

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**INFLUÊNCIA DO SULFATO DE CONDROITINA E DA LECTINA
DE SEMENTE DE *Cratylia mollis* (Cramoll 1,4) EM RELAÇÃO À
CRIOTERAPIA E ULTRASSOM TERAPÊUTICO SOBRE LESÃO
EM CARTILAGEM DO JOELHO DE COELHOS**



PAULO HENRIQUE ALTRAN VEIGA

ORIENTADORA: MARIA TEREZA DOS SANTOS CORREIA

**RECIFE
2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**INFLUÊNCIA DO SULFATO DE CONDROITINA E DA LECTINA
DE SEMENTE DE *Cratylia mollis* (Cramoll 1,4) EM RELAÇÃO À
CRIOTERAPIA E ULTRASSOM TERAPÊUTICO SOBRE LESÃO
EM CARTILAGEM DO JOELHO DE COELHOS**

PAULO HENRIQUE ALTRAN VEIGA

ORIENTADORA: MARIA TEREZA DOS SANTOS CORREIA

**RECIFE
2012**

PAULO HENRIQUE ALTRAN VEIGA

**INFLUÊNCIA DO SULFATO DE CONDROITINA E DA LECTINA
DE SEMENTE DE *Cratylia mollis* (Cramoll 1,4) EM RELAÇÃO À
CRIOTERAPIA E ULTRASSOM TERAPÊUTICO SOBRE LESÃO
EM CARTILAGEM DO JOELHO DE COELHOS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como cumprimento das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração, Biologia Química para Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

V426i Veiga, Paulo Henrique Altran

Influência do sulfato de condroitina e da lectina de semente de *Cratylia mollis* (Cramoll, 1,4) em relação à crioterapia e ultrassom terapêutico sobre lesão em cartilagem do joelho de coelhos/ Paulo Henrique Altran Veiga. – Recife: O Autor, 2012.

102 folhas : il.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2012.

Inclui referências

1. Osteoartrose 2. Lectina I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orientadora) II. Título.

616.7223

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2013-059

**INFLUÊNCIA DO SULFATO DE CONDROITINA E DA LECTINA
DE SEMENTE DE *Cratylia mollis* (Cramoll 1,4) ASSOCIADOS À
CRIOTERAPIA E ULTRASSOM TERAPÊUTICO SOBRE A
CARTILAGEM DO JOELHO DE COELHOS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como cumprimento das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração, Biologia Química para Saúde.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Maria Tereza dos Santos Correia / Orientadora - UFPE

Prof.^a Dr.^a Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho - UFPE

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra - UFPE

Prof.^a Dr.^a Maria Goretti Fernandes - UNICAP

Prof. Dr. Geraldo Magella Teixeira – UNCISAL

Resultado: _____

Agosto de 2012

**A Deus, meu sempre provedor,
A minha querida esposa e companheira
Em todos os momentos de minha vida,
Aos meus lindos filhos Sabrina e Eduardo,
E agora João Pedro, minha mais nova conquista
Aos meus Pais,
A minha sogra e meu sogro,
Dedico este trabalho.**

RESUMO

Esta pesquisa visou avaliar a influência de um medicamento comercial (condroton[®]), cujo componente ativo é o sulfato de condroitina e da lectina de semente de *Cratylia mollis* (Cramoll 1,4) associados à crioterapia e ultrassom terapêutico, em lesão de cartilagem do joelho de coelhos. O extrato da semente de *C. mollis* 10% (p/v) foi preparado em NaCl 0,15 M, fracionado com sulfato de amônio (40-60% de saturação). A fração obtida (F40-60) foi submetida a cromatografia de afinidade em Sephadex G-75. Cramoll 1,4 foi obtida por eluição bioseletiva com D-glicose 0,3 M em NaCl 0,15 M, dialisada contra NaCl 0,15 M durante 24 h, e liofilizada. O estudo foi realizado através da análise das comunidades celulares (média de 250 células/indivíduo), obtidas nos estudos histológicos. Foram utilizados 18 coelhos machos da raça Califórnia, albinos, pesando entre 2,5 a 3,5 Kg, correspondendo de dois a três meses de idade (Masoud et al., 1986), totalizando uma média de 4500 células analisadas. Foi realizada lesão na cartilagem, simulando osteoartrose nos joelhos dos coelhos, e posteriormente, os animais foram divididos em nove grupos (2 indivíduos/grupo) de tratamento. Grupo controle (GC) com nenhum procedimento terapêutico; Grupo submetido à aplicação de gelo (GG); Grupo submetido à terapia com ultrassom terapêutico tipo pulsado, marca *KLD Avatar II*[®], com frequência de 1 MHz, intensidade de 535 mW/cm² (0,5W/cm²), pulso de 2:8 e previamente calibrado (GU); Grupo que recebeu injeção intra muscular de condroton[®] (GSC); Grupo que recebeu Cramoll 1,4 (GCramoll); Grupo submetido à aplicação de gelo e injeção de condroton[®] (GGSG); Grupo submetido a terapia com ultrassom e condroton[®] (GUSG); Grupo submetido à aplicação de gelo e Cramoll 1,4 (GGCramoll) e, Grupo submetido a terapia com ultrassom e Cramoll 1,4 (GUCramoll). Os resultados obtidos demonstraram que, quando comparadas a utilização do ultrassom terapêutico com condroton[®] (p=0,0251*); e ultrassom terapêutico com Cramol 1,4 (p=0,0414*), houve aumento da área do sulfato de condroitina em ambos os grupos, porém, este aumento foi maior no grupo tratado com Cramoll 1,4. A utilização de crioterapia concomitante ao uso de condroton[®] ou Cramol 1,4, não demonstrou diferenças no estudo, quando comparados os efeitos do tratamento entre 60 e 90 dias. A utilização de Cramol 1,4 aumentou a área do sulfato de condroitina (p=0,0001*), na osteoartrose da cartilagem do joelho de coelhos em 60 e 90 dias de tratamento, em comparação com o grupo controle.

Observou-se também, aumento da área do colágeno com a utilização do condroton[®] com 60 dias de tratamento, (p=0,0001*), porém, diminuindo sua área no período de 90 dias. Desta forma os autores concluíram que o ultrassom terapêutico e a *Cratylia mollis* 1,4 tem efeitos positivos sobre a osteoartrose induzida experimentalmente nos coelhos.

Palavras-chave: lectina. Cramoll 1,4. Crioterapia. Ultra-som terapêutico. Osteoartrose. Joelho.

ABSTRACT

This research aimed to evaluate the influence of a drug trade (condroton ®), