A principal macromolécula encontrada na matriz é o colágeno (60%), tipos IX, XI, mas predominantemente do tipo II. Este colágeno fica embebido em um firme gel hidratado de proteoglicanas. A proteoglicana é formada por um núcleo protéico central e possui glicosaminoglicanas sulfatadas (GAGs) ligadas a esse núcleo. Essas proteoglicanas podem ser encontradas como monômeros e também na forma agregada. O agregado de

proteoglicanas é composto de uma cadeia de ácido hialurônico central (GAG não sulfatada) com múltiplos monômeros de proteoglicana ligados a ele. Componentes importantes das proteoglicanas são as GAGs, formadas por polissacarídeos sulfato de condroitina e queratan sulfato (GOLDRING, 2000; TYYNI & KARLSSON, 2000; VANWANSEELE et al., 2002).

As GAGs são fortemente hidrofílicas e por isso formam géis mesmo em baixas concentrações. Além disso, possuem múltiplas cargas negativas que atraem cátions como (Na^+) que são osmoticamente ativos e fazem com que grandes quantidades de água sejam sugadas para o interior da matriz. Além disso, os monômeros de proteoglicana repelem-se por terem a mesma carga. Essas duas situações criam uma pressão de edema que é balanceada pela tensão das fibras colágenas. Por suas características, o colágeno fornece resistência a essa expansão. As proteoglicanas, além de preencherem o espaço da matriz, resistem à compressão. Sendo assim, a grande quantidade de GAGs (glicosaminoglicanas) e colágeno permitem, respectivamente, grande pressão interna e tensão de contrabalanço, o que dá à cartilagem sua rigidez e resistência (AROKOSKI et al., 2000; WHITING & ZERNICKE, 2001; NARMONEVA et al., 2002; ALBERTS et al., 2004).

Distribuída em lacunas entre essa matriz, existe uma esparsa população de células, os condrócitos. São eles os responsáveis pela síntese e manutenção destes componentes da matriz, produzem e degradam baseados nas citocinas anabólicas e catabólicas enviados e recebidos pela própria matriz (GOLDRING, 2000; TYYNI & KARLSSON, 2000).

A vascularização do periósteo, junto à cartilagem articular é indiretamente fonte de líquido sinovial e assim, maior fonte de nutrição para a cartilagem. A maioria dos agentes terapêuticos atravessa o filtro sinovial. (RODKEY & Mc. KINNEY, 1993).

A cartilagem articular apresenta diferentes características conforme passa da superfície a zonas mais profundas. Estas diferenças estão relacionadas com a quantidade e organização dos componentes da matriz e dos condrócitos, o que dá às camadas características biomecânicas conforme a região. Em função destas variações, divide-se a cartilagem em quatro camadas: superficial, média, profunda e calcificada. Segundo Angel et al., (2003) e Turek (1999) as divisões são:

Zona superficial: camada mais fina e compõe 10% da cartilagem; encontra-se na superfície articular. É acelular, apresenta grandes feixes de fibras colágenas intimamente agregadas (tangenciais à superfície articular) e escassez de proteoglicanas. Essa orientação colágena tem como função uma maior resistência às forças de cisalhamento. Aprofundando a camada acelular, mas ainda considerada parte da camada superficial as células estão achatadas e elipsóides. Elas degradam proteoglicanas mais rapidamente e sintetizam menos colágeno e proteoglicanas que as camadas mais profundas. A matriz tem alta concentração de colágeno e pequena concentração de proteoglicanas como consequência do metabolismo celular. Na periferia os componentes fibrosos se fundem com o periósteo fibroso do osso adjacente.

Zona média: localizada abaixo da camada superficial. É muito maior que a zona superficial, compõe aproximadamente 40% da cartilagem. Contém condrócitos esferóides e sua matriz com fibrilas colágenas de maior diâmetro, mas em menor

concentração que na camada superficial. Suas fibrilas colágenas não estão paralelas, são anguladas em diferentes direções. Esse arranjo angulado permite que esse colágeno resista melhor às cargas compressivas; formam um forte invólucro em forma de rede ao redor das células. Esta camada tem maior concentração de proteoglicana com menor conteúdo de água.

Zona profunda: também compõe 40% da cartilagem e apresenta condrócitos com forma esferóide, dispostos em colunas freqüentemente em grupos de 2 a 5 células. As características ultra-estruturais dos condrócitos indicam que o grau mais elevado da atividade metabólica ocorre nas zonas média e profunda. Sua matriz contém o colágeno de maior diâmetro, a maior concentração de proteoglicanas e a menor concentração de água. As fibrilas colágenas desta camada parecem estar perpendiculares à superfície articular e se prendem à camada mais profunda da cartilagem. A linha de crescimento é uma linha horizontal que aparece na transição entre a zona profunda e a zona calcificada.

Zona calcificada: o volume dos condrócitos é escasso e a matriz é maciçamente impregnada por sais de cálcio. As fibrilas colágenas da camada profunda parecem se prolongar a essa camada e ancorar na zona calcificada como mostrado na figura 2.

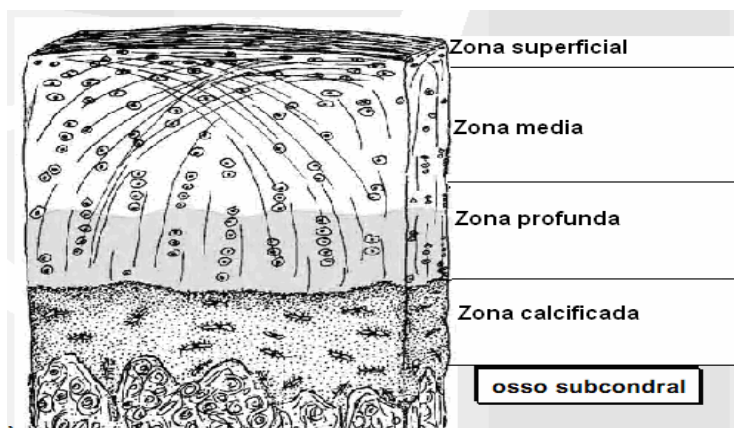


Figura 2: Cartilagem articular subdivisão em camadas
Fonte: Adaptado de www.drmenbone.com/meniscus.html

A cartilagem articular lesada apresenta aumento da sua maciez. Ao aplicarmos a mesma carga compressiva em uma cartilagem fibrilada e em uma normal, a fibrilada apresentará maior maciez e maiores reentrâncias que a normal.

Assim como as forças compressivas, as forças de cisalhamento, aplicadas em uma cartilagem macroscopicamente e histologicamente lesada resultam em maior deformação quanto mais macia e mais fraca estiver essa superfície. Entretanto, a diferença no tamanho desta deformação diminui quando são testadas amostras das camadas mais profundas. O conteúdo de colágeno tem relação direta com a rigidez tênsil da cartilagem. Entretanto, o mais importante é a orientação dessas fibras em direção paralela. Em maiores profundidades, não há significância entre conteúdo de colágeno e rigidez em relação às forças tensivas.

A orientação perpendicular das fibras, em relação à superfície articular é significativamente mais fraca que a orientação paralela. Já com relação às GAGs, foi estabelecido um coeficiente de correlação significativo entre a rigidez compressiva e sua concentração. Quanto maior a concentração, mais rígida é a cartilagem (AROKOSKI et al., 2000; ANGEL et al., 2003).

2.2 Osteoartrose: Características estruturais e imunopatológicas.

A osteoartrose, caracterizada pela degeneração da articulação, perda de cartilagem e alterações no osso subcondral, afeta mais de 40 milhões de brasileiros e nos Estados Unidos são mais de 50 milhões. Há uma incidência de 35% nos joelhos, que aparece a partir dos 30 anos, aumentando dramaticamente com a idade e afetando 80% das pessoas acima de 50 anos. Até agora, o tratamento adotado é aliviar a dor tanto o quanto possível, enquanto os tecidos continuam se deteriorando (PIZZORNO, 1995).

Devido ao desgaste normal, os tecidos sofrem constantes alterações, podendo ser restabelecidos ou restaurados. Quando envelhecemos, doenças ou lesões criam condições inferiores às ideais, com isso os tecidos se degeneram mais rapidamente do que podem ser recompostos. Isto também aumenta o desgaste da cartilagem matriz de uma articulação com osteoartrose do que numa articulação normal. Quando o aumento da matriz degenerada por enzimas condrocitárias excede o aumento da nova matriz sintetizada, as cartilagens se degeneram naturalmente, condrócitos em excesso criam substâncias úteis à reposição da cartilagem como também criam enzimas que destroem seus componentes. Se esse processo continua, a destruição da cartilagem será acompanhada pelo endurecimento e formação de esporões ósseos (osteófitos) nas extremidades das articulações. O resultado é dor, deformidade e movimento limitado na articulação (GOODHEART, 1954).

Os condrócitos podem proliferar e formar aglomerados celulares, havendo, além disso, aumento na síntese da matriz como tentativa de reparação tecidual. Entretanto, na fase crônica as enzimas degenerativas superam a capacidade sintética e a reparação falha. Com a progressão da fibrilação e eburnação na superfície, as alterações tornam-se mais profundas no tecido, a cartilagem é perdida e o osso subcondral torna-se espessado.

Nesse metabolismo patológico, o condrócito sofre a ação reguladora de dois tipos de mediadores: os pró-catabólicos (citocinas) e os pró anabólicos (fatores de crescimento) e demais citocinas, que podem promover junto ao condrócito a ativação de mecanismos que resultam na degradação ou regeneração da cartilagem, ainda não bem esclarecidos (ALBERTS, 1994).

Estas citocinas são polipeptídeos simples, ou glicopeptídeos, de peso molecular menor ou igual a 80 kDa, com propriedades regulatórias. São produzidas e secretadas por diversos tipos celulares em resposta a uma infinidade de estímulos, para agir em receptores específicos presentes em células alvo. Como são substâncias com diversas funções regulatórias, tais moléculas não são produzidas de maneira contínua. A sua produção é induzida ou suprimida por estímulos aos quais o organismo precisa responder. Os vários tipos de citocinas incluem as interleucinas (IL), os fatores de necrose tumoral (TNF), os interferons (IFN), os fatores estimulante de colônia da medula óssea e uma variedade de outros fatores de crescimento (fatores de crescimento derivados de fibroblastos, da epiderme e das plaquetas) (HOPKINS, 1990).

Alguns estudos têm demonstrado que citocinas podem influenciar a direção de uma resposta imune por mecanismos parácrinos, endócrinos e autócrinos. A capacidade que possuem de exercer efeito local, regional e sistêmico é um ponto importante da biologia dessas substâncias, pois demonstra o papel fisiopatológico desses mediadores na doença. A elevação da temperatura, indução de sono e supressão do apetite são todas manifestações sistêmicas de doença, porém, isso pode representar apenas alterações dos níveis de citocinas que normalmente controlam a nossa fisiologia circadiana. Um aumento dos níveis de citocinas que estão associadas com a inflamação, pode concomitantemente ativar células inflamatórias e alterar a fisiologia normal.

Ambos os eventos podem ser importantes no combate à doença através dos mecanismos de defesa. Em adição, os efeitos sistêmicos associados com inflamação severa podem ser exercidos pela produção exagerada de citocinas e pela manutenção dessa produção pelas próprias citocinas (KUNKEL et al., 1991).

Uma citocina tende a ter múltiplas células alvo e múltiplas funções, no entanto, citocinas diferentes podem ter ações similares. A exposição de células a duas ou mais citocinas diferentes pode levar a respostas qualitativamente diferentes. Além disso, uma citocina pode aumentar ou diminuir a produção de outra citocina ou dela mesma ou até mesmo a expressão de receptores para outra citocina e assim resultar em ações indiretas. Em monócitos tanto TNF como IL-1 agem como agentes estimulatórios com resposta individual, e em adição, eles estimulam a produção um do outro, o que amplifica a resposta individual de ambos (SMITH et al., 1980).

O tecido sinovial é também capaz de sintetizar a citocina IL-6, um fator relevante na inflamação e conseqüente destruição óssea. Por outro lado, a membrana sinovial da osteartrose (AO) aumenta também a síntese de citocinas reguladoras e antiinflamatórias como IL-4, IL-10 e IL-13. Estas citocinas diminuem a produção de IL-1 β (beta), TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e MMPs (metaloproteinases), e aumentam os níveis de TIMP-1(anti-metaloproteinases) e de IL-1Ra (ALAAEDDINE, JOVANOVIC,1999)

A IL-1 β também age influenciando os condrócitos a produzirem quantidades aumentadas de fatores catabólicos como as metaloproteases da matriz (MMPs) (MARTEL-PELLETIER et al., 1998; CRUZ, 1996)

O NO também é um dos mais poderosos indutores da resposta imune, ativando e estimulando, significativamente, a migração de células imunes (FRODE SALEH et al., 1999). Como o sistema monócito/ macrófago é a principal fonte celular da IL-1 β (PELLETIER, BOILEAU, BRUNET, 2004), isto pode levar a um aumento substancial na concentração local de IL-1 β .

Por sua vez, a IL-1 β pode induzir a síntese de potentes ativadores das enzimas, tais como o ativador receptor do plasminogênio semelhante à uroquinase (uPA-r), o qual converte o plasminogênio em plasmina. A plasmina converte pró-metaloproteases (MMPs) inativas para MMPs ativadas (PELLETIER, BOILEAU, BRUNET, 2004), levando a posterior degradação da matriz extracelular, ciclo de regulações visto na figura 3.

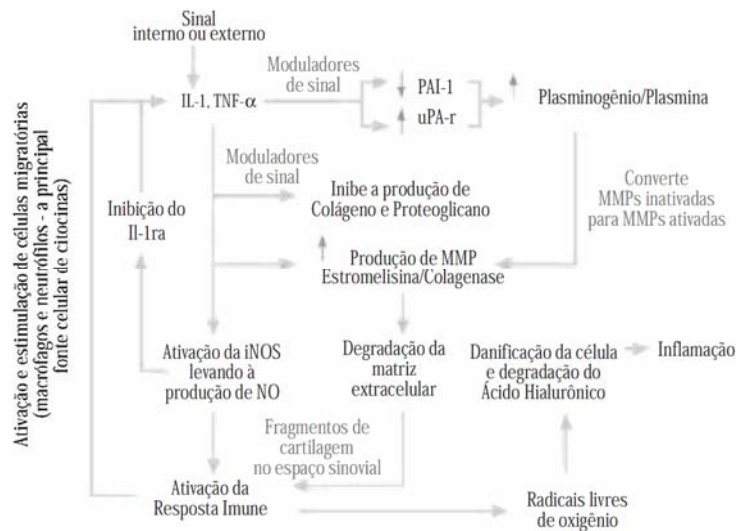


Figura 3: Via catabólica no processo de lesão de células cartilagenosas Fonte: <http://www.trbpharma>

Então essas enzimas zinco-dependentes, denominadas metaloproteases (MMP) ativadas por ação de citocinas podem digerir sinergicamente todas as macromoléculas da matriz. Existem três grupos de metaloproteases: colagenase, gelatinase e estromelina (REYNOLDS, 1996).

Por sua vez as colagenases específicas incluem a MMP-1 (colagenase 1), a MMP-8 (colagenase 2) e a MMP-13 (colagenase 3). Este grupo distinguiu-se dos outros pela sua habilidade para degradar regiões da tripla hélice helicoidais, dos colágenos intersticiais I, II. As gelatinases englobam a MMP-2 (gelatinase A) e a MMP-9 (gelatinase B) e degradam os colágenos tipos IV, V, VII e XI, agindo de forma sinérgica com as colagenases na clivagem dos colágenos degradados. Além disso, degradam elastina, agregans e proteínas de ligação da cartilagem (REYNOLDS, 1996).

Os mais importantes agentes inibitórios das metaloproteases são os inibidores teciduais das metaloproteases (TIMP1, TIMP2 e TIMP3), que se ligam na forma ativa da enzima, formando complexos na proporção de 1:1, e, deste modo, bloqueando sua atividade. No processo artrósico existe um desequilíbrio entre a produção de metaloproteases e seus inibidores, com predomínio das primeiras (DEAN, PELLETIER, HOWELL, 1989).

As mudanças morfológicas observadas na membrana sinovial artrósica nas fases avançadas da doença mostram proliferação de células mononucleares, incluindo linfócitos ativados (T, e em menor grau, B), hiperplasia sinovial, aumento da angiogênese e da osteoclastogênese nas zonas de erosão óssea, muito semelhantes aos encontrados nas artropatias inflamatórias, e em particular na artrite reumatóide. Nestas fases avançadas, libertam-se pequenos fragmentos de colágeno na cavidade articular, assim como microcristais provenientes da degradação da cartilagem, sendo identificados mais frequentemente os de pirofosfato de cálcio e os de hidroxapatita de cálcio (SCHUMACHER, 1995), todos estes fenômenos induzem maior síntese de citocinas inflamatórias pelos fibroblastos e macrófagos, que perpetuam e conduzem a um processo irreversível de degenerescência da cartilagem.

2.3 Alterações na Cartilagem Resultante da inoculação do Zymosan.

O zymosan é um polissacarídeo derivado do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, cuja administração em tecidos promove intensa reação inflamatória.

Originalmente, a (AZy) artrose por zymosan foi descrita por Keystone, em 1977. A injeção intra-articular de zymosan promove sinovite erosiva grave. Na fase aguda, até três dias após a indução, ocorre aumento de permeabilidade vascular e migração celular. A seguir, desenvolve-se sinovite com infiltrado mononuclear e reação fibroblástica lembrando a sinovite crônica que caracteriza o *pannus* reumatóide.

Estudando a fase crônica do modelo, evidencia-se, que até 28 dias após a injeção do zymosan, a sinovite persiste ao lado de intensa proliferação linfomonocitária na sinóvia. Os condrócitos alterados podem ser observados a partir dos 14 dias de artrite, levando à lise da cartilagem articular e do osso subcondral (ROCHA, 1999). Inicialmente, a inflamação associada à injeção do zymosan foi atribuída à ativação do complemento e liberação de enzimas lisossomiais a partir de células inflamatórias migradas para o local.

2.4 Acido L - Ascórbico (Vitamina C) propriedades na biossíntese do colágeno

Atualmente, estão sendo testados em modelos experimentais inibidores sintéticos de metaloproteases com o objetivo de controlar a atividade destas enzimas citadas na imunopatologia, e conseqüentemente, prevenirem a destruição da matriz cartilaginosa. Contudo, estudos desenvolvidos em humanos com estas substâncias têm resultado em uma série de reações adversas, o que tem limitado seu uso.

Entretanto, até o momento, o tratamento desta doença está baseado em drogas direcionadas, predominantemente, para o controle da dor e/ou inflamação associada com sinovite, mas que não reduzem a destruição da cartilagem. Do mesmo modo, a utilização dos denominados condroprotetores não parece ser suficiente para conter o processo de degradação, nem induzir aparentemente a produção da matriz cartilaginosa pelos condrócitos (VELOSA, VALCY, NATALINO, 2003).

Dentre algumas substâncias precursoras de glicosaminoglicanas e proteoglicanas, está o L - Ascórbico (AA) (vitamina C), com representação molecular vista na figura 4.

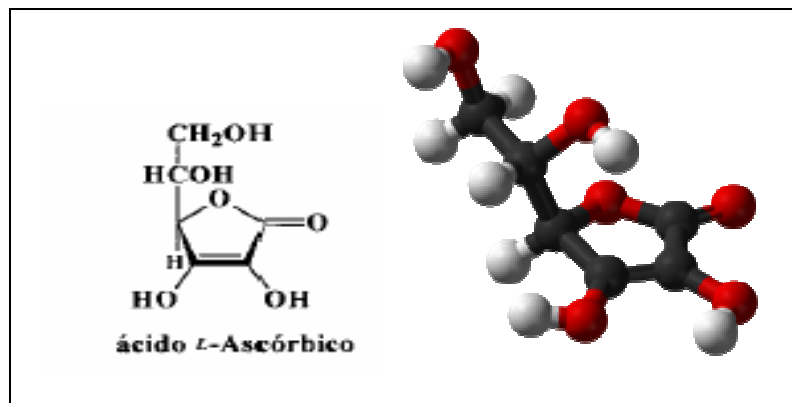


Figura 4: Distribuição química e representação molecular do ácido L – Ascórbico. Fonte: (DAVID, 2005)

O ácido L - Ascórbico é vital para o funcionamento das células, e isso é particularmente evidente no tecido conjuntivo, durante a formação do colágeno. (FENSKE, LOBER, 1986; YAAR, GILCHEREST, 1990). Na pele, colágenos tipos I e III contribuem com 85 a 90% e 8 a 11% do colágeno total sintetizado, respectivamente (SMITH, HOLBROOK, MAORI, 1986).

É também co-fator para duas enzimas essenciais na biossíntese do colágeno. A lisil e a prolil hidroxilases catalisam a hidroxilação dos resíduos prolil e lisil, (enzimas férricas) nos polipeptídeos colágenos, e essas modificações pós-translacionais permitem a formação e estabilização do colágeno de tripla hélice, e sua subsequente secreção no espaço extracelular como procolágeno (PINNEL, MURAD, DARR, 1987). O procolágeno é então transformado em tropocolágeno, e finalmente fibras colágenas são formadas por um rearranjo espacial espontâneo das moléculas tropocolágenas (CHAN, 1990).

Conseqüentemente, a hidroxilação é uma fase crítica na biossíntese de colágeno, uma vez que regula a formação da tripla hélice, da excreção do procolágeno e do “cross-linking” do tropocolágeno. A vitamina C, como co-fator,

previne a oxidação do ferro e, portanto, protege as enzimas contra a auto-inativação. Dessa forma, promove a síntese de uma trama colágena madura e normal por meio da perfeita manutenção da atividade das enzimas lisil e propil hidroxilases (BOYERA, 1998).

O AA estimula a síntese de colágeno especificamente, aumentando os níveis de RNA-m para três diferentes cadeias pró-alfa, codificadas por genes que estão localizados em três cromossomas distintos A pró-alfa 1, no cromossoma 17, (JUNIEN,WELL,MYERS,1982) a pró-alfa no cromossoma 7, e a pró-alfa 3 no cromossoma 2 (EMANUEL et al,1985). Possivelmente, o AA atua diretamente, estimulando a transcrição individual dos genes ou, de alguma maneira, a estabilidade do RNA-m individual.

O L - Ascórbico em percentagens de 5 a 30% foi testada, e os níveis teciduais foram aumentando proporcionalmente à concentração da vitamina. A concentração de 20% foi a responsável pelo nível máximo de vitamina no tecido. Por razões desconhecidas, concentrações acima desse valor resultaram em diminuição dos níveis teciduais do AA. (PINNELL, YANG, OMAR, 2001).

Além do aumento da síntese do colágeno, o ácido ascórbico pode atuar na ativação de interleucinas de modo inespecífico (BOYERA, 1998). Fator pelo qual o presente estudo se propõe a verificar algum tipo de regulação dessas citocinas, seja de papel anti e/ou pró-inflamatório. Esta vitamina está disponível tanto no meio intra como no extra-celular da maior parte dos órgãos e com envolvimento direto nas defesas anti-oxidantes.

Elimina diretamente RLs (radicais livres) de oxigênio e de óxido nítrico e está envolvida na reciclagem de α -tocoferil e α -tocoferol. Embora sua função anti-oxidante seja bem reconhecida, não há evidências claras de real efeito benéfico sobre a função imune.

2.5 Iontoforese: propriedades bioestimulantes

A eletroterapia tem sido utilizada desde 2750 a.C segundo retratos em templos egípcios indicando que já usavam o peixe gato do Nilo (*malopterurus electricus*), com propósitos terapêuticos (LEITÃO, 1967; AGNES, 2004).

Os primeiros relatos sobre o uso de corrente elétrica são descritos na Roma e Grécia antigas para tratamento de cefaléias, nevralgias e outras doenças, onde utilizavam as descargas elétricas do peixe elétrico. Galen (130 a C.) empregava como agente calmante da dor o choque produzido pelo Peixe torpedo ou *Tremelga* que vive no mar Mediterrâneo. As descargas elétricas produzidas por este peixe ocorrem com tensão de 50-80 Volts e frequência da ordem de 200 hz.

Scribonius Largus (46 a C.) relatou o efeito analgésico da estimulação elétrica, manejando peixes elétricos, para tratamento da gota (AGNES, 2004).

O termo eletricidade está intimamente ligado a Tales de Mileto que fez algumas experiências com uma barra de âmbar, uma espécie de resina. Tales verificou que depois de atritada com um pêlo de animal, esta resina adquiria a propriedade de atrair pequenos corpos como penas e cabelos. A palavra âmbar provém do grego *eléktron*. Daí o surgimento da palavra eletricidade (AGNES, 2004).

Otto Van Guericke, que girou uma bola de enxofre solidificado para criar

eletricidade estática em 1672, inventou o primeiro instrumento elétrico feito pelo homem (KIRSCH; MERCOLA, 1995; KIRSCH; LERNER, 1987).

Luigi Galvani aparece como um dos primeiros fisiologistas a investigar as correntes de excitação nervosa. Em 1791 publicou o tratado *De viribus electricitatis im motu muscularis* (sobre a ação da eletricidade no movimento muscular). Alessandro Volta analisando o experimento de Galvani pesquisou a produção de eletricidade por meio químico e, em 1800 construiu a primeira pilha elétrica. Como consequência, a corrente contínua foi batizada decorrente “galvânica” em homenagem ao amigo L. Galvani (AGNE, 2004).

Com a descoberta do fenômeno da indução por Faraday, em 1831, surgiu a possibilidade de estimular músculos e nervos com correntes elétricas alternadas, surgindo os trabalhos de Duchenne de Boulogne, a Lei de Du Bois-Raymond, a Lei de Remarck, e a inversão da fórmula polar de Erb (LIANZA, 1985).

Muitos tratados de eletroterapia registram que um dos autores mais importantes deste ramo da medicina, no século XVI, foi o notável médico da rainha Elizabeth, Willian Gilbert, que escreveu 20 importantes trabalhos sobre o assunto, tornando-se assim o pai da eletroterapia moderna. Estes fundamentos estão descritos na obra “*De Magnete*” (LEITAO, 1979; LIANZA, 1985; AGNE, 2004).

A utilização de corrente elétrica em fraturas teve início em 1841, com Harishome que tratou um paciente com uma pseudoartrose na tíbia, com descargas elétricas diariamente, no espaço entre os ossos por 6 semanas. Em 1850, Lente relatou o caso de três fraturas não consolidadas, tratadas com corrente galvânica por 10 minutos e três vezes por semana, por várias semanas, relatando que essas lesões foram curadas com sucesso. Por razões ainda não muito claras, não

ocorreram relatos de tentativas posteriores de tratamentos por corrente elétrica durante 103 anos (BRIGHTON, 1981).

O interesse foi retomado por Yasuda em 1953, que demonstrou a existência de uma nova formação óssea na vizinhança do cátodo (eletrodo negativo), quando a micro corrente foi aplicada por 3 semanas em fêmur de coelho.

Em 1971, Friedenbergl foi o primeiro a relatar a cura de pseudoartrose com uso de corrente galvânica; e 1974, Basset relatou o uso de estímulos elétricos no tratamento de pseudoartrose com bons resultados (BRIGHTON, 1981). Watson relata que em 1977 comprovou-se auxílio na aceleração de consolidação óssea com uso de micro corrente (WATSON, 1998).

Pequenas cargas elétricas podem ser de grande ajuda na perpetuação das reações eletroquímicas do processo de cura. Nordenstrom (1984) propõe que, a bioeletricidade é conduzida pelo sistema circulatório via capilares, quando uma lesão ocorre, uma carga positiva se instala na área, e apresenta diferença de potencial elétrico servindo como uma bateria bioelétrica pronta para ser ligada.

Esta carga bioelétrica, é então ativada por uma mudança de propriedades elétricas nas membranas capilares. Como as membranas se tornam menos permeáveis para o fluxo de íons, o fluxo intrínseco da bioeletricidade, se propaga pela circulação sangüínea dirigindo-se assim para a área de coágulo (NORDENSTROM, 1984).

Com a descoberta da teoria dos semicondutores, que estão entre um isolante e um condutor de carga elétrica, e transportam pequenas cargas de corrente elétrica (micro corrente e nano corrente), conduzindo esta a longas distâncias, compreendemos o transporte de carga no corpo humano, que antes de 1930 era

obsuro (BECKER, 1985).

As proteínas no tecido humano são semicondutores e todas as moléculas que formam a matriz viva são semicondutores. A teoria dos semicondutores aplicada aos tecidos biológicos foi uma grande descoberta e pode-se através dela compreender que ocorrendo à geração de uma corrente na área de lesão, no corpo esta corrente é conduzida via célula de Schwann e célula glial, que envolvem neurônios, deste modo ativando a reparação tecidual (BECKER, 1981). O colágeno, a proteína mais comum no nosso organismo, pode se comportar como um semicondutor. (MORGAREIDGE; CHIPMAN, 1990).

Um trauma afeta o potencial elétrico das células do tecido lesado onde inicialmente o local atingido tem uma resistência maior do que os tecidos próximos da lesão. O decréscimo do fluxo elétrico na área lesionada diminui a capacitância celular. Esta pode ser uma das razões para as reações inflamatórias. Dor, calor, edema e rubor são características de tecidos inflamados. A eletricidade flui mais lentamente através destes fluídos inflamados. A correta aplicação das micro-correntes em um local lesionado aumenta o fluxo de corrente endógena. Isto permite à área traumatizada recuperar sua capacitância. A resistência deste tecido lesionado é então reduzida permitindo a bioeletricidade entrar para a área a fim de restabelecer a homeostase (SILVA apud WINDSOR, 2006).

A determinação de um mecanismo de administração do ácido ascórbico no tecido biológico também é fator de interesse ao presente estudo, que se propõe mostrar uma nova forma de intervenção minimamente danosa e com possíveis vantagens nos resultados observados em determinada lesão condral. Comparado a outros mecanismos de administração, essa forma é a corrente (galvânica), formato

de onda visto na figura 5.

Segundo Kottke & Lehrmann (1994), a iontoforese envolve a introdução de moléculas ou íons eletricamente carregados no tecido biológico usando um campo elétrico. Como a força do campo elétrico é determinada pela mudança de voltagem por unidade de distância, as forças exercidas sobre os íons em uma situação específica são proporcionais à voltagem aplicada.

É um método eletroquímico que aumenta o transporte de moléculas pela criação de um gradiente potencial através da pele a partir da aplicação de corrente elétrica (Voltagem) Em campos elétricos, a geração do potencial induzirá um aumento da migração de fármacos iônicos por repulsão eletrostática de eletrodo ativo (definido como um eletrodo com a mesma carga iônica que o fármaco isto é, ânodo (+) para fármacos carregados positivamente e cátodo (-) para fármacos carregados negativamente ressaltados por Costello, Jeske (1995).

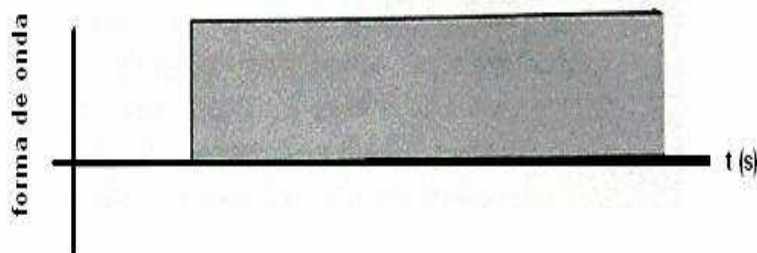


Figura 5: Corrente contínua (galvânica)

Entretanto, trata-se de um método efetivo, indolor e não invasivo para administração de medicamentos, em uma área localizada do tecido através da aplicação de uma corrente elétrica. Usualmente utiliza-se a forma galvânica com

dose superior a 1 mili ampère (mA) com eletrodos embebidos em solução contendo o fármacos (método ativo) por exemplo: passagem de uma corrente positiva, no caso de fármacos carregados positivamente e estes impelidos para dentro do tecido, quando se aplica esta corrente elétrica (COSTELLO e JESKE, 1995) .

De acordo Faraday é possível concluir que quanto maior o tempo de aplicação e a amplitude da corrente, maior será a quantidade transferida do íon.

Também é possível deduzir que quanto menor a amplitude da corrente, maior o tempo de aplicação para que a mesma quantidade do íon seja transferida, ou vice-versa. A relação de amplitude ao longo do tempo sugerida na literatura varia de 20 a 100 mA x minuto 40,35 (mA min), enquanto a Food and Drugs Administration (FDA) sugere 80 mA min como a relação máxima entre amplitude e tempo para aplicações de iontoforese. Assim, são previstas doses de 0,1 a 1 mA por área do eletrodo em centímetros quadrados (cm²), sendo que a relação de 0,3 a 0,5 mA/cm² é a mais descrita em estudos clínicos de iontoforese em humanos (KAHN, 2001; CURDY, 2002 ; NUGROHO, 2004)

Como o tamanho do eletrodo deve ser compatível com a área alvo, eventualmente, as doses calculadas pela densidade de corrente podem atingir valores que predispõem os pacientes a riscos de irritação local pela estimulação de terminações nervosas livres e queimaduras.

No entanto, a dose de segurança não deve ultrapassar 5 mA e o tempo de aplicação total deve ser aumentado proporcionalmente considerando o limite de 100 mAmin. Por exemplo, utilizando eletrodos de 15 cm², uma dose de 7,5 mA seria compatível com a densidade anteriormente proposta, contudo, está acima da dose de segurança. Assim uma dose máxima de até 5 mA, que não promova estimulação

sensorial, deve ser utilizada. Hipoteticamente, se essa dose for de 2 ou 3 mA, o tempo de administração da iontoforese será de 33 ou 50 minutos, respectivamente (BISSCHOP, 2001).

Algumas substâncias ionizáveis utilizadas são: ácido acético, adrenalina, alfaquimotripsina, alfaamucase, betnesol, bicloridrato de histamina, carbonato de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, água corrente, hialuronidase, iodeto de potássio, cetoprofeno, nitrato de aconitina, novocaína, lidocaína, salicilato de lítio, salicilato de sódio, succinato de prednisona, sulfato de atropina, sulfato de zinco, calcitonina, diclofenaco.

A pele constitui uma barreira física que protege o corpo da perda de líquidos e impede a invasão de microrganismos e a entrada de substâncias do meio exterior, incluindo a água (BARRY, 2002). O estrato córneo, correspondente a 10-20 µm (micrômetros) da epiderme, é reconhecido como a principal barreira à transferência transdermal de drogas. Assim, diferentes técnicas para aumento da penetração de várias substâncias através do estrato córneo têm sido testadas (BARRY, 2002).

A introdução de drogas através da pele em direção ao tecido subcutâneo possui três rotas potenciais: (1) o folículo piloso e suas glândulas sebáceas associadas, (2) os ductos sudoríparos e (3) através do próprio estrato córneo, entre seus apêndices e falhas (rota intercelular). No entanto, em decorrência das características hidrofóbica e negativa do estrato córneo e de sua matriz lipoprotéica, drogas ionizadas dificilmente penetram através da pele por difusão passiva em quantidades suficientes para atingir níveis terapêuticos (BARRY, 2002; CURDY, 2000).

O aumento da penetração de drogas ionizáveis por iontoforese quando comparada ao transporte passivo isolado (MOTTA, 2003), de acordo com Curdy et al., 2001 relatam maior penetração de piroxicam por iontoforese em relação à difusão passiva, independente do tempo de aplicação. Assim, o uso de corrente ou diferença de potencial elétrico provê alternativas para aumentar a liberação transdermal de drogas com baixa permeabilidade, principalmente as hidrofílicas e ionizáveis. As principais vias de acesso dos íons transferidos por iontoforese são os poros de glândulas sudoríparas, enquanto o estrato córneo, os pêlos foliculares e as glândulas sebáceas pouco contribuem para a penetração iônica, uma vez que apresentam elevada impedância elétrica relativa (NOLAN, 2003).

Após a penetração inicial, os íons transferidos passam para a circulação capilar através das arteríolas que irrigam a base da glândula. Assim, uma vez transferido para o tecido, o íon ou substância medicamentosa penetra cerca de 1 mm com subsequente absorção capilar e transporte transmembrana (KAHN, 2001)

Essa corrente contínua é o processo pelo qual íons de soluções são transferidos através da pele intacta, usando de correntes elétricas monofásicas, polarizadas e contínuas. O sistema de administração de drogas por iontoforese é usado comumente em experimentos e, estes demonstraram resultados significativos, com o aumento de concentração das substâncias administradas na pele, levando aos resultados almejados (ASAI, 2002).

2.6 Modelos de avaliação do dano a Cartilagem

2.6.1 Dosagens bioquímicas no dano a cartilagem

As dosagens bioquímicas são utilizadas para se estabelecer parâmetros sobre mudanças metabólicas de um organismo vivo seja ele animal ou humano, deste modo, algumas dosagens enzimáticas nos habilitam a dizer se um organismo está sofrendo um processo lesivo, ou um “turnover celular”.

A fim de afirmar uma possível lesão tecidual induzida, além da metodologia visual por histologia, tem-se a possibilidade da obtenção da quantificação de enzimas como LDH, que de acordo com Neves (2006) exemplifica que, em lesões teciduais por hipoxemia adota a dosagem de LDH no início e final do experimento como resultado significativo entre fígados normais e pré-lesados pelo aumento desta mesma enzima.

Bem como a fosfatase alcalina onde sua dosagem no soro é empregada principalmente para avaliar doenças ósseas. Esta enzima é encontrada em vários tecidos, com maiores concentrações no fígado, no epitélio do trato biliar e no osso. A mucosa intestinal e a placenta contêm também a fosfatase alcalina apresentando várias isoenzimas, sendo que cada uma das fontes produtoras contém uma isoenzima específica. Têm-se características de valores elevados: a cirrose, obstrução biliar intra e extra-hepática, tumor primário ou metastático do fígado, tumor metastático do osso, recuperação de fraturas ósseas, doença de Paget, hiperparatireoidismo, fases de crescimento normal dos ossos e observam-se valores

diminuídos em casos de: hipotireoidismo, hipofosfatemia, desnutrição, doença celíaca (MATOS, 1996).

Intrinsecamente ligado ao metabolismo do cálcio está a fosfatase alcalina, que além de ser muito importante na maioria das reações que envolvem a coagulação sanguínea, também regula a excitabilidade das fibras musculares. Sua concentração no soro está relacionada à ação de fatores como níveis de paratormônio, vitamina D e fósforo, sendo que diferentes patologias relacionadas ao metabolismo do cálcio podem ser verificadas, como má absorção, deficiência de vitamina D no caso da hipocalcemia e neoplasias ósseas, e até mesmo intoxicação com vitamina D na hipercalcemia e em degenerações ósseas devido ao turnover celular (MORGAN, 1993).

2.6.2 Ensaio Imunológico no dano a cartilagem

Modelos animais utilizados para o estudo de processos degenerativos da cartilagem dependem no final, de um protocolo de tratamento e de uma avaliação dessas condições. Entretanto, algumas alterações são parcialmente observadas, o que torna esse modelo complexo. Porém, mesmo com essas aparentes regenerações e reparações, alterações funcionais permanecem após períodos de tratamento. As alterações bioquímicas e metabólicas e suas relações com a função ainda não são conclusivas (LEROUX et al., 2001; NARMONEVA et al., 2002).

Assim, a cascata inflamatória e a liberação de mediadores que modulam o processo lesivo para resolução ou para piora do quadro clínico é de importância

sumária neste processo. Neste âmbito os ensaios imunológicos contribuem para o entendimento da progressão dessas lesões, onde os condrócitos ficam expostos a estímulos que alteram seu comportamento metabólico. Assim fragmentos de proteoglicanas e colágeno derivados de uma lesão condral quando caem no líquido sinovial, passam agir como neo-antígenos gerando efeitos irritativos estimulando sinoviocitos que passam a sintetizar citocinas catabólicas (IL-1 α IL-1 β e TNF α) essas vão interagir com as células cartilaginosas estimulando ainda mais a produção de proteases, havendo assim um aumento de degradação, crescendo assim proporcionalmente a quantidade de fragmentos, que voltam assim estimular as células sinoviais fechando um ciclo que pode protelar o processo artrósico (FELICE , HUZIKER, 2002).

Por isso a dosagem dessas citocinas se faz necessária como controle observacional imunológico da evolução ou remissão de uma injúria condral.

2.6.3 Histologia na avaliação do dano a cartilagem

Considerando que o parâmetro de análise histopatológica das alterações induzidas experimentalmente é um dos mais fiéis, uma vez que traduz as diversas alterações celulares ocorridas ao longo do tempo, fornecendo informações passíveis de serem documentadas para comparações arquivadas em fotografias, em lâminas e em blocos parafinados, este estudo contribui com descrições da lesão da cartilagem causada por Zy, e as características da mesma frente aos grupos tratamento na articulação do joelho de ratos Wistar.

A comprovação de condroagressão, através desse tipo de estudo acaba sendo outro parâmetro importante para descrição de artrites experimentais, sendo também investigados e comparados com as alterações detectadas nos achados bioquímicos e imunológicos da lesão.

Segundo Ostergaard et al., (1999) a histopatologia da OA é geralmente graduada através do Sistema de Graduação Histológico-Histoquímico para cartilagem articular osteoartrítica (SGHH) proposto por Mankin et al., (1971), ou outros sistemas de graduação histopatológicos modificados deste. Recentemente, esse sistema e suas modificações têm sido extensivamente utilizados também em modelos animais (OSTERGAARD, 1999). Entretanto, após investigar a reprodutibilidade intra e inter-observador os mesmos autores afirmam que ainda não existe um sistema “Padrão Ouro” para avaliação histológica da cartilagem articular.

Em um estudo sobre alteração mecânica e histomorfométrica após imobilização articular, esses autores, elaboraram um esquema de graduação qualitativa aplicável a essa situação (MANKIN, 1971).

Entretanto, nesse sistema a presença de clones é mais detalhadamente descrita. LeRoux et al., (2001) apresentaram um item chamado clone de condrócitos que classificaram da seguinte forma: ausência, pares ocasionais, pares densos e aglomerados de clones. Além da avaliação de clones, os autores propõem a observação de fibrilação e fendas da cartilagem articular, além de micro rupturas da cartilagem calcificada e osso subcondral.

3-OBJETIVOS

3.1 Geral

Verificar a resposta imuno-bioquímica e avaliar microscopicamente a cartilagem articular de ratos artrose induzidos, frente ao tratamento com iontoforese na presença e ausência de ácido L - ascórbico.

3.2 Específicos

1-Determinar: degradação condral e a esperada manutenção da mesma pelo ácido ascórbico nas diferentes aplicações gavagem, e iontoforese.

2-Determinar: níveis séricos de interleucina IL-10 a fim de observar um possível controle inibitório sobre a lesão.

3-Determinar: níveis séricos da enzima Lactato Desidrogenase (LDH), íons Cálcio (Ca^{2+}) da enzima fosfatase alcalina (FS) visando detecção de possíveis alterações no metabolismo ósseo.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4. 1 Animais

Foram utilizados 36 ratos (*Norvergicus albinus*, *Wistar*) clinicamente sadios, machos, adultos, da mesma linhagem, de (250-300g) de aproximadamente 16 a 20 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista Campus Botucatu, e mantidos em biotério próprio na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UNESP - Campus Jaboticabal, em temperatura controlada, alimentados com ração industrial e água *ad libitum*. Os animais para esse estudo foram agrupados e mantidos em gaiolas plásticas padrão, 3 animais por gaiola, condições ambientais controladas (luminosidade 12h ciclo de claro escuro), permanecendo neste local para protocolo de tratamento até o sacrifício. Aprovado pela comissão de ética e bem estar animal (CEBEA), protocolo numero (015994-07) (ANEXO I).

4.2 Grupos Experimentais

Os animais foram separados em grupos, denominados por siglas, contendo 6 animais cada um.

Grupo (IFSF): Ministrado injeção Zymosan (*Saccharomyces cerevisiae*, Sigma Chemical Co.), seguido de tratamento com iontoforese salina 1ml (SF), (corrente galvânica), 1 mA miliamper por 10 min, após tricotomia e anti-sepsia, tratamento 1 vez/dia durante 10 dias.

Grupo (IFAA): Ministrado injeção Zymosan, seguido de tratamento recebendo ácido ascórbico (MERK®) por iontoforese (corrente galvânica), a 1mA miliamper por 10 min após tricotomia e anti-sepsia na concentração de 100mg/kg em 1ml(SF), 1 vez/dia durante 10 dias.

Grupo (GSF): Ministrado injeção Zymosan, seguido de tratamento recebendo gavagem salina, 1ml (SF) 1 vez ao dia durante 10 dias.

Grupo (GAA): Ministrado injeção Zymosan, seguido de tratamento recebendo ácido ascórbico por gavagem, na concentração de 100mg/kg¹ em 1ml(SF), 1 vez /dia durante 10 dias.

Grupo (C+): Ministrado injeção Zymosan e sem terapia.

Grupo (C-): sem intervenção.

¹*Efeito do ácido ascórbico na microscopia de feridas cutâneas abertas de ratos submetidos à dieta aprotéica que foram tratados com vitamina C sempre solubilizada em solução fisiológica estéril 9% obtiveram uma crosta fibrino-hemática mais espessa e maior proliferação de tecido conjuntivo fibroso se comparado aos tratados com soro(Brito, 2003)*

4.3 Pesagem dos Animais e indução anestésica.

Previamente os ratos foram pesados em balança, analítica TOLEDO, e, em seguida, anestesiados proporcionalmente a massa corporal, com uma associação de ketamina (95mg/kg) e xilazina (12mg/kg), injetada por via intraperitoneal, utilizando uma seringa de insulina, para que em seguida passassem pelo protocolo de indução da artrose. Os animais foram contidos conforme o procedimento padrão e a agulha foi introduzida no quadrante inferior direito (evitando linha média) em direção à região cefálica. Aspirou-se um pouco para confirmar que não perfurou vaso sangüíneo ou alça intestinal. Todos os animais foram pesados ao final do experimento.

4.4 Protocolo de Indução da Artrose.

Zymosan (Zy) é um polissacarídeo derivado da parede do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, uma substância indutora de fenômenos sistêmicos, largamente empregada em estudos farmacológicos, tendo sido bastante empregado em estudos de indução a osteoartrose (RAMOS, 2001).

A indução da artrose foi feita utilizando 1mg de Zymosan dissolvido em 5µl de solução fisiológica estéril a 0,9%, de acordo com Rocha (1999), sendo cuidadosamente injetado na interlinha articular do joelho esquerdo, (após tricotomia e anti-sepsia com Polvidona) pela face medial, logo abaixo do ligamento femoro-patelar, tentando evitar extravasamento pelos tecidos adjacentes, de tal sorte que a

totalidade da solução permanecesse dentro da cavidade sendo dose única, com finalidade da promoção do processo inflamatório e posterior degradação condral, utilizado para tal, agulha de insulina, como mostrado na figura 6.



Figura 6: Foto do procedimento de Indução da osteoartrose no joelho esquerdo de ratos machos albinos wistar após lateralização da patela.

Todos os procedimentos cirúrgicos e tratamentos foram conduzidos de acordo com o *The guide for the care and use of laboratory animals* (DHEW Publication, Bethesda, MD, EUA, 1980).

Segundo Ramos (2001) em seu estudo realizou-se a quantificação dos glicosaminoglicanos após a injeção intra-articular de zymosan (Zy-1 mg) o controle utilizado recebeu salina e as amostras de cartilagem foram retiradas e a quantidade de glicosaminoglicanos (GAGs) analisadas por densitometria (525nm) após digestão protéica e eletroforese em gel de agarose. Os dados representaram $p < 005$ em relação ao controle, 24 horas, 72 horas, 14 dias, 28 dias respectivamente após a indução houve redução das GAG em 11,2 10,1 6,8 5* 3,2* mostrando assim que o

Zy e eficaz na indução de osteoartrose após o tempo indicado .

Assim os animais ficaram em repouso por 14 dias para instalação do processo inflamatório e degradação condral.

4.5 Protocolos de Tratamento com Acido ascórbico por Iontoforese e Gavagem.

4.5.1 Iontoforese

Após a indução anestésica por Xylasina e Ketamina os animais foram posicionados em superfície plana com extensão dos membros e realizou-se subsequente tricotomia digital no dorso dos mesmos advindo então à realização da iontoforese.

Os animais do grupo 1 foram utilizados como controle recebendo colocação de um eletrododo (3,0x 5,0 cm), e um probe aplicador (1,0X1,0cm) do eletroestimulador (*Dyadinaction standard* KW eletrônica Campinas SP- Brasil), respectivamente no dorso do animal e no joelho esquerdo sendo, que o eletrodo da dorso foi conectado ao ânodo (pólo positivo) e o do joelho ao cátodo (pólo negativo) polaridade descrita de acordo com Green (1996). Entre os eletrodos e a pele dos animais foram interpostas almofadas de gaze umedecidas com 1ml de solução fisiológica (SF) e, estas permaneceram nesta posição durante 10 minutos, o eletroestimulador emitiu corrente contínua com amplitude de 1mA, e tal tratamento foi aplicado durante 10 dias.



Figura 7: Foto do procedimento de lontoforese em ratos machos albinos wistar, onde se observa o eletrodo positivo no dorso e o eletrodo negativo contendo acido ascórbico no joelho esquerdo do animal.

Os animais do grupo 2 foram, também, submetidos aos mesmos procedimentos realizados no grupo 1, substituindo-se a (SF), encontrada na almofada de gaze sob o eletrodo negativo por 100mg/kg de acido *L*-ascórbico solubilizado em 1ml de (SF).O tratamento foi aplicado durante 10 dias como mostra a figura 7.

4.5.2 Gavagem

Sem indução anestésica, um tubo metálico, de diâmetro de 3 mm, ligado a uma seringa de insulina, foi introduzido através do esôfago dos roedores. Os animais foram elevados da bancada após o pinçamento na base do pescoço com a mão esquerda, deixando-se o peso do corpo alinhar ao tronco com a força da gravidade. Naturalmente o rato abre a boca e a cânula pode ser introduzida, ao ser conduzida a

partir do lado da boca do animal, assim o grupo 3 recebeu gavagem na proporção de (1ml de SF) e o grupo 4 gavagem de 100mg/kg de ácido ascórbico(MERK®) solubilizado em 1ml de (SF). Tratamento realizado durante 10 dias, como mostrado na figura 8.



Figura 8: Foto do procedimento de gavagem em ratos machos albinos wistar, demonstrando o posicionamento da agulha e seringa.

4.6 Coleta e Separação do Material para Análise

4.6.1 Sangue

Após a indução e tratamentos especificados descritos nos itens 3.5.1 e 3.5.2, os animais foram levemente anestesiados com éter levando, foram coletadas por punção cardíaca, que possibilita um volume maior de sangue. Imobilizou-se a cabeça do animal pinçando o crânio entre o polegar e o indicador da mão esquerda e, introduziu-se a seringa no mediastino pós palpação da pulsação cardíaca. Foi possível obter volumes de 0,5 a 1 ml de sangue utilizando seringa e agulha comuns,

que foram armazenadas em tubos (*Vacutete Serum Sep Clot Activator* capacidade 4 ml) . O soro foi separado após centrifugação das amostras a 2500 (RPM) rotações por minuto por 10 minutos em centrífuga de bancada Excelsa® II Modelo 206 BL. Após estes procedimentos a amostragem foi acondicionada em freezer -80⁰ graus até posteriores dosagens bioquímicas e imunológicas.

4.6.2 Patas

Após a coleta de amostras de sangue, os ratos foram sacrificados através de decapitação e após exanguinação foi realizando a desarticulação do quadril para remoção das patas, que foram devidamente armazenadas, em frascos corretamente identificados, contendo formol 10%, em temperatura ambiente. Todos os esforços foram empregados para minimizar o sofrimento dos animais e limitar o número necessário às investigações.

Este material foi armazenado e utilizado posteriormente para análise histológica, no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UNESP de Jaboticabal.

4.7 Análise bioquímica de íons cálcio (Ca), fosfatase alcalina (FS) e lactato desidrogenase (LDH).

A determinação dos níveis de íons cálcio (Ca^{2+}), fosfatase alcalina (FA), lactato desidrogenase (LDH) no sangue, foram realizadas: i) por reação de íons cálcio com arsenato III formando um complexo de cor azul, e as medidas foram feitas a 650nm, utilizando um fotolorímetro; ii) por reação catalítica da enzima fosfatase alcalina sobre o p-nitrofenilfosfato (incolor). Produzindo por hidrólise íons fosfato e p-nitrofenol, que em pH alcalino apresenta cor característica (absorção a 405nm). A velocidade inicial de reação foi determinada pela formação do produto quanto tempo tende a zero; e iii), no caso da enzima lactato desidrogenase, utilizou-se como substrato o piruvato e a coenzima NADH. A reação foi seguida pela formação da coenzima oxidada NAD^+ à 340nm.

Todos os ensaios foram feitos com kits *Wiener Laboratórios S.A.I.C.* todas as leituras foram realizadas no aparelho fotolorímetro *Wiener lab. Metrolab 2300 plus Random Access Clinical Analyzer* (ANEXO II).

4.8 Análise Imunoenzimática de interleucina IL-10

A análise imunoenzimática foi realizada através da dosagem dos níveis séricos por metodologia de citometria de fluxo por tecnologia Luminex.

A Tecnologia Luminex™ xMAP envolve um processo exclusivo que cora microesferas de látex com dois fluoróforos. Utilizando proporções precisas de dois

fluoróforos, podem ser criados 100 conjuntos diferentes de microesferas onde cada uma delas com uma assinatura baseada em “código de cores” e que podem ser identificadas pelo instrumento. Os kits LINCOpTMlex foram desenvolvidos com estas microesferas e se fundamentam no imunoensaio.

Anticorpos de captura específicos para cada analito estão imobilizados nas microesferas através de ligações covalentes não reversíveis. Depois que o analito (amostra) se liga aos anticorpos de captura localizados na superfície das microesferas, a detecção final é feita através de um terceiro marcador fluorescente, ficoeritrina ligada ao anticorpo de detecção. O resultado final é um ensaio “sanduíche” realizado através de microesferas. O equipamento Luminex 100 movimenta estas esferas em fila única através de feixes de dois lasers diferentes em um citômetro de fluxo. O primeiro feixe de laser detecta (classifica) a microesfera (o código de cor para o ensaio) e o segundo laser quantifica o sinal. As dosagens foram realizadas em colaboração com empresa gênese produtos diagnósticos onde esta possuía o equipamento necessário.

4.9 Análise Histológica da Cartilagem

A comprovação de condroagressão, através desse tipo de estudo acaba sendo parâmetro importante para descrição de artrites experimentais, sendo também investigados e comparados com as alterações detectadas nos aspectos bioquímicos e imunológicos da lesão.

As extremidades proximais dos fêmures foram removidas cirurgicamente, sendo fixadas em formol a 10%. As partes ósseas foram descalcificadas em ácido nítrico a 7,5% por quatro horas. Seguiu inclusão em histosec (ANEXO III) onde cada peça passou por um corte no plano sagital perpendicular a superfície articular da articulação do joelho, cortes estes de 5 μ m, visto na figura 9.

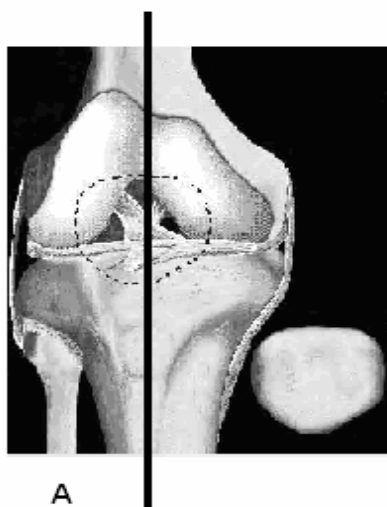


Figura 9: Desenho esquemático dos cortes realizados na articulação do joelho. A: Linha divisória entre as regiões medial e lateral, vista anterior.

De cada bloco foram feitos seis cortes seriados de 5 μ m de espessura com intervalo de 50 μ m entre os cortes.

Foi utilizado Micrótomo Leica RM2255. Foram obtidos, então, um total de 6 cortes da região central do joelho para cada coloração utilizada. Para a análise histológica e da cartilagem articular, as lâminas foram coradas respectivamente por Hematoxilina-Eosina (ANEXO IV) e por coloração Tricromico de Masson (ANEXO V).

Para classificação do número e tipos celulares na graduação histológica (nos grupos de 1 a 6), foi utilizado no presente estudo, a tabela de LeRoux et al, 2001 (ANEXO VI) adaptado para nossos estudos de classificação de danos histomorfométricos na cartilagem articular após imobilização e dano artrósico para determinação qualitativa descritiva.

Todas as lâminas foram avaliadas através de microscopia de luz por dois observadores, sempre os mesmos. Previamente à avaliação foi realizado um estudo piloto para observação da estrutura da cartilagem articular do joelho de ratos normais e osteoartrósicos e para treinamento dos observadores com relação aos parâmetros a serem avaliados.

A variável celularidade foi avaliada qualitativa e quantitativamente a partir dos cortes corados com H&E e Tricrômico de Masson, os cortes dos joelhos dos ratos controle negativo foram utilizados como parâmetro de normalidade para comparação com todos os grupos do experimento ao longo das avaliações. O tecido foi avaliado ao longo de toda sua extensão, partindo de um menor aumento (20X) até a avaliação campo por campo, ainda de toda extensão, com aumento de 40X.

No que se refere a análise qualitativa, foi considerado hiper celularidade o corte histológico que continha dois campos com a celularidade aumentada e sendo esses dois campos com alterações na seqüência das zonas condrais hiper celularidade difusa.

Para hipocelularidade a redução celular em detrimento ao observado no grupo controle negativo do piloto (LEROUX, 2001).

Clone foi definido como a presença de mais de um condrócito dentro de uma mesma lacuna na zona superficial da cartilagem (LEROUX, 2001). Foi considerada como ausência de clones a presença de até três clones ao longo do tecido, recebendo assim graduação zero na tabela.

Não foi encontrado dado na literatura referente à presença de clones na cartilagem articular normal, esses grupos isógenos aparecem em cartilagem que passam por processo de tentativa de reparo.

A espessura da cartilagem é considerada de características normais quanto se tem uma diferença entre a cartilagem calcificada e a não calcificada de menor para maior respectivamente, não tendo este padrão sugere-se alterada (VANWANSEELE et al., 2002).

Quanto à análise quantitativa utilizou-se a contagem por área, determinada como padrão de $700,09 \mu\text{m}^2$, através de um software (FISIOMETER) dotado do princípio da fotomicrografia (ANEXO VII), sempre baseado no valor de referência da barra de $50\mu\text{m}$ para calibração de cada foto, deste modo contou-se manualmente o número de células quanto ao critério pretendido dentro do quadrante respectivo, critério este a celularidade e clones de condrocitos na área central da cartilagem. Verificou-se também a medida em μm da camada calcificada e não calcificada da cartilagem dos diferentes grupos.

5- ANÁLISE ESTATÍSTICA

A organização e o preparo dos dados para análise estatística foram realizados utilizando o programa computacional SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA), o delineamento utilizado para análise das variáveis celularidade, clones de condrócitos, espessura da cartilagem calcificada e espessura da cartilagem não calcificada, percentis de cálcio, fosfatase alcalina, lactato desidrogenase e interleucinas foi o delineamento inteiramente casualizado (DIC). O método da análise de variância foi realizado e este pode ser visto como uma extensão do teste t de student para amostras independentes. Como no teste t de amostras independentes, o método da ANOVA compara uma medida da magnitude, variabilidade observada dentro das k amostras com uma medida da variabilidade entre as médias das k amostras.

O teste Levene foi aplicado para observar a homogeneidade de variância intra-grupo em relação aos tratamentos, adotando-se $p > 0,05$ como significativo

Por fim o teste Tukey também foi aplicado para verificação de quais tratamentos são diferentes, adotando-se $p < 0,05$ como significativo.

6-RESULTADOS

6.1 Pesos dos Animais

As médias, desvios padrão e variação dos pesos ao início e final do experimento está ilustrada na tabela 1. Todos os grupos apresentaram aumento médio de peso ao final do experimento.

Tabela 1: Peso dos animais (g) no início e final do experimento

Ratos/ Pesos	C-		C+		GSF		GAA		IFSF		IFAA	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
1	255	478	250	388	250	362	210	390	234	388	235	398
2	260	480	230	382	220	330	215	380	244	370	250	390
3	250	477	230	380	230	340	210	378	250	360	250	396
4	230	460	240	390	240	350	210	376	270	375	275	395
5	244	390	225	360	250	355	220	382	240	360	240	350
6	235	385	230	378	230	345	222	385	230	365	238	355
Média	245,6	445	234.1	379.6	236.6	347	214.5	381	244.6	369.6	248	380
D. P	11.6	45.1	9.1	10.6	12.1	11.3	5.4	5.0	14.2	10.7	14.6	22.0

6.2 Análise estatística e qualitativa da celularidade e Espessuras da Cartilagem em H&E.

De acordo com a análise estatística da tabela 2 observou-se que o modelo quando ao R² considerado absorveu 91,4% da variabilidade dos dados, em uma distribuição, isto é, verificou-se que os tratamentos nos ratos foram significativos ao nível de 5% considerando celularidade, ($p < 0,05$), Ou seja, o resultado dos tratamentos foi diferente quanto à celularidade. Assim sabendo que os tratamentos são diferentes, realizou-se um teste de Tukey.

Tabela 2: Dados dos valores do numero de células/ μm^2 , obtidas em relação a cada animal nos grupos C⁺ controle positivo; C⁻ controle negativo; GSF gavagem soro fisiológico; GAA gavagem acido ascórbico IFSF iontoforese soro fisiológico; IFAA iontoforese acido ascórbico.

Ratos/grupos	C-	C+	GSF	GAA	IFSF	IFAA
1	47	10	60	50	65	42
2	40	12	65	47	78	40
3	38	9	58	52	62	33
4	35	11	55	49	53	39
5	44	17	52	45	61	50
6	46	19	62	57	60	37
Média	41.6	13	58.6	50	63.1	40.1
D.P	4.7	3.6	4.7	4.1	8.2	5.7

Quando comparada a celularidade entre os diferentes grupos da tabela acima foi observado que apenas os grupos C- e IFAA considerados iguais estatisticamente, de médias (41.6 e $40.1\mu\text{m}^2$) $p < 0,001$ apresentam celularidade significativamente normal conforme ilustrado respectivamente nas figuras (10A e 11B). Os grupos IFSF, GSF, GAA obtiveram médias (63.1 , 58.6 e $50.0\mu\text{m}^2$) $p < 0,001$ com características de hiper celularidade, hiper celularidade difusa e hiper celularidade, nesta ordem visto nas figuras (10 C, 10 D, 11 A). Todavia o tratamento C+ (controle positivo) apresentou resultado diferente dos demais com menor média ($13.0\mu\text{m}^2$) $p < 0,001$ quanto a número de condrócitos, apresentando hipocelularidade encontrado na figura (10 B).

De acordo com o Teste de Levene também aplicado, verificou-se que há homogeneidade de variância em relação a variável celularidade, ou seja, há variância constante intra-grupo $p = 0,48$.

De acordo com a análise estatística da tabela 3 observou-se que o modelo quanto ao R^2 considerado absorveu 96,2% da variabilidade dos dados. Neste teste,

verificou-se que o tratamento nos ratos foi significativo ao nível de 5%, ($p < 0,05$). Ou seja, o resultado dos tratamentos foi diferente com relação à cartilagem calcificada.

Tabela 3: Dados dos valores obtidos para a variável espessura da cartilagem calcificada, em micrometros (μm), em relação a cada animal e média, nos grupos C⁺ controle positivo; C⁻ controle negativo; GSF gavagem soro fisiológico; GAA gavagem ácido ascórbico IFSF iontoforese soro fisiológico; IFAA iontoforese ácido ascórbico .

Ratos/grupos	C-	C+	GSF	GAA	IFSF	IFAA
1	38.34	100.74	167.74	31.49	26.32	21.60
2	31.78	111.26	150.21	47.97	28.77	20.32
3	40.91	123.11	132.76	32.00	34.00	24.75
4	49.31	95.51	160.00	76.87	25.90	21.00
5	41.98	107.82	155.65	34.22	27.00	23.53
6	35.34	90.77	168.90	38.58	29.11	18.92
Média	39.6	104.8	155.8	43.5	28.5	21.6
D.P	6	11.7	13.3	17.4	2.9	1.9

Sabendo que os tratamentos são diferentes, realizou-se um teste de Tukey. Verificou-se na tabela acima que o C⁺ e GSF apresentaram maior média (104.8 μm e 155.8 μm) $p < 0,001$ respectivamente, não sendo estatisticamente igual a nenhum outro podendo ser vistas nas figuras (10B, 10 D) com uma maior espessura de cartilagem calcificada. Nos grupos GAA, C⁻, IFSF e IFAA se observaram menores médias de cartilagem calcificada respectivas de (43.5, 39.6, 28.5 μm e 21.6 μm) $p < 0,001$, assim com menores espessuras de cartilagem calcificada, apresentado nas figuras (11A, 10A, 10C, e 11B).

De acordo com o Teste de Levene também aplicado, verificou-se que há homogeneidade de variância em relação a variável espessura de cartilagem calcificada, ou seja, não rejeitamos a hipótese nula de homocedasticidade há variância constante intra-grupo $p = 0,22$.

De acordo com a análise estatística da tabela 4 observou-se que o modelo quando ao R² considerado absorveu 93,17% da variabilidade dos dados.

Neste teste, verificou-se que o tratamento nos ratos foi significativo ao nível de 5% considerando espessura de cartilagem não calcificada, (p< 0,05), ou seja, os tratamentos foram diferentes.

Tabela 4: Dados dos valores obtidos para a variável espessura da cartilagem não calcificada, em micrometros (µm), em relação a cada animal e média, nos grupos C⁺ controle positivo; C⁻ controle negativo; GSF gavagem soro fisiológico; GAA gavagem ácido ascórbico IFSF iontoforese soro fisiológico; IFAA iontoforese ácido ascórbico .

Ratos/grupos	C-	C+	GSF	GAA	IFSF	IFAA
1	134.13	54.35	157.70	84.27	98.20	71.92
2	122.42	60.12	132.80	81.00	90.00	78.32
3	130.11	38.00	143.21	79.81	102.87	57.09
4	129.45	50.76	139.83	92.34	83.99	89.96
5	150.32	45.09	140.21	89.22	90.45	76.88
6	138.21	71.89	155.00	97.31	85.80	79.06
Média	134.1	53.3	144.7	87.3	91.8	75.5
D.P	9.5	11.8	9.6	6.8	7.2	10.8

Sabendo que os tratamentos são diferentes, realizou-se um teste de Tukey. Verificou-se na tabela acima que o C⁺ apresenta menor média (53.3µm) p<0,001, assim uma menor espessura de cartilagem não calcificada, não sendo igual a nenhum outro tratamento conforme ilustrado na figura (10B). Os tratamentos GSF e C⁻ obtiveram maiores médias respectivamente (144.7, 134.1µm) p<0,001 assim uma maior espessura, como visto nas figuras (10D, 10A). Nos grupos IFSF, GAA e IFAA obteve-se médias (91.8, 87.3, 75.5µm) p<0,001. Caracterizando menor espessura como mostrado nas figuras (10 C, 11A, 11B) se comparadas a do grupo controle positivo.

De acordo com o Teste de Levene há homogeneidade de variância em relação a variável cartilagem não calcificada, ou seja, não rejeitamos a hipótese nula de homocedasticidade há variância constante intra-grupo $p=0,74$.

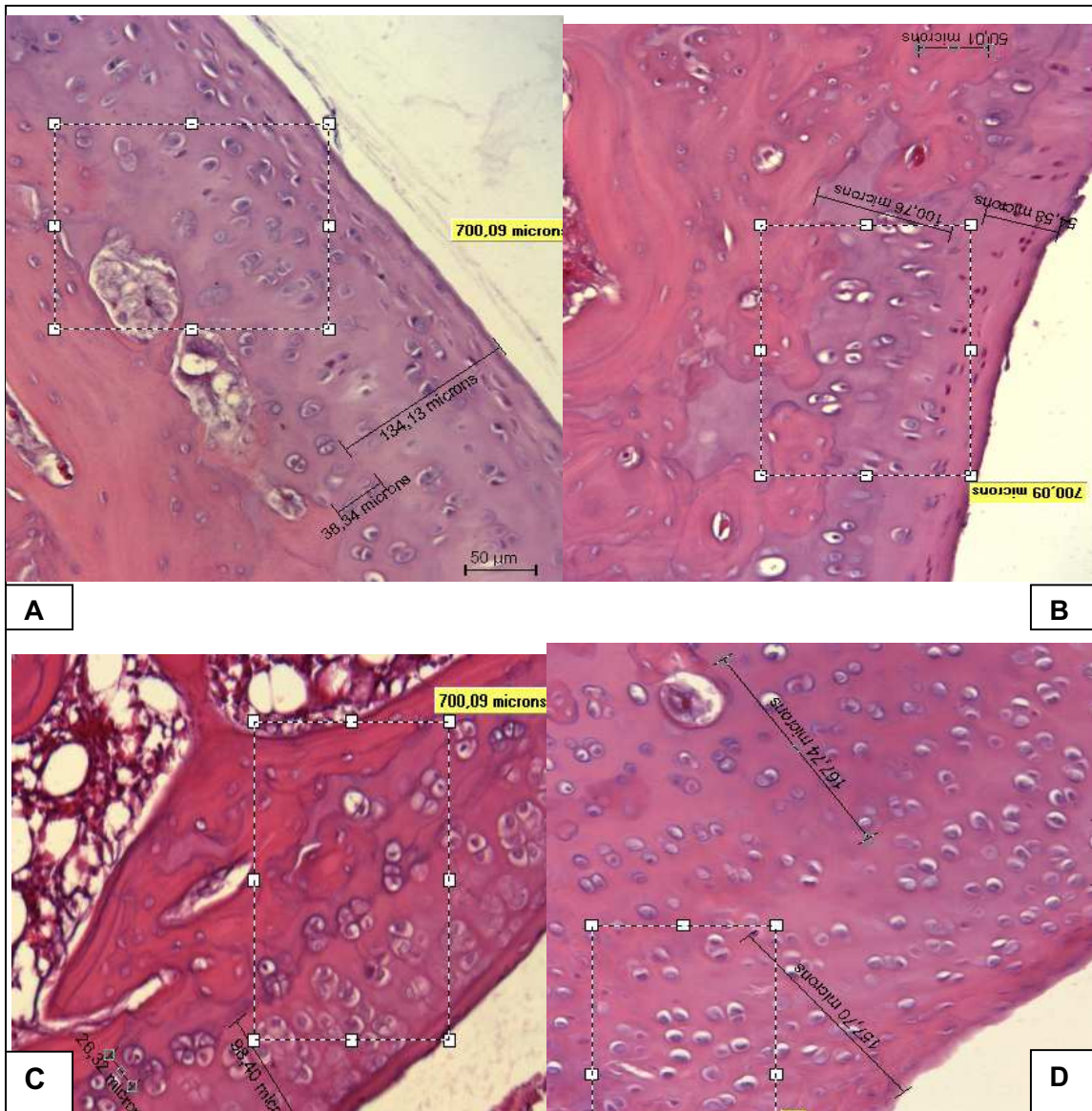
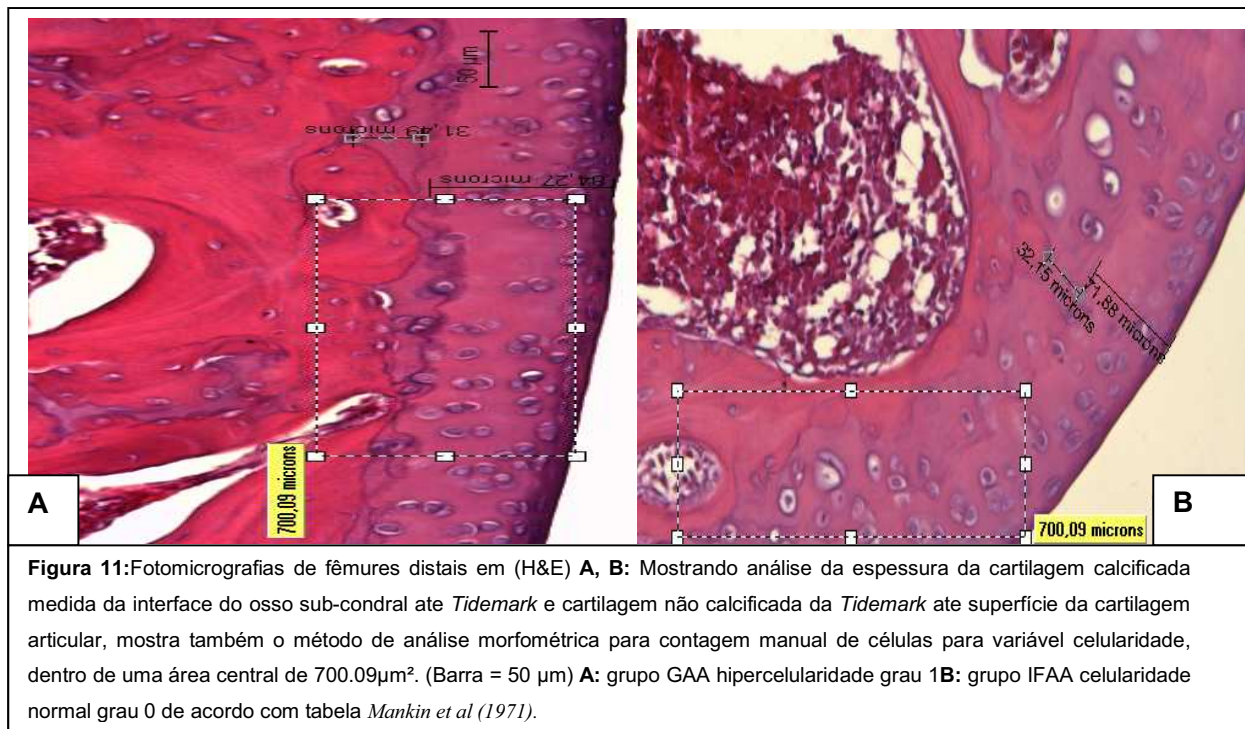


Figura 10: Fotomicrografias de fêmures distais em (H&E) **A, B, C, D:** Mostrando análise da espessura da cartilagem calcificada medida da interface do osso sub-condral até *Tidemark* e cartilagem não calcificada da *Tidemark* ate superfície da cartilagem articular, mostra também o método de análise morfométrica para contagem manual de células para variável celularidade, dentro de uma área central de $700.09\mu\text{m}^2$. (Barra = $50\mu\text{m}$). **A:** grupo C- celularidade normal grau 0, **B:** Grupo C+ hipocelularidade grau 3, **C:** Grupo IFSF hiper celularidade grau 1 **D:** grupo GSF hiper celularidade difusa grau 2, de acordo com tabela *Mankin et al (1971)*.



6.3 Análise estatística e qualitativa de Clones de Condrócito em Tricrômico de Masson

De acordo com a análise estatística da tabela 2 observou-se que o modelo quando ao R^2 considerado absorveu 93,37% da variabilidade dos dados. Neste teste, verificou-se que o tratamento nos ratos foi significativo ao nível de 5% considerando a variável clones de condrocitos, ($p < 0,05$). Ou seja, os tratamentos foram diferentes.

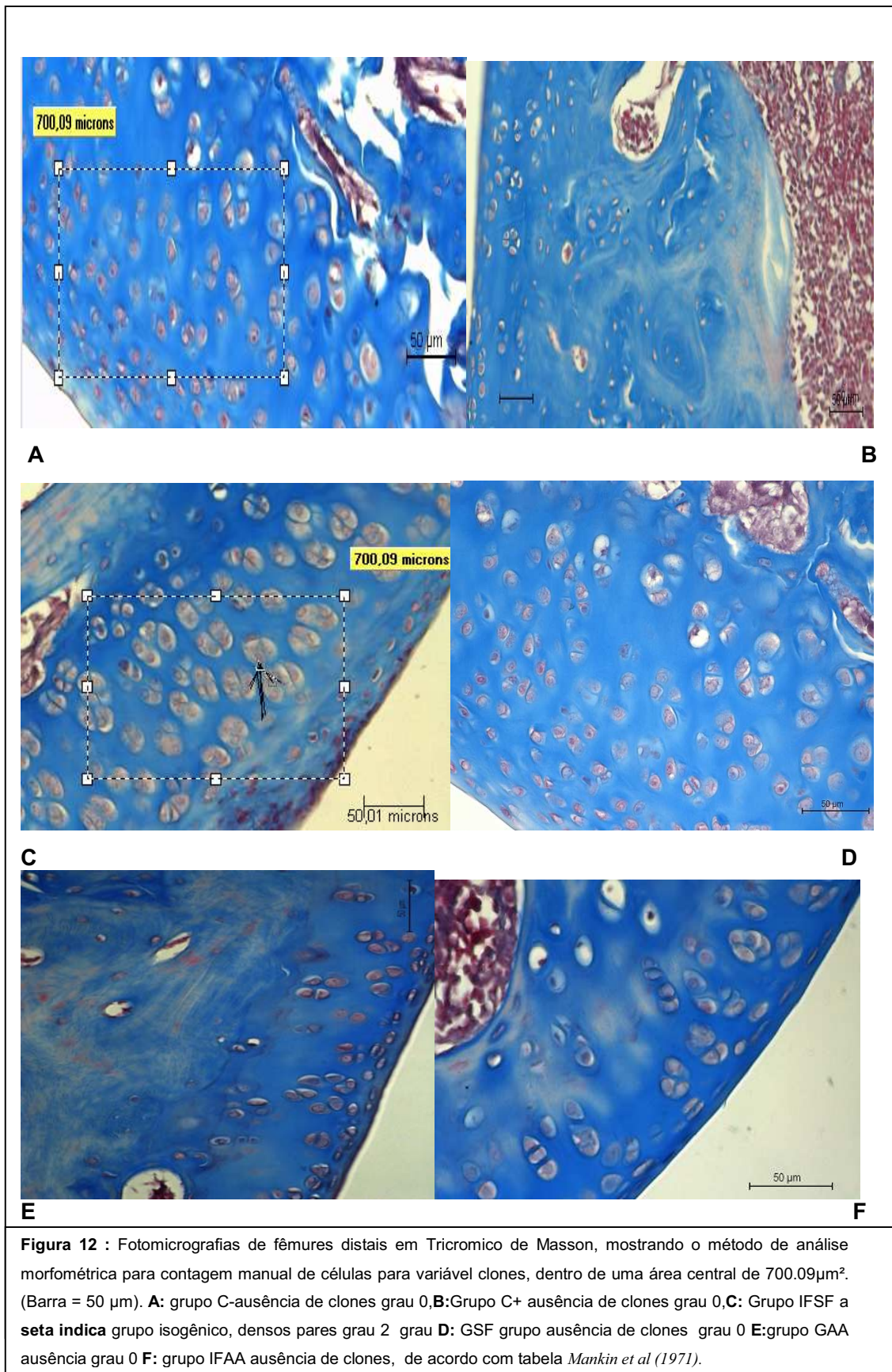
Tabela 5: Dados dos valores do numero de clones de condrocitos/ μm^2 , obtidos em relação a cada animal nos grupos C⁺ controle positivo; C⁻ controle negativo; GSF gavagem soro fisiológico; GAA gavagem acido ascórbico IFSF iontoforese soro fisiológico; IFAA iontoforese acido ascórbico.

Ratos/grupos	C-	C+	GSF	GAA	IFSF	IFAA
1	0	2	2	2	16	3
2	0	0	2	0	10	1
3	0	2	0	0	13	0
4	0	0	0	0	10	0
5	0	0	0	0	12	0
6	0	0	0	0	11	0
Média	0	0.66	0.66	0.33	12	0.66
D.P	0	1	1	0.8	2.2	1.2

Sabendo que os tratamentos são diferentes, realizou-se um teste de Tukey.

Verificou-se que o C⁺, IAA, GSF, GAA e C⁻ podem ser considerados iguais, com médias respectivas de (0.6, 0.6, 0.6, 0.3 μm^2 e 0.0 μm^2) $p < 0,001$ observado nesses grupos ausência de pares de clones ilustrado nas figuras (12A, 12B, 12D, 12E, 12F), mas o grupo IFSF apresentou a maior média em relação a clones de condrocitos sendo (12.0 μm^2) $p < 0,001$, foram encontrados densos pares, figura (12C) não sendo igual a nenhum outro tratamento.

De acordo com o Teste de Levene há homogeneidade de variância em relação à variável tratamento, ou seja, há variância constante intra-grupo $p = 0,10$.



6.4 Análise estatística dos índices de interleucina IL-10.

A tabela 6 apresenta os dados referentes às análises de interleucina IL-10, em cada rato de cada grupo. E, a média de cada grupo.

Tabela 6: Dados dos valores obtidos para a variável interleucina IL-10 em (pg/mL), individual e média, em relação a cada animal dos grupos C⁺ controle positivo; C⁻ controle negativo; GSF gavagem soro fisiológico; GAA gavagem ácido ascórbico IFSF iontoforese soro fisiológico; IFAA iontoforese ácido ascórbico.

Ratos/grupos	C-	C+	GSF	GAA	IFSF	IFAA
1	156.33	61.49	56.80	37.54	27.40	42.50
2	184.62	139.85	61.40	22.22	176.55	65.91
3	168.48	20.10	-----	-----	22.22	42.50
4	92.99	52.11	79.71	42.50	208.37	42.50
5	61.49	101.72	24.70	27.40	204.46	84.15
6	56.80	92.99	42.50	47.31	266.39	-----
Média	120.11	78.04	44.18	29.49	150.89	46.26
Log₁₀	2.033	1.097	1.698	1.535	2.014	1.728

Para obter normalidade dos resíduos e satisfazer as suposições do modelo foi necessária à transformação da variável dosagem IL-10, aplicando o logaritmo na base 10, modificando a média.

Analisando o R² observou-se que o modelo considerado absorveu 66,29% da variabilidade dos dados. Neste teste, verificou-se que o tratamento nos ratos foi significativo ao nível de 5% considerando dosagem IL-10, ($p < 0,05$). Ou seja, os tratamentos foram diferentes, segundo análise estatística baseada nos resultados das dosagens imunológicas do (ANEXO VIII).

Sabendo que os tratamentos são diferentes, realizou-se um teste de Tukey. Verificou-se que o grupo que se diferencia dos demais é o C+, por apresentar menor valor (1.097 pg/mL) $p < 0,001$, enquanto que o C-, GSF, GAA, IFSF e IFAA, podem ser considerados iguais, com valores respectivos de (2.033, 1.698, 1.535, 2.014 pg/mL e 1.728 pg/mL) $p < 0,001$.

De acordo com o Teste de Levene há homogeneidade de variância em relação à variável tratamento, ou seja, há variância constante intra-grupo $p = 0,02$.

6.5 Análise estatística dos índices de Cálcio, Fosfatase Alcalina, Lactato desidrogenase

Foram realizadas análises do conteúdo de íons cálcio, atividades da fosfatase alcalina e da lactato desidrogenase. Os dados constam nas tabelas 7 a 9, respectivamente.

Tabela 7: Dados dos valores obtidos para a variável íons cálcio em (mg/mL), individual e média, em relação a cada animal dos grupos C⁺ controle positivo; C⁻ controle negativo; GSF gavagem soro fisiológico; GAA gavagem ácido ascórbico IFSF iontoforese soro fisiológico; IFAA iontoforese ácido ascórbico.

Ratos/grupos	C-	C+	GSF	GAA	IFSF	IFAA
1	11.5	10.6	10.5	10.5	10.5	11.8
2	12.3	10.5	14.0	15.8	11.0	10.3
3	11.0	15.0	12.5	13.0	11.0	12.7
4	11.0	16.4	13.0	13.2	13.6	15.4
5	12.5	11.0	18.0	11.0	12.0	10.0
6	10.5	13.0	14.3	11.5	12.5	10.2
Média	11.4	12.7	13.7	12.5	11.7	11.7
D.P	0.7	2.4	2.4	1.9	1.1	2

Analisando o R^2 observou-se que o modelo considerado não absorveu variabilidade dos dados. Neste teste, verificou-se que o tratamento nos ratos não foi significativo ao nível de 5% considerando dosagem de cálcio em miligramas por decilitro, ($p > 0,05$). Ou seja, os tratamentos foram iguais $p=0,36$.

De acordo com o Teste de Levene não há homogeneidade de variância em relação a variável tratamento, ou seja, rejeitamos a hipótese nula de homocedasticidade há variância constante intra-grupo $p=0,33$.

Tabela 8: Dados dos valores obtidos para a variável enzima fosfatase alcalina em (UA/mL), individual e média, em relação a cada animal dos grupos C⁺ controle positivo; C⁻ controle negativo; GSF gavagem soro fisiológico; GAA gavagem ácido ascórbico IFSF iontoforese soro fisiológico; IFAA iontoforese ácido ascórbico

Ratos/grupos	C-	C+	GSF	GAA	IFSF	IFAA
1	1986	1143	1400	2865	1436	986
2	1423	1675	1543	1132	1345	1003
3	1754	1718	1334	1231	1132	997
4	1100	1990	1625	2011	1400	1022
5	1452	1543	1600	1762	1463	956
6	1243	1835	1599	1012	1644	950
Média	1493	1650	1516	1668	1403	985,6
D.P	327	542	120	702	167	27

Analisando o R^2 observou-se que o modelo considerado absorveu 51,42% da variabilidade dos dados. Neste teste, verificou-se que o tratamento nos ratos foi significativo ao nível de 5% considerando dosagem de fosfatase alcalina em unidades arbitrárias por mililitro, ($p < 0,05$). Ou seja, os tratamentos foram diferentes.

Sabendo que os tratamentos são diferentes, realizou-se um teste de Tukey. Verificou-se que todos os tratamentos realizados em relação a variável dosagem de

fosfatase alcalina são iguais, com exceção do grupo IFAA que apresentou menor média (985, 667 UA/mL) $p < 0,004$.

De acordo com o Teste de Levene há homogeneidade de variância em relação à variável tratamento, ou seja, há variância constante intra-grupo.

Em relação à tabela 9, analisando o R^2 observou-se que o modelo considerado não absorveu variabilidade dos dados. Neste teste, verificou-se que o tratamento nos ratos não foi significativo ao nível de 5% considerando dosagem de lactato desidrogenase, ($p > 0,05$). Ou seja, os tratamentos foram iguais.

Tabela 9: Dados dos valores obtidos para a variável enzima lactato desidrogenase em (UA/mL), individual e média, em relação a cada animal dos grupos C⁺ controle positivo; C⁻ controle negativo; GSF gavagem soro fisiológico; GAA gavagem ácido ascórbico IFSF iontoforese soro fisiológico; IFAA iontoforese ácido ascórbico

Ratos/grupos	C-	C+	GSF	GAA	IFSF	IFAA
1	261	362	300	300	300	294
2	305	342	320	297	332	298
3	266	371	300	330	302	306
4	300	322	305	321	298	218
5	309	296	311	318	311	332
6	302	289	287	310	284	300
Média	290.50	330.33	303.83	312.67	304.50	291.33
D.P	21	33	11	12	16	38

De acordo com o Teste de Levene não há homogeneidade de variância em relação a variável tratamento, ou seja, rejeitamos a hipótese nula de homocedasticidade há variância constante intra-grupo $p = 0,03$.

7- DISCUSSÃO

O estabelecimento de uma lesão cartilaginosa por zymosan através de injeção intra-articular é uma das maneiras mais usuais segundo Rocha, 1999 na promoção da sinovite erosiva grave, onde em uma fase aguda e até três dias após a indução ocorre aumento de permeabilidade vascular e migração celular, em seguida esta situação passa a ser crônica pela persistência da sinovite e com posterior perda de glicosaminoglicanas e conseqüente redução da celularidade.

Viana, 2000 também mostra em estudo associado a Rocha, 1999 que o Zymosan é capaz de causar incapacitação e que de maneira peculiar demonstram uma ação de indução artrítica na articulação intacta, diferentemente de quando o Zymosan é injetado diretamente na sinovia através de um acesso cirúrgico o qual não promove tal incapacitação. Deste modo no presente estudo observa-se uma verossimilhança quanto aos resultados de Rocha, 1999 obteve-se redução da celularidade em todos os ratos do grupo controle positivo.

Os resultados mostram de forma geral que o comportamento morfológico celular variou de acordo com os tratamentos realizados, a cartilagem articular mudou esse comportamento frente à terapia elétrica, no que refere a variável celularidade os condrócitos de maneira geral nos grupos tratados com corrente galvânica com ou sem L-ascorbato aumentaram a celularidade havendo normalidade nos grupo C- e IFAA, isto indica que o tratamento com corrente contínua foi efetivo quanto a prevenção secundária da perda de condrócitos, fazendo com que esse aumento do números de células fosse também coerente quanto a disposição das mesmas nas

camadas que compõe a cartilagem, tendo significância estatística.

Esta característica da indução na proliferação de tecido vai ao encontro com estudos de Grace, (1998) e Aaron, (1996) que examinaram o efeito do campo elétrico em falhas osteocondrais no sulco troclear de ratos, onde foram observadas reação vascular inicial, síntese de matriz, cicatrização tecidual e condrogênese com a aplicação da corrente contínua.

Conforme esses autores, o tratamento com campo elétrico pode ser útil na aceleração da reparação durante a fase proliferativa inicial, como também no processo de ossificação endocondral, sob influência desse campo observaram aceleração do tempo de reparo e aumento quantitativo na incorporação de sulfato, como também no conteúdo de glicosaminoglicanos, obteve-se também estimulação das células no estado mesenquimal.

Os aparelhos de micro correntes são projetados para mimetizar as funções e os sinais bioelétricos do corpo humano, gerando uma corrente elétrica para compensar a bioeletricidade que está diminuída no tecido lesado, isto aumenta a capacidade do corpo em transportar nutrientes para as células da área afetada, (CHENG; VAN HOFF; BOCKX, 1982) assim, demonstra-se que tal teoria pode ser aplicada no estudo atual conforme os resultados alcançados, pois se comparado ao grupo controle positivo os grupos iontoforese a base de solução fisiológica e com ácido ascórbico apresentaram este aumento, tendo um melhor estado proliferativo denotado nas lâminas histológicas que de maneira clara evidencia-se um ganho na variável celularidade.

A contribuição do tratamento pelo ácido ascórbico no presente estudo em comparação intergrupos demonstrou uma melhora na disposição morfológica celular

das camadas nos grupos onde foi administrado, estando em consonância com o estudo proposto por Chowcat et al, (1988) que afirma que a colagenase é biossintetizada por fatores exógenos ou endógenos, e é controlada biologicamente por um inibidor tecidual de metaloproteinase. Além disso, menciona que a suplementação de vitamina C mesmo que não tenha influência sobre essas enzimas, contribui como substrato, que poderá ser responsável por reações químicas indutoras de biossíntese de colágeno (ARANTES, 1994 e 1999; BARBUL 1998 e 1990).

A alteração da espessura do tecido cartilaginoso também foi fator de investigação e é um importante indicador de degeneração, uma vez que a cartilagem articular depende da composição e organização da matriz extracelular, além da própria relação entre matriz e condrócito na resistência à carga mecânica.

São raras as investigações da literatura que avaliaram a espessura das diferentes regiões da cartilagem. Em teorias propostas por Carter e Wong (1988) demonstra-se que a diminuição da carga hidrostática promove uma inibição do avanço fisiológico da camada do osso sub-condral e da cartilagem calcificada em avançar na direção da superfície articular, já em estudo de Del Carlo et al., (2007) se observou um aumento da cartilagem calcificada assim como o osso sub condral em grupos de ratos em que houve perda da capacidade da cartilagem em absorver estresse mecânico sujeitando o osso a uma maior carga. Assim, o atual estudo corrobora com o descrito por esses autores, mostrando que houve aumento da cartilagem calcificada nos grupos C+ e GSF, ou seja, grupos que não tiveram intervenção de tratamento com corrente contínua isolada e de ácido l-ascórbico, ou por gavagem de ácido ascórbico, caracterizando assim a redução e alteração na

distribuição celular fazendo com que a resistência à carga da cartilagem fosse reduzida e a linha de *tidemark* avança-se a superfície cartilaginosa.

Na identificação dos clones de condrócitos, a presença desses grupos isógenos indicam segundo Piermattei, 1999 processo de divisão celular em resposta ao estresse anormal, constituindo-se em mecanismo natural de defesa da cartilagem, com exceção do grupo C- todos os demais mostraram a presença desses grupos isógenos indicando assim uma busca pelo processo fisiológico de reparo, sendo que estatisticamente apenas o grupo IFSF apresentou a maior média significando um aumento na celularidade mas de maneira a não convergir para uma melhora fisiológica.

A transposição dos dados encontrados no modelo experimental para a clínica deve ser cautelosa. Apesar de alguns trabalhos evidenciarem efeito benéfico do ácido ascórbico, outros mostram que mecanismos inflamatórios (células e mediadores químicos) são os responsáveis pela regulação da síntese de colágeno (LACROIX, 1988).

A importância da IL-10 como um regulador negativo da inflamação está bem demonstrado no estudo com camundongos deficientes em IL-10 onde o crescimento celular ficou inibido, houve o desenvolvimento de anemia e de doença inflamatória crônica (HOOIVELD, 2003). Com a adição de IL-10 houve inibição do processo de artrite, enquanto que a neutralização dos anticorpos para IL-10 aumenta a severidade desta patologia (HOOIVELD, 2003) Desta forma, os resultados do presente trabalho sugerem um efeito positivo da vitamina C. No período pós-indutorio a lesão, é pertinente supor que a administração de vitamina C possa ser benéfica, mesmo na clínica, quando se trata de doenças crônicas ou degenerativas,

já que pode ter agido no sistema imune. No nosso estudo, os dados de dosagem de IL-10 mostraram diferença estatisticamente significativa nos grupos GAA, IFAA e IFSF em que se obteve maior valor de IL-10, em detrimento ao grupo C+, sugerindo assim um controle inibitório da ação danosa do zymosan.

Esta razão foi também relatada por Hooiveld (2003) que propôs uma intervenção adicional na prevenção da artropatia crônica hemofílica através da ação da interleucina 10 (IL-10), nesses estudos experimentais os autores relataram 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 e macrófagos. Em estudo realizado por Vale, 2000 a administração IL-10 também mostrou atividade analgésica e melhora da incapacitação articular induzida por zymosan.

A dosagem de cálcio foi realizada com o objetivo de observar o comportamento deste íon frente ao processo de lesão e possível reparo da cartilagem articular, bem como a dosagem fosfatase alcalina por sua íntima relação de equilíbrio com o cálcio.

Segundo Shapiro, 2008: i) a ação/atividade da fosfatase alcalina e de íons cálcio está ligada à hipertrofia e a mineralização dos condrócitos, ii) antes do crescimento da matriz óssea a atividade é baixa, iii) com o crescimento deste tipo celular há uma elevação rápida desta ação/atividade, sua relação com o ácido ascórbico mostra que os condrócitos tornam-se degenerados na ausência desta vitamina havendo um alargamento da região da cartilagem calcificada onde ocorre uma recolocação imprópria de matriz óssea.

Deste modo, no presente estudo, não houve diferença estatisticamente

significativa na dosagem dos íons cálcio e da fosfatase alcalina através das médias finais calculadas, exceto dosagem de fosfatase alcalina no grupo IFAA que apresenta menor valor que os demais, embora se analisado os animais individualmente nota-se uma tendência na maioria deles por um aumento significativo do índice de íons cálcio e ação catalítica da fosfatase alcalina nos grupos C+, GSF, se comparado aos grupos C-, IFSF, IFAA, sugerindo assim uma maior mobilização deste íon derivada da busca na tentativa do reparo.

Considerando uma análise bioquímica em relação ao índice lesional, o resultado da atividade da enzima lactato desidrogenase não mostra uma diferença significativa de valores entre os grupos, apesar de haver também tendências em alguns animais dos grupos IFSF e IFAA em ter redução dessa enzima em detrimento ao grupo C+.

8-CONCLUSÃO

O estudo da resposta imuno-bioquímica e avaliação histológica da cartilagem articular de ratos artrose induzidos, frente ao tratamento com iontoforese isolada e na presença de ácido L – ascórbico permitiu concluir que:

1-O procedimento de corrente elétrica com l-ascórbico aplicado neste estudo foi benéfico para a cartilagem articular previamente induzida com a artrose por zymosan promovendo alterações no tecido cartilaginoso levando a normalidade da variável celularidade e manutenção da espessura da cartilagem não calcificada. Quanto ao grupo não tratado apresentou redução celular e da camada cartilaginosa não calcificada e aumento da calcificada.

2- A IL-10 demonstrou um aumento no grupo IFAA em detrimento ao C+ sugerindo controle inibitório à lesão e seguindo as análises séricas. Não houve diferença entre os grupos quanto as dosagens dos íons cálcio e fosfatase alcalina bem como da atividade da enzima lactato desidrogenase quando se levou em conta a comparação das médias, mas houve contribuição na diferença entre as amostras se comparados alguns animais de forma isolada.

9-Referências Bibliográficas

AARON, R.K.; CIOMBOR, D.M. Acceleration of experimental endochondral ossification by biophysical stimulation of the progenitor cell pool. **Journal of Orthopaedic Research**, v.14, p.582-589, 1996.

AGNE, JE. **Eletrotermoterapia – Teoria e Prática**. Santa Maria (RS): Editora Orium, 2004.

AIGNER, T.; SOEDER, S.; HAAG, J. IL- 1 β and BMPS – Interactive players of cartilage matrix degradation and regeneration. **Eur Cell Mater**. 12, 49-56, 2006

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS J.; RAFFM.; ROBERTS, K.; WATSONJ D: The extracelular matrix of animals. In: **Molecular biology of the cell**.1994 3. ed. New York & London, Garland, 971-84

ALAAEDDINE, N.; DI BATTISTA, J.A.; PELLETIER, J.P.; KIANSA, K.; CLOU ORBA TIER, J.M.; MARTEL-PELLETIER, J. Differential effects of IL-8, LIF (pro-inflammatory) and IL-1i (anti-inflammatory) on tnf-alpha-induced PGE(2) release and on signalling pathwax in human OA synovial fibroblasts. **Cytokine**, v.11, p. 1020-1030, 1999.

ANGEL, J.; RAZZANO, P.; GRANDE, D. Defining the challenge: The basic science of articular cartilage reapirs and response injury. **Spo Me Arthrosc Rev**. 11, 3, 168-18, 2003.

ARANTES, V.A.; OKAWA, R.Y.; PEREYRA, W.J.F.; BARBOSA, A.J.A.; PETROIANU, A. Influência da icterícia obstrutiva na cicatrização da pele e de anastomose jejunal em ratos. **Rev Col Bras Cir**. p.269-73, 1999.

ARANTES, V.N.; OKAWA, R.Y.; SILVA, A.A.; BARBOSA, A.A.; PETROIANU, A. Efeito da metilprednisolona sobre a tensão anastomótica jejunal. **Arq Gastroenterol**.

p.97-101,1994.

AROKOSKI, J. P.A.; JURVELIN, J. S.; VÄÄTÄINEN, U. et al. Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading. **Scand J Med Sci Sports**. 10, 186-98,2000.

ASAI, A, FUKUTA, K, TORII, S. Topical Administration of Prostaglandin E1 with Iontophoresis for Skin Flap Viability. **Ann Plast Surg**; 38 (5): 514-7, 1997.

BARBUL, A. Immune aspects of wound repair. **Clin Plast Surg**.17: 433-42, 1990.

BARBUL, A. Role of T-cell dependent immune system in wound healing. Biological and clinical implications. **A R Liss**. p.161-75, 1988.

BARRY, B.W. Drug delivery routes in skin: a novel approach. **Adv Drug Deliv Rev**; 54: S31-S40, 2002.

BECKER, R. The basis for microcurrent electrical therapy in conventional medical practice. **Jornal of advancement in Medicine**. v.8 , n.2, 1981.

BECKER, R. **The Body Electric**. New York: William Morrow and Co, 1985.

BISSCHOP, G.; BISSCHOP, E.; COMMANDRÉ F. Eletrofisioterapia. São Paulo (SP): Editora e Livraria Santos; 2001. P. 24-34.

BOYERA, N.; GALEY, I.; BERNARD, B.A. Effect of vitamin C and its derivatives on collagen synthesis and cross-linking by normal human fibroblasts. **International Journal of Cosmetic Science**. v20,p.151-8,1998.

BRASILEIRO-FILHO, G.; PEREIRA, F.E.L.; PITTELA, J.E.H.; BAMBIRRA, E.A.; BARBOSA, A.J.A.et al. **Patologia Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. P.73-77.

BRITO, M.V.H; SAMPAIO, A.R.S; FREIRE FILHO, M.S.L; SILVEIRA, E.L; MUTO, N.S et al Efeito do ácido ascórbico na microscopia de feridas cutâneas abertas de ratos submetidos à dieta aprotéica. **Acta Cir. Brás**, v.18,2003.

CARTER,D.R.;WONG.M.The role of mechanical of loading histories in the development of diarthrodial joints. **J Orthop Res**.p. 805-815, 1988.

CHAN, D.; LAMANDE, SR.; COLE, WG.; BATEMAN, JF. Regulation of procollagen synthesis and processing during ascorbate-induced extracellular matrix accumulation *in vitro*. **J Biol Chem.**; 269(1):175-8, 1990.

CHENG, N.; VAN HOFF, H.; BOCKX, E.; et al. The effect of electric currents on ATP generation protein synthesis, and membrane transport in rat skin. **Clin, Orthop** v. 171, p.264- 272, 1982.

CHOWCAT, N.L.; SAVAGE, F.J.; HEMBRY, R.M.; BOULOS, PB. Role of collagenase in colonic anastomoses: a reappraisal. **Br J Surg** p.330-333, 1988.

COTRAN, R.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins Patologia Estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.1251

COSTELO, CT.; JESEKE, A H.Iontophoresis: Aplications in Transdermal medication delivery. [5. 1.: s.n.], 2000. p. 554-63

CURDY, C.; KALIA, YN.; NAIK, A.; GUY, RH. Piroxicam delivery into human stratum corneum in vivo: iontophoresis versus passive diffusion. **J Control Release**; 76: 73-79, 2001

CURDY, C.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Post-iontophoresis recovery of human skin impedance in vivo. **Eur J Pharm Biopharm**; 53: 15-21, 2002.

DEL CARLO, R.J.; GALVÃO, M.R.; VILORIA, M.I.V.; NATALI, A.J.; BARBOSA, A.L.T; MONTEIRO, B.S.; PINHEIRO, L.C.P. Experimental immobilization and remobilization rat knee joints: clinical and microscopic study **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.2, p.363-370, 2007

DEAN, D.D.; PELLETIER, J.P.; HOWELL, D.S, WOESSNER, J.R: Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. **J Clin Invest** v.84, p. 678-85, 1989.

EMANUEL, B.S.; CANNIZZARO, L.A.; SEYER, J.M.; MYERS, J.C. Human alpha 1(III) and alpha 2(V) procollagen genes are located on the long arm of chromosome 2. **Proc Natl Acad Sci USA**,v. 82(10),p. 3385-9, 1985.

FELICE, J.C et al. Elementos básicos de diagnóstico da osteoartrite. **Temas de reumatologia clinica**.v.3,p.68-81,2002.

FENSKE, N.A.; LOBER, C.W. Structural and functional changes of normal aging skin. **J Am Acad Dermatol**, v.15, p.571-85, 1986.

FRASNELLI, M.E.; TARUSSIO, D.; CHOBASZ-PÉCLAT, V.; BUSSO, M. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. **Arthritis Res Ther** 2005; p.200, 1990.

FRASNELLI, M.E, TARUSSIO, D.; CHOBASZ-PÉCLAT, V.; BUSSO, M.S.O. A. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. **Arthritis Res Ther**; 7:R370-R379, 2005.

GRACE, K.L.; REVELL, W.J.; BROOKES, M. The effects of pulsed electromagnetism on fresh fracture healing: osteochondral repair in the rat femoral groove.

Orthopedics, v.21, n.3, p.297-302, 1998

GREEN, P.G. Iontophoretic delivery of peptide drugs. **J Control Release**. p.33-38, 1996

GOLDRING, M. B. The role of chondrocytes in osteoarthritis. **Arthritis Rheum**. 43(9), 1916-1926, 2000

GOODHEART, G. "A Presentation of a New Approach to Correction of Disc Lesions", **ACA Journ. Chiro.**, Dec, p. 36-37, 1954.

HOOIVELD, M.J.; ROOSDAL, G.; JACOBS, K.M et al Initiation of degenerative joint damage by experimental bleeding combined with loading of joint: a possible mechanism of hemophilic arthropathy **Arthritis Reum**. p.2024-31, 2003

HOPKINS, S.J Cytokines and eicosanoids in rheumatic diseases **Ann Rheum** p.200, 1990.

HUNTER, W. Of the structure and disease of articulating cartilage. **Philos Trans R Soc Lond**, v.42 .p. 514-21, 1743.

HUZYKER, E.B Articular cartilage repair: basic science and clinical progress a review of the current status and prospects. **Osteoarthritis and cart**.v.10,p.432-463, 2002.

JUNIEN, C.; WEIL, D.; MYERS, JC. et al. Assignment of the human pro alpha 2(I) collagen structural gene (COLIA2) to chromosome 7 by molecular hybridization. **Am J Hum Genet**, v.34(3),p. 381-7, 1982.

KAHN, J. Princípios e prática de eletroterapia. 4a ed. São Paulo, (SP): Editora e Livraria Santos; 2001. P. 119-140.

KEYSTONE, E.C, Schorlemmer HU, Pope C, Allison AC. Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. **Arthritis Rheum.** 20:1397-1401,1977.

KIRSCH, D.; LERNER, F. Innovations In pain management: a practical guide for clinicians. In:WEINER, R.L (ed) **Electro medicine** . Deutsche Press, v. 23, p.1-29, 1987.

KIRSCH, D.L.; MERCOLA, J.M. The basis for microcurrent electrical therapy in conventional medical practice. **Journal of Advancement in Medicine.** v .8, n. 2, 1995.

KOTTKE, F.J.; LEHMANN, J.F. In **Tratado de Medicina Clinica e Reabilitação de Krusen.** 4. ed. São Paulo: Manole,1994.v. 1.

KUNKEL, S.; STANDIFORD,T.; CHENSUE,S.W.; KASAHARA,K.; STRIETER,R.M. Cellular and molecular mechanisms of cytokine network .Agents.**Actions.Suppl.**32:205,1991.

LACROIX, B.; DIDIER, E.; GRENIER, J.F. Role of panthotenic and ascorbic acid wound healing processes: in vitro study on fibroblasts. **Int J Vitam Nutr Res** .p.407-13, 1988

LEITÃO, A. R.E. **Elementos da fisioterapia.** 2.ed. São Paulo: J.C. Santos Editora de Livros Técnicos e Científicos, 1967.

LEITÃO, A. R.E. **Fisiatria clínica.** São Paulo: Atheneu, 1979

LE ROUX, M.A; CHEUNG, H.S; BAU, J.L; WANG, J.Y; HOWELL, D.S; SETTON, L.A.

Altered mechanics and histomorphometry of canine tibial cartilage following joint immobilization. **Osteoarthritis and Cart.**.p. 633- 40, 2001.

LIANZA, S. **Medicina de Reabilitação**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985.

MANKIN, H.J.; DORFMAN, H.; LIPPIELLO, L.; ZARINS, A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. **J Bone Joint Surg Am**; 53: 523-37,1971

MATOS.; MARCOS, A. A Identificação da isoenzima de fosfatase alcalina por terminativação. Relevância clínica e ensaio laboratorial **Rev.bras.ortop**;31(3): 268-72,1996

MORGAN, B.R.;ARTISS, J.D.; ZAK,B **Clin Chem**.39/8:1608 1993

MORGAREIDGE, K.R. ; CHIPMAN, R.D. Microcurrent Therapy . **Physical Therapy Today** ,p. 50-53, Spring 1990

MOTTA, A.F.; BORGES J.R.;DA-FONSECA, J.C.P.; TONUSSI, C.R. Um modelo para estudo da iontoforese de antiinflamatórios em ratos Depto. de Farmacologia, UFSC e 2 Depto. de prevenção, avaliação e reabilitação física, CEFID-UDESC, Florianópolis, SC em XXXIV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental resumo 04.086 2003

NOLAN, L.M.; CORISH, J.; CORRIGAN, OI .; FITZPATRICK, D. Iontophoretic and chemical enhancement of drug delivery. **Int J Pharm**; 257(Pt1): 41-55,2003

NORDENSTROM, B. Biologically closed electrical circuits: activation of vascular interstitialclosed electric circuits for treatment of inoperable cancers. **J. Bio. Electricity** v. 3, p.137-153.1984.

NUGROHO, AK.; LI, G.; GROSSKLAUS, A.; DANHOF, M.; BOUWSTRA, J.A.

Transdermal iontophoresis of rotigotine: influence of concentration, temperature and current density in human skin in vitro. **J ControlRelease**; 96: 159-167, 2004

OSTERGAARD, K.; ANDRESEN, C.B.; PETERSEN, J.; BENDTZEN, K.; SALTER, D.M. Validity of histopathological grading of articular cartilage from osteoarthritic knee joints. **Ann Rheum Dis**, 58: 208-13,1999

PIERMATTEI, D.L.; FLO, G.L. Articulações. In: **Manual de Ortopedia e Tratamento das Fraturas dos Pequenos Animais**. São Paulo, Manole. 1999.p.161-176,

PINNEL, S.R.; MURAD S.; DARR, D. Induction of collagen synthesis by ascorbic acid. A possible mechanism. **Arch Dermatol**,v. 23(12),p.1684-6, 1987.

PINNELL, S.R.; YANG H.; OMAR M, et al. Topical L-ascorbic acid: percutaneous absorption studies. **Dermatol Surg**, v.27(2),p. 137-42, 2001.

PIZZORNO, J. " Natural Medicine Approach to Treating Osteoarthritis", *Alt & Comp Ther*, Jan/Feb, 1995; 93-95

RAMOS, P. Características de um modelo experimental ideal para estudo de artrite reurnatoide : **Rev Bras Reumatol** v. 41 .p.34-36, 2001.

REDISKE, J.J.; KOEHNE, C.F.; ZHANG, B.; LOTZ, M. **The inducible production of nitric oxide by articular cell types. *Osteoarthritis Cartilage***. Sep.v.2(3),.p.199-206,1994

REYNOLDS, J.J: Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. **Oral Dis**,v. 2,p. 70-6, 1996

ROCHA, A.C.; ARAGAO, J.R.; OLIVEIRA, R.C.; POMPEU, M.M.L.; VALE MR.; RIBEIRA, R.A: Periarthritis pramates gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. **Inflamm Res** v.48, p. 485-490, 1999.

RODKEY, W.G.; McKINNEY, L.A. A review of struture, function and composition of cartilage and synovium. In: BOJRAB, M.J. **Disease mechanism in animal surgery**. 2. ed. Philadelphia: Lea & Fabiger,. cap. 94. p. 649-655, 1993

ROSS, M. L.; REITH, E.J.; ROWNELL, L. J. **Histologia Texto e Atlas**. São Paulo: Panamericana, 1993. p. 47-115; 347-376

SAY, K.G. et al. O tratamento fisioterapêutico de úlceras cutâneas venosas crônicas através da laserterapia com dois comprimentos de onda. **Fisioterapia Brasil**. v.4, n. 1, p. 39-48, 2003.

SCHUMACHER, H.R. Synovial inflammation, crystals and osteoarthritis. **J Rheumatol Suppl** v. 43, p. 101-103,1995

SILVA, R.C **Efeito da corrente elétrica de baixa intensidade em feridas**
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade do Vale do Paraíba cutâneas de ratos,p.38;2006.

SMITH,K.A.;LACKMAN,L.B.;OPPENHEIN,J.J.;FAVATA,M.F.;The functional relationship of the interleukins.**J.Exp.Med**.151:1551,1980.

SMITH, L.T.; HOLBROOK, K.A.; MADRI, J.A :In: Collagen types I, III, and V in human embryonic and fetal skin. **Am J Anat**, v.175 (4),p.507-21, 1986

TUREK, S.L. Ortopedia: Princípios e sua aplicação. São Paulo: Manole, 1999

VALE, M.L **Atividade analgésica das interleucinas 4,13 e 10 (IL4,IL-13,IL-10 na dor inflamatória experimental** :Papel de células residentes e citocinas. 2000. 140 f.Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Paraná Faculdade de Medicina apresentada ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

VANWANSEELE, B.; LUCCHINETTI, E.; STUSSI, E. The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions. **Osteoarthritis and Cartilage** .p.409-418, 2002.

VELOSA, A. P.; WALLY, R.; NATALINO, H: colágeno na cartilagem osteoartrosica. **Rev Bras Reumatol** v.43, n. 3, p. 165-6, mai./junh, 2003

VIANA,C.F.G.;ARAGAO,A.G.M.;RIBEIRO,R.A.;MAGALHAES,J.F.G.;VALE,M.R.;
Effects of ageratum conyzoides in nociception and inflammatory response induce by zymosan.**Fitoterapia** .p.349,1998

WATSON, T. Estimulação Elétrica para a cicatrização de feridas. In: KITCHEN, S.; BAZIN, S.**Eletroterapia de Clayton**.10. ed. . São Paulo: Ed. Manole, 1998.

YAAR, M.; GILCHREST, B.A, Cellular and molecular mechanisms of cutaneous aging. **J Dermatol Surg Oncol**, v.16(10),p. 915-22,1990

ANEXO I



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL

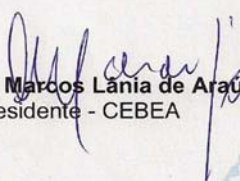



CEBEA – COMISSÃO DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 015994-07 do trabalho de pesquisa intitulado “**Verificação da regulação da biossíntese da cartilagem articular de ratos, com o emprego do precursor biológico ácido-ascórbico por diferentes vias de administração**”, sob a responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Maria Rita Pacheco, está de acordo, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL (CEBEA), em reunião ordinária de 13 de setembro de 2007.

Jaboticabal, 14 de setembro de 2007.


Prof. Dr. Marcos Lânia de Araújo
Presidente - CEBEA


Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEBEA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel 16 3209 2600 fax 16 3202 4275 www.fcav.unesp.br

ANEXO I I



ANEXO III

FIXAÇÃO, DESCALCIFICAÇÃO E PROCESSAMENTO EM HISTOSEC:

- Material fixado em formol 10%,
- Descalcificado em Acido nítrico 7,5% acrescido de glicerina na mesma concentração por aproximadamente 7 dias (95 h),
- Desidratado em série crescente de álcoois (80% - 100%), diafanizado em xilol, incluído e emblocado em histosec, pronto para ser cortado com micrótomo em 5 micrometros.



ANEXO IV

COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA-EOSINA:

- Desparafinizar em xilol,
- Hidratar em série decrescente de álcoois (100% a 80%),
- Lavar em água corrente,
- Corar em Hematoxilina de Harris* por 6min,
- Lavar em água corrente,
- Diferenciar em álcool-ácido,
- Lavar em água corrente,
- Azular em água amoniacal,
- Lavar em água corrente,
- Passar pelo álcool 95%,
- Corar por 1 minuto em Solução Eosina Floxina**,
- Desidratar em série crescente de álcoois,
- Diafanizar em xilol,
- Montar as lâminas em Entellan.

***Hematoxilina de Harris ***

Hematoxilina
Álcool Absoluto

Alúmen de Potássio.

Água destilada.

Oxido Vermelho de Mercúrio.

***Solução Eosina-Floxina**

Sol.”stock” Eosina (eosina amarelada, água destilada)

Sol.”stock” Floxina (floxina B, água destilada).

Álcool 95%

Acido Glacial Acético

Técnicas de coloração – Hematoxilina – Eosina



ANEXO IV

1-Desparafinização

- 1 Xilol – I - 5 minutos
- 2 Xilol – II - 5 min/
- 3
- 4
- 5

2- Hidratação

- Alcool absoluto - I - 5 min/
- Alcool Absoluto - II - 5 min/
- Alcool 70% -5 min/
- Água corrente -5 min/
- Água destilada - 1 min/

3-Cloração

- Hematoxilina de Harris -1 min/
- Água corrente - 5 min/
- Água destilada -1 min/
- Eosina de Lyson - 30 segundos
- Água destilada - banho rápido

4- Desidratação

- Álcool 70% - H.E. – banho rápido
- Álcool 95% - H.E. – banho rápido
- Álcool absoluto – I -5 min/
- Álcool absoluto – II - 5 min/
- Álcool absoluto – III - 5 min/

5-Diafanização

- Xilol – I - 5 min/
- Xilol – II - 5 min/
- Xilol – III - 5 min/

6- Montagem em laminula, Balsamo do Canada ou entelan



ANEXO V

Tricromico de Masson

Desparafinização

-Xilol- I	5MIN
-Xilol-II	5MIN

Hidratação

Alcool Absoluto-I	5min
Alcool Absoluto-II	5min
Alcool 70%	5 min
Água corrente	5 min
Água destilada	1min

Coloração

- Hematoxilina de Harris	1 min
- Água corrente	5min
-Água destilada	1min

-Sol.Fucsina Ponceau	1min
-Água destilada	1min

-Sol. Acido Fosfomolibdico	1%-5min
----------------------------	---------

-Sol azul; de Anilina	3min
- Água destilada	ate retirar o excesso

Desidratação

-Alcool 70%,se for necessário para retirar o excesso de corante	
-Alcool 95% banho rápido	
-Alcool absoluto I	5min
-Alcool absoluto II	5min
-Alcool absoluto III	5min



Diafanização

- Xilol-I	5min
-Xilol II	5min
-Xilol III	5min

Coloração em lâmina

-Bálsamo do Canadá

Anexo VI

Critérios de avaliação dos níveis de lesão da cartilagem articular, a partir dos Sistemas de Graduação Histológico para cartilagem articular de *Mankin et al (1971)* e *LeRoux et al (2001)* modificados.

I CELULARIDADE	
Normal	0
Hiper celularidade	1
Hiper celularidade difusa	2
Hipo celularidade	3

II CLONES DE CONDROCITOS	
Ausência	0
Pares Ocasionais	1
Densos pares de Clones	2
Agrupamentos de Clones	3

Anexo VII

Arquivo Editar Objetos Imprimir Ajuda

Data da Avaliação

Imagem

Importar

Editar

Registrar

Avaliar

Consultar

Objetos

Cor da linha

Cor da Tinta

Tipo de Linha

Espessura da Linha 1

Estilo da Linha

Visível

Selecionável

Movível

Ajustável

Linha

Ponta

Final

Mensuração

Unidade Micron

Escala 1: 0,00175

Digitos 2

Precisão 15

Zoom 50 %

Arrastar

Selecionar

Objeto

Retângulo

Polígono

Medidas

Área

Perímetro

Distância

Inserir Objetos

Linha

Caixa

Regua

Ocultar Objetos

Excluir Objetos

Editar Objetos

Brilho/Cor

Efeitos

Copiar

Colar

Ferramentas

700,09 microns

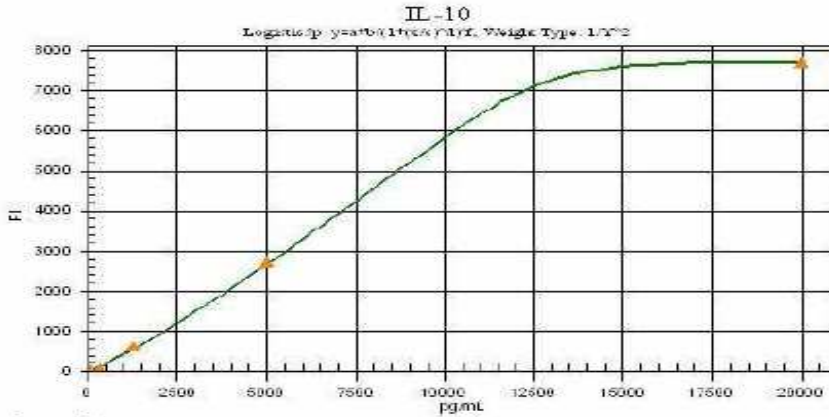
84,27 microns

Anexo VIII

Data Interpretation Report

6/16/2009 2:20:19 PM

Batch Name: RCYTO-80K,64/2009,15:59
 Test Name: IL-10
 Formula: $y = 4.08E+00 + (7.71E+03 / (1 + ((x / 1.27E+04)^{-1.10E+01}))^{1.03E-01})$



Curve Data:
 Coeff1 = 4.08084280491666
 Coeff2 = 7713.96123157945
 Coeff3 = 12716.4483755154
 Coeff4 = -10.9692877680779
 Coeff5 = 0.103487182527964

Standards:

Loc	Standard	Expected Conc	MFI	Test Result	CV	Unit	Comments
C1	* std1	4.88	6.0				
D1	std1	4.88	5.0	4.44		pg/mL	Sys: Insufficient Bead Count- Sample Timed Out
E1	std2	19.53	9.0	19.48		pg/mL	
F1	* std2	19.53	13.0				
G1	* std3	78.13	36.5	102.54		pg/mL	
H1	std3	78.13	36.5	102.54		pg/mL	
A2	std4	312.5	97.0	259.26		pg/mL	Sys: Insufficient Bead Count- Sample Timed Out
B2	* std4	312.5	77.0				
C2	* std5	1250	565.0				
D2	std5	1250	629.0	1389.59		pg/mL	Sys: Insufficient Bead Count- Sample Timed Out
E2	std6	5000	2775.5	5161.00		pg/mL	
F2	std6	5000	2692.0	5023.77		pg/mL	
G2	* std7	20000	7728.0				
H2	std7	20000	7712.5	19998.16		pg/mL	Sys: Sheath Pressure Upper Limit Exceeded
Avg	std1		5.0	4.44	0.	pg/mL	
Avg	std2		9.0	19.48	0.	pg/mL	
Avg	std3		36.5	102.54	0.	pg/mL	
Avg	std4		97.0	259.26	0.	pg/mL	
Avg	std5		629.0	1389.59	0.	pg/mL	
Avg	std6		2733.8	5092.38	1.906	pg/mL	
Avg	std7		7712.5	19998.16	0.	pg/mL	

Controls:

Loc	Control	Expected Conc	MFI	Low Limit	High Limit	Test Result	CV	Unit	Comments
A3	E * con1	249	143.0	162	336				
B3	con1	249	117.0	162	336	307.83		pg/mL	Sys: Insufficient Bead Count- Sample Timed Out

Data Interpretation Report

6/16/2009 2:20:19 PM

Loc	Control	Expected	MFI	Low Limit	High	Test Result ^{CV}	Unit	Comments
C3	con2	Conc 1160.5	665.0	754	Limit 1567	1459.87	pg/mL	Sys:Insufficient Bead Count- Sample Timed Out
D3	E * con2	1160.5	749.0	754	1567			
Avg	con1		117.0			307.83	pg/mL	
Avg	con2		665.0			1459.87	pg/mL	

Samples:

Loc	Sample ID	MFI	Test Result	CV	Unit	Comments
Avg	Background	6.0				
A1	* Background	7.0				Sys:Insufficient Bead Count- Sample Timed Out
B1	Background	6.0				Sys:Insufficient Bead Count- Sample Timed Out
E3	1	12.5	156.33		pg/mL	DilFact = 5
F3	1	12.5	156.33		pg/mL	DilFact = 5
G3	2	14.5	188.62		pg/mL	DilFact = 5
H3	2	14.0	180.63		pg/mL	DilFact = 5
A4	3	12.5	156.33		pg/mL	DilFact = 5- Sys: Insufficient Bead Count- Sample Timed Out
B4	3	14.0	180.63		pg/mL	DilFact = 5- Sys: Insufficient Bead Count- Sample Timed Out
C4	4	8.5	88.60		pg/mL	DilFact = 5- Sys: Insufficient Bead Count- Sample Timed Out
D4	4	9.0	97.38		pg/mL	DilFact = 5- Sys: Insufficient Bead Count- Sample Timed Out
E4	5	7.0	61.49		pg/mL	DilFact = 5
F4	5	7.0	61.49		pg/mL	DilFact = 5
G4	6	7.0	61.49		pg/mL	DilFact = 5
H4	6	6.5	52.11		pg/mL	DilFact = 5
A5	7	7.0	61.49		pg/mL	DilFact = 5- Sys: Insufficient Bead Count- Sample Timed Out
B5	7	7.0	61.49		pg/mL	DilFact = 5- Sys: Insufficient Bead Count- Sample Timed Out
C5	8	11.5	139.85		pg/mL	DilFact = 5- Sys: Insufficient Bead Count- Sys:Sheath Pressure Upper Limit Exceeded
D5	8	11.5	139.85		pg/mL	DilFact = 5
E5	9	23.5	326.43		pg/mL	DilFact = 5
F5	9	20.0	274.01		pg/mL	DilFact = 5
G5	10	6.5	52.11		pg/mL	DilFact = 5- Sys: Sheath Pressure Upper Limit Exceeded
H5	10	6.5	52.11		pg/mL	DilFact = 5
A6	11	9.5	106.06		pg/mL	DilFact = 5- Sys: Insufficient Bead Count- Sample Timed Out
B6	11	9.0	97.38		pg/mL	DilFact = 5- Sys: Insufficient Bead Count- Sample Timed Out
C6	12	8.5	88.60		pg/mL	DilFact = 5- Sys: Insufficient Bead Count- Sample Timed Out
D6	12	9.0	97.38		pg/mL	DilFact = 5
E6	13	7.0	61.49		pg/mL	DilFact = 5
F6	13	6.5	52.11		pg/mL	DilFact = 5
G6	14	6.5	52.11		pg/mL	DilFact = 5
H6	14	7.5	70.68		pg/mL	DilFact = 5
A7	15	1.5	<4.88		pg/mL	DilFact = 5- Sys: Insufficient Bead Count- Sample High/Low- Sample Timed Out
B7	15	4.0	<4.88		pg/mL	DilFact = 5- Sys: Insufficient Bead Count- Sample High/Low- Sample Timed Out
C7	16	8.0	79.71		pg/mL	DilFact = 5
D7	16	8.0	79.71		pg/mL	DilFact = 5
E7	17	5.5	32.58		pg/mL	DilFact = 5
F7	17	5.0	22.22		pg/mL	DilFact = 5
G7	18	6.0	42.50		pg/mL	DilFact = 5
H7	18	6.0	42.50		pg/mL	DilFact = 5
A8	19	5.5	32.58		pg/mL	DilFact = 5- Sys: Insufficient Bead Count- Sample Timed Out
B8	19	6.0	42.50		pg/mL	DilFact = 5- Sys: Insufficient Bead Count- Sample Timed Out
C8	20	5.0	22.22		pg/mL	DilFact = 5- Sys: Insufficient Bead Count- Sys:Sheath Pressure Upper Limit Exceeded
D8	20	5.0	22.22		pg/mL	DilFact = 5
E8	21	3.0	<4.88		pg/mL	DilFact = 5- Sys: Sample High/Low
F8	21	3.0	<4.88		pg/mL	DilFact = 5- Sys: Sample High/Low

Loc	Sample ID	MFI	Test Result	CV	Unit	Comments
G8	22	6.0	42.50		pg/mL	DilFact = 5- Sys:Sheath Pressure Upper Limit Exceeded
H8	22	6.0	42.50		pg/mL	DilFact = 5
A9	23	5.0	22.22		pg/mL	DilFact = 5- Sys:Insufficient Bead Count- Sys:Sheath Pressure Upper Limit Exceeded
B9	23	5.5	32.58		pg/mL	DilFact = 5- Sys:Insufficient Bead Count- Sample Timed Out
C9	24	6.5	52.11		pg/mL	DilFact = 5- Sys:Insufficient Bead Count- Sample Timed Out
D9	24	6.0	42.50		pg/mL	DilFact = 5
E9	25	5.0	22.22		pg/mL	DilFact = 5
F9	25	5.5	32.58		pg/mL	DilFact = 5
G9	26	13.0	164.48		pg/mL	DilFact = 5
H9	26	14.5	188.62		pg/mL	DilFact = 5
A10	27	5.0	22.22		pg/mL	DilFact = 5- Sys:Insufficient Bead Count- Sample Timed Out
B10	27	5.0	22.22		pg/mL	DilFact = 5- Sys:Insufficient Bead Count- Sample Timed Out
C10	28	15.0	196.57		pg/mL	DilFact = 5- Sys:Insufficient Bead Count- Sample Timed Out
D10	28	16.5	220.18		pg/mL	DilFact = 5
E10	29	15.0	196.57		pg/mL	DilFact = 5- Sys:Sheath Pressure Upper Limit Exceeded
F10	29	16.0	212.35		pg/mL	DilFact = 5
G10	30	19.0	258.78		pg/mL	DilFact = 5
H10	30	20.0	274.01		pg/mL	DilFact = 5
A11	31	6.0	42.50		pg/mL	DilFact = 5- Sys:Insufficient Bead Count- Sys:Sheath Pressure Upper Limit Exceeded
B11	31	6.0	42.50		pg/mL	DilFact = 5- Sys:Insufficient Bead Count- Sample Timed Out
C11	32	8.0	79.71		pg/mL	DilFact = 5
D11	32	6.5	52.11		pg/mL	DilFact = 5
E11	33	6.0	42.50		pg/mL	DilFact = 5- Sys:Sheath Pressure Upper Limit Exceeded
F11	33	6.0	42.50		pg/mL	DilFact = 5
G11	34	6.0	42.50		pg/mL	DilFact = 5
H11	34	6.0	42.50		pg/mL	DilFact = 5
A12	35	8.0	79.71		pg/mL	DilFact = 5- Sys:Insufficient Bead Count- Sample Timed Out
B12	35	8.5	88.60		pg/mL	DilFact = 5- Sys:Insufficient Bead Count- Sample Timed Out
C12	36	2.5	<4.88		pg/mL	DilFact = 5- Sys:Sample High/Low
D12	36	-1.0	<4.88		pg/mL	DilFact = 5- Sys:Sample High/Low
E12	c1	133.5	347.13		pg/mL	
F12	c1.1	110	286.01		pg/mL	
G12	c2	655.5	1411.09		pg/mL	
H12	c2.1	639.5	1378.00		pg/mL	
Avg	1	12.5	156.33	0.00	pg/mL	
Avg	2	14.3	184.62	3.06	pg/mL	
Avg	3	13.3	168.48	10.20	pg/mL	
Avg	4	8.8	92.99	6.68	pg/mL	
Avg	5	7.0	61.49	0.00	pg/mL	
Avg	6	6.8	56.80	11.68	pg/mL	
Avg	7	7.0	61.49	0.00	pg/mL	
Avg	8	11.5	139.85	0.00	pg/mL	
Avg	9	21.8	20.10	12.35	pg/mL	
Avg	10	6.5	52.11	0.00	pg/mL	
Avg	11	9.3	101.72	6.03	pg/mL	
Avg	12	8.8	92.99	6.68	pg/mL	
Avg	13	6.8	56.80	11.68	pg/mL	
Avg	14	7.0	61.40	21.39	pg/mL	
Avg	15	2.8	N/A	0.00	pg/mL	
Avg	16	8.0	79.71	0.00	pg/mL	
Avg	17	5.3	27.40	26.74	pg/mL	
Avg	18	6.0	42.50	0.00	pg/mL	
Avg	19	5.8	37.54	18.69	pg/mL	
Avg	20	5.0	22.22	0.00	pg/mL	
Avg	21	3.0	N/A	0.00	pg/mL	
Avg	22	6.0	42.50	0.00	pg/mL	
Avg	23	5.3	27.40	26.74	pg/mL	
Avg	24	6.3	47.31	14.37	pg/mL	

Data Interpretation Report

6/16/2009 2:20:19 PM

Loc	Sample ID	MFI	Test Result	CV	Unit	Comments
Avg	25	5.3	27.40	26.74	pg/mL	
Avg	26	13.8	176.55	9.67	pg/mL	
Avg	27	5.0	22.22	0.00	pg/mL	
Avg	28	15.8	208.37	8.01	pg/mL	
Avg	29	15.5	204.46	5.46	pg/mL	
Avg	30	19.5	266.39	4.04	pg/mL	
Avg	31	6.0	42.50	0.00	pg/mL	
Avg	32	7.3	65.91	29.61	pg/mL	
Avg	33	6.0	42.50	0.00	pg/mL	
Avg	34	6.0	42.50	0.00	pg/mL	
Avg	35	8.3	84.15	7.47	pg/mL	
Avg	36	.8	N/A	0.00	pg/mL	

Capítulo 2 - Artigo científico

Histomorphometric aspects of knee cartilage in rats with arthritis after iontophoresis treatment with ascorbic acid

Mauricio Ferraz de Arruda¹. Maria Rita Pacheco². Lucas Langoni Cassettari³. Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira⁴.

Summary

Despite several clinical and experimental research, little is known about the pathogenesis of osteoarthritis and its treatment is a real challenge. Therefore, the study of cartilage is one of the most adequate ways for its understanding. The study of a noninvasive treatment methodology becomes necessary for the acceleration of the repair process. The present study features the cellularity and thickness of femur articular cartilage in rats with arthritis by using the therapy of iontophoresis. To evaluate these objectives, histological analysis was carried out in Hematoxylin and Eosin, the cellularity and thickness of cartilage were viewed and evaluated qualitatively and quantitatively by manual counting per area of $700.09 \mu\text{m}^2$. The results show that with IFAA treatment, the group obtained normality of variable cellularity ($40.1 \text{ cells } \mu\text{m}^2$) and maintenance of non calcified cartilage ($75.5\mu\text{m}$) suggesting normal thickness. The untreated group C+ , on the other hand, presented lower average in the number of chondrocytes ($13.0\mu\text{m}^2$), ($P<0.05$), and in relation to thickness of cartilage it showed higher average to calcified cartilage with thickness of ($104.8\mu\text{m}$) and less average of non calcified cartilage ($53.3\mu\text{m}$).

Key words: iontophoresis, cartilage, injury, repair

1 Paulista Sao Paulo State University, UNESP, Bioscience and Biotechnology Applied to Pharmacology, Bauru-Jau Road, Km 1, Campus FCFAR-UNESP, Zip Code 14801-902, Araraquara-SP, Brazil email: zigomaticoah@ig.com.br

2 Paulista Sao Paulo State University, UNESP, Morphology and Animal Physiology of Veterinarian and Agrarian Sciences College, Zip Code 05698-900, Campus FCAV-UNESP, Jaboticabal-SP, Brazil.

3 Paulista Sao Paulo State University, UNESP, Bases of the General Surgery of Medicine College, Zip Code 18618-970, Campus FM-UNESP, Botucatu-SP, Brazil.

4 Paulista Sao Paulo State University, UNESP, Institute of Chemistry, R. Degner Francisco, s / n °, Department of Biochemistry and Technology, Mail Box 355, Zip Code 14800-900, Araraquara-SP, Brazil, email: olgamascarenhaso@gmail.com

Author to whom correspondence must be sent:

Olga Mascarenhas Faria Oliveira, PhD UNESP, Paulista State São Paulo University, UNESP Institute of Chemistry Depto. Biochemistry and Technology Address: Francisco Degner Street s/n - Box 355 Zip code 14801-970 - Araraquara- São Paulo -Brazil Phone: 55 16 3301-6677 begin_of_the_skype_highlighting + 55 16 3301-6677 end_of_the_skype_highlighting; Fax +55 16 3301-6692 e-mail: olga@iq.unesp.br website: <http://www.iq.unesp.br>

Introduction

Osteoarthritis, characterized by degeneration of joint, cartilage loss and changes in the subchondral bone, affects more than 40 million people in Brazil and this number increases to 50 million in the United States [19]. It is one of the major causes of disability among adults in American population. [10].

There is an incidence of 35% in the knees, which appears after the age of 30, increasing dramatically with age and affecting 80% of those over 50 years old. So far, the adopted treatment has the purpose of relieving pain as much as possible, while tissues continue deteriorating [19].

Due to normal wear, tissues suffer constant damage and may be reinstated or restored. During the process of aging, diseases or injuries offer poor conditions and consequently the tissues damage more quickly and there is no time to be regenerated. When the increase of matrix degenerated by chondrocytes enzymes exceeds the increase of the new synthesized matrix, cartilage degenerates naturally; chondrocytes in excess may create substances that are useful to the replacement of cartilage and but also create enzymes which may destroy its components. [16]. Some of the actions used to combat this kind of degenerative injury that does not have an instantaneous healing are the transplants of chondrocytes, total and partial arthroplasties which may help since it is not invasive, because being invasive it may cause serious damage to adjacent tissues. [18]

One of the most usual research methods in osteoarthritis is the experimental animal model by using intra-articular inoculation of (Zy) Zymosan, where it leads to the loss of glycosaminoglycan matrix, resulting in arthritis in progressive grade [13].

Ascorbic acid is one of the predecessors of collagen that along with elastin and other complex structures like the chains of glycosaminoglycans and proteoglycans constitute cartilage [12]. This collagen is embedded in a steady hydrated proteoglycan gel. Proteoglycan is formed by a central core protein and possesses sulfated glycosaminoglycans (GAGs) linked to this core. These proteoglycans can be found as monomers and also in attached form. Attached proteoglycans are composed of a central hyaluronic acid chain and (GAG) non sulfated glycosaminoglycans with multiple monomers attached to it.

It is believed that the factors which influence the local or systemic healing process also influence the final appearance of the scar, thus, systemic factors such as malnutrition and lack of vitamin C, inhibit collagen synthesis and influence several components of inflammation [6,21].

Obtaining an administration technique of ascorbic acid in biological tissue is a substantial factor in this study. The purpose here is to show how a non-invasive therapy based on ionized transdermal passage can contribute to possible advantages in the results of this type of cartilage injury, compared to other mechanisms such as articular infiltration. This way refers to iontophoresis. Thus, there is no description in the scientific literature on the use of polarized current as a vector to a biological substrate, which can process some articular cartilage healing in animal models.

In this study we tried to evaluate microscopically the histology of an articular cartilage of rats with arthritis induced, under the treatment with iontophoresis in the presence and absence of L - ascorbic acid determining chondral degradation, and the expected maintenance of it in different applications of iontophoresis through histological analysis by hematoxylin-eosin (H & E).

Materials and Methods

Study design

In the study, 24 rats (*Norvegicus Albinus, Wistar*) were used. They were clinically healthy, adult male from the same line, (250-300g), of approximately 16 to 20 weeks, old packaged, bundled and kept in standard plastic cages, three animals per cage, controlled environmental conditions (luminosity 12h light and dark cycle in controlled temperature, food and water *ad libitum*, commercial pet food used.) The experimental groups contained six animals each. They were treated as follows: i) IFSF - Group Iontophoresis with Saline Solution, (*Iontoforese com Solução Fisiológica* in Portuguese) - first they took Zymosan injection (*Saccharamyces cerevisiae, Sigma Chemical Co.*); then they were treated with iontophoresis using 1 mL of saline (SF), galvanic current 1 mA (milliamps) / 10 min; after that, the rats had shaving and antisepsis, a treatment once a day for 10 days. ii) IFAA - Group Iontophoresis with ascorbic acid, (*Iontoforese com Ácido Ascórbico* in Portuguese) - first they took Zymosan injection, followed by treatment receiving ascorbic acid (from MERK ®) 100 mg / kg in 1 mL of SF, by iontophoresis, with galvanic current to 1mA / 10 min and after that rats had shaving and antisepsis, 1 once a day for 10 days. iii) C (+) - Positive Control Group, took Zymosan injection and without therapy. iv) C (-) - Negative control group without intervention.

The proposed work / experimental development was approved by the Ethics and Animal Welfare (CEBEA / UNESP), receiving the Protocol No.: 015994-07.

Beforehand the rats were anesthetized in proportion to body mass, with a combination of ketamine (95mg/kg) and xylazine (12mg/kg) that was injected intraperitoneally with an insulin syringe, so that it went through the protocol of induction of arthritis later. The animals were restrained according to the standard procedure and the needle was inserted into the right lower quadrant (avoiding the midline) toward the cephalic region. A little was breathed to confirm that it didn't puncture blood vessel or intestinal loop. All animals were weighed at the end of the experiment.

Protocol for Induction of Osteoarthritis

The induction of arthritis was performed by using 1mg of Zymosan dissolved in 5 μ l of sterile saline 0.9%, [20], and was carefully injected into the left knee joint (after shaving and antisepsis with Polvidona) through the medial face just below the patellofemoral ligament, trying to avoid leakage by adjacent tissues, so that the entire solution remained inside the cavity with a single dose, with the purpose of promoting the inflammatory process and subsequent chondral degradation. For such purpose, needle insulin was used.

Treatment Protocols

The animals from IFSF group were the control group and received an electrode (3.0 x 5.0 cm) and a probe applicator (1.0 X1, 0cm) of electrostimulator (KW *Dyadinaction standard electronics* Campinas SP-Brazil), in their back and in their left knee respectively. The electrode of the back was connected to the anode (positive pole) and the one of the knee was connected to the cathode (negative pole) [14]. Between the electrodes and the skin of the animals, gauze pads moistened with 1ml of saline solution were interposed, and they remained in this position for 10 minutes, the electrostimulator emitted continuous current with amplitude of 1mA, and such treatment was administered for 10 days.

The animals from IFAA group were also subjected to similar procedures performed in group IFSF, but the saline found in the gauze pad under the negative electrode was replaced by 100mg/kg of L-ascorbic acid dissolved in 1 ml of saline (SF). The treatment was carried out for 10 days.

Data Collection and analysis of material

The rats were sacrificed by decapitation and after exsanguination the hip was disarticulated so that the legs could be removed. These legs were duly stored in bottles with proper identification, containing 10% formaldehyde at room temperature. All efforts were made not only to minimize animal suffering but also to limit the number needed for investigations. Later the bone parts were decalcified in 7.5% nitric acid for four hours. After that, the parts were inserted in histosec where each piece went through a cut of 5 μm micrometers in the sagittal plane perpendicular to the articular surface of the knee joint. From each block six serial cuts were made with 5 μm thick and 50 μm range between the cuts, using Leica RM2255 Microtome. Then, a total of six cuts from the central region of the knee were obtained after the staining used. For the histological analysis and articular cartilage, the slides were stained with hematoxylin-eosin.

Table 1 of LeRoux [17] was adapted for our studies of classification of histomorphometric damage on the articular cartilage after arthritis damage to qualitative descriptive determination regarding to cellularity.

Table 1: Criteria for assessing the levels of articular cartilage damage, based on histological grading systems to the articular cartilage by Mankin et al (1971) and LeRoux et al (2001) modified.

Normal	0
Hypercellularity	1
Diffuse Hypercellularity	2
Hypocellularity	3

All slides were evaluated through light microscopy by two observers, who were always the same. Before the evaluation a pilot study had been done to observe the structure of articular cartilage of normal rats and rats with arthritis. That study also worked as training for the observers with regard to the parameters to be evaluated.

The variable cellularity was qualitatively and quantitatively evaluated after the sections stained with H & E. The cuts on the knees of the negative control rats were used as parameters for comparison with all groups of the experiment throughout the evaluations. The tissue was evaluated over its entire length, starting from a smaller increase 20X until the evaluation field by field, still full extent, with an increase of 40X. Regarding the

qualitative analysis, the histological cut containing two fields with increased cellularity was considered hypercellularity. When these two fields presented alterations in the sequence of chondral zones, it was considered diffuse hypercellularity. When there was cellular reduction in detriment to that observed in negative group control of the pilot model it was considered hypocellularity. [17].

The thickness of cartilage may be regarded as normal when there is some difference between the calcified cartilage and non calcified of low to high respectively, if it doesn't follow this pattern it is classified as modified [22].

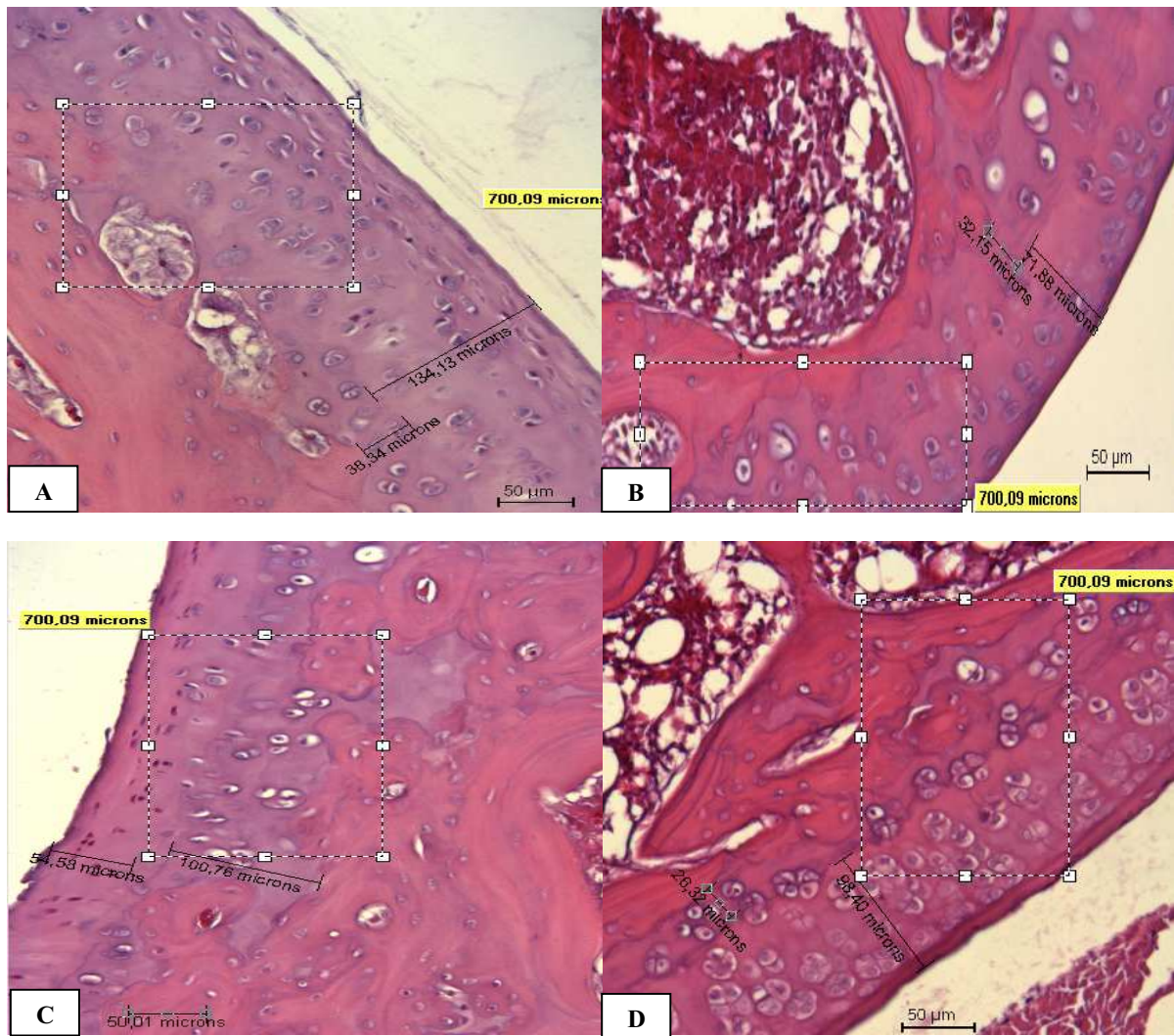
In relation to the quantitative analysis it was used the count per area, determined as a pattern of 700,09 μm^2 by means of a software provided with the principle of photomicrography, always based on the benchmark 50 micron bar for calibration of each picture. This way, the number of cells was counted manually following the cellularity criteria intended within the respective quadrant. The measure in μm of the calcified and non calcified cartilage of different groups could be verified as well. The organization and preparation of data for statistical analysis were performed by using SAS program (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA) delineation used to analyze the cellularity variables and thickness of calcified and non calcified cartilage. The method of analysis of variance was performed and this can be seen as an extension of the Student t test for independent samples. As in the t test of independent samples, the ANOVA method compares a measure of magnitude, variability observed within k samples with a measure of variability among the averages of these samples. Finally, the Tukey test was also applied to verify which treatments are different, adopting $p < 0.05$ as significant.

Results

Histologic Findings

When cellularity was compared among the different groups it was observed that only C- and IFAA groups were considered statistically equal ($P < 0.05$), with averages (41.6 and 40.1 cells per μm^2) showing significantly normal cellularity grade 0 and physiologic characteristics of cartilage with its difference between the layers being followed. That is illustrated respectively in picture 1, images A and B. The group IFSF, obtained the average (63.1, μm^2) with characteristics of hypercellularity grade 1 so that there is an increase in the number of cells ($P < 0.05$). However, it is a disorderly increase since it does not obey the columnar standards peculiar to its layers, image C seen in picture 1. Yet, the treatment C + (positive control) showed results that are different

from the others with lower average ($13.0\mu\text{m}^2$) on the number of chondrocytes, with rarefaction in the number of cells ($P < 0.05$). There it was noticed a state of deterioration in the general chondral characteristic and immature chondrocytes, showing hypocellularity grade 3 found in picture 1 image D.



Picture 1: Photomicrographs of distal femoral in H & E (20X) **A, B, C, D:** they are displaying analysis of calcified cartilage thickness measured from the interface of subchondral bone until tidemark and non calcified cartilage from tidemark until the surface of articular cartilage. It also shows the method of morphometric analysis for manual count of cells focusing on variable cellularity within a central area of $700.09\mu\text{m}^2$. (Bar = $50\mu\text{m}$). **A:** group C- normal cellularity grade 0; **B:** group IFAA normal cellularity grade 0; **C:** Group C+ hypocellularity grade 3; **D:** Group IFSF hypercellularity grade 1, according to table *Mankin et al.*

When the thicknesses of cartilage were compared among the different groups it was seen that group C+ showed the highest average for calcified cartilage with thickness of (104.8 μm) statistically equal to no other ($P < 0.05$) which can be seen in Picture 1 image C. On the other hand in the groups C-, IFAA and IFSF lower average for calcified cartilage was observed ($P < 0.05$), respectively (39.6 μm , 21.6 μm e 28.5 μm) which can be seen in Picture 1 images C, B and D respectively, providing a possible answer to maintain the characteristics of this layer. In relation to the thickness of non calcified layer in these cartilages it must be seen an inversion in its distribution by checking that C+ has the lowest average of non calcified cartilage (53.3 μm), therefore, it has lower thickness, unlike any other treatment, ($P < 0.05$), as it is illustrated in Picture 1 image C. Group C- obtained the highest average of thickness (134.1 μm) while groups IFSF and IFAA obtained an average of (91.8, 75.5 μm) which suggests normal thickness showed in Pictures D and B if compared to the ones of the positive control group ($P < 0.05$).

Discussion

The results show that the morphological cellular behavior generally varied with the treatments and the articular cartilage changed this behavior in the electrical therapy. In relation to the variable cellularity, chondrocytes that were in the groups treated with galvanic current with or without L-ascorbate increased cellularity with normality in groups C- and IFAA. Such fact indicates that the treatment with direct current was effective in relation to secondary prevention from loss of chondrocytes, making this increase in cell numbers coherent with the disposal of the same layers that constitute the cartilage, with statistical significance. IFSF group had the highest average in cellularity, which means an increase in this variable, but not to converge to a physiological improvement, because there was the formation of isogenous groups.

This feature of induction in tissue proliferation is consistent with studies of Grace and Aaron [14.1], who examined the effect of electric field in osteochondral defects in trochlear groove of rats, where they could observe early vascular reaction, matrix synthesis, tissue repair and chondrogenesis with the application of continuous current.

The micro current devices are designed to mimic the functions and the bioelectric signals of human body, generating an electric current to compensate for the bioelectricity that became reduced in the injured tissue. That increases the body's ability to transport nutrients to cells in the affected area [8], thus, it demonstrates that

this theory can be applied in the current study in accordance with the achieved results, because if it is compared to the positive control group, iontophoresis groups based on saline and ascorbic acid showed this increase, and it can be noticed a better proliferative state denoted on the histological slides that clearly show a gain in the variable cellularity.

Comparing the groups, the treatment with ascorbic acid in this study showed an improvement in the cellular arrangement in the group where it was administered, and in accordance with the study proposed by Chowcat et al [9] who states that collagenase is synthesized on demand and controlled by a tissue inhibitor of metalloproteinase. He adds that supplementation of vitamin C, despite having no influence on these enzymes, provides greater flow of substrate, which could be responsible for chemical reactions that induce the synthesis of collagen [2-3,4-5].

The alteration of thickness in the cartilaginous tissue was also a research factor and is an important indicator of degeneration, since the articular cartilage depends on the composition and organization of the extracellular matrix, besides the relationship itself between matrix and chondrocyte in resistance to mechanical load.

There are only few investigations of the literature that assess the thickness of different regions of cartilage. In theories proposed by Carter and Wong [7], it is shown that the decrease of hydrostatic load promotes an inhibition of the physiological progress in the layer of the sub-chondral bone and calcified cartilage, impeding it from advancing towards the articular surface. According to a study by Del Carlo et al [11] an increase in the calcified cartilage was observed. It was also found that the subchondral bones of rats whose cartilage had loss of ability to absorb mechanical stress had to bear greater load. Thus the present study confirms what was described by these authors, showing that there was an increase of calcified cartilage in group C+, ie, groups that had no intervention treatment with continuous current alone and with L-ascorbic acid, thus characterizing reduction and alteration in cellular distribution making the load resistance be reduced and also cartilage tidemark line advance to cartilage surface.

Conclusion

The procedure of electrical current with l-ascorbic acid used in this study was beneficial to articular cartilage with osteoarthritis previously induced by zymosan, promoting changes in the cartilage tissue and leading it to a normal variable cellularity and maintenance of non calcified cartilage thickness. Regarding the untreated group, it was shown a reduction of cellular and non calcified cartilage layer and an increase of the calcified one. Research with control groups, using unconventional methods, may allow advancement of medical treatments, and demonstrate adequately that it is possible to use iontophoresis for this purpose, requiring further studies.

Conflict of interest statement - Each author certifies that he or she has no commercial associations that might pose a conflict of interest in connection with the submitted article

Referências

1. Aaron R K, Ciombor D M (1996) Acceleration of experimental endochondral ossification by biophysical stimulation of the progenitor cell pool. **Journal of Orthopaedic Research**, v.14,582-589.
2. Arantes V A, Okawa R Y, Pereyra W J F, Barbosa A J A, Petroianu A (1999). Influência da icterícia obstrutiva na cicatrização da pele e de anastomose jejunal em ratos. **Rev Col Bras Cir** 269-73.
3. Arantes V N, Okawa R Y, Silva A A, Barbosa A A, Petroianu A (1994). Efeito da metilprednisolona sobre a tensão anastomótica jejunal. **Arq Gastroenterol** 97-101.
4. Barbul A (1990). Immune aspects of wound repair **Clin Plast Surg** 17:433-42.
5. Barbul A (1988). Role of T-cell dependent immune system in wound healing. Biological and clinical implications **A R Liss** 161-75.
6. Brasileiro-filho G, Pereira F E L, Pittela J E H, Bambirra E A, Barbosa A J A et al (1998). **Patologia Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 73-77.
7. Carter D R, Wong M (1988).The role of mechanical of loading histories in the development of diarthrodial joints. **J Orthop Res**. 805-815.
8. Cheng N, Van hoff H, Bockx E et al (1982) The effect of electric currents on ATP generation protein synthesis, and membrane transport in rat skin. **Clin, Orthop** v. 171, .264- 272.
9. Chowcat N L, Savage F J, Hembry R M, Boulos PB(1988) Role of collagenase in colonic anastomoses: a reappraisal. **Br J Surg** .330-333.
10. Chubinskaya S, Hurtig M (2007) OP-1/BMP-7 in cartilage repair. **Int Orthop** 31:773–781

11. Del Carlo R J, Galvão M.R, Vitoria MIV, Natali AJ, Barbosa ALT Monteiro B.S, Pinheiro LCP (2007). Experimental immobilization and remobilization rat knee joints: clinical and microscopic study **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.2, 363-370,
12. Fenske N A, Lober C W (1986) Structural and functional changes of normal aging skin. **J Am Acad Dermatol**, v.15, 571-85.
13. Frasnelli ME, Tarussio D, Chobaz-Péclat V, Busso M, SO. A. TLR2 (2005) modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. **Arthritis Res Ther**; 7:370-379.
14. Grace K.L, Revell W.J, Brookes M (1998). The effects of pulsed electromagnetism on fresh fracture healing: osteochondral repair in the rat femoral groove. **Orthopedics**, v.21, n.3, 290-304.
15. Green PG (1996). Iontophoretic delivery of peptide drugs. **J Control Release**. 33-38.
16. Goodheart G (1954) A Presentation of a New Approach to Correction of Disc Lesions, **ACA Journ. Chiro**, Dec, 36-37.
17. Le Roux MA, Cheung HS, Bau JL, Wang JY, Howell DS, Setton LA (2001) Altered mechanics and histomorphometry of canine tibial cartilage following joint immobilization. **Osteoarthritis and Cart.** 633- 40.
18. Nakayama J, Fujioka H (2009) The effect of fibroblast growth factor-2 on autologous osteochondral transplantation. *Int Orthop* 33:275–280
19. Pizzorno J (1995) Natural Medicine Approach to Treating Osteoarthritis, **Alt & Comp Ther**, Jan/Feb. 93-95
20. Rocha AC, Aragao JR, Oliveira RC, Pompeu MML, Vale MR, Ribeira RA (1999) Periarthritis primate's gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. **Inflamm Res** v.48, 485-490.
21. Ross M. L, Reith E.J, Rownell L. J (1993). **Histologia Texto e Atlas**. São Paulo: Panamericana, 47-115, 347-376
22. Vanwanseele B, Lucchinetti E, Stussi E (2002). The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions. **Osteoarthritis and Cartilage** .409-418.

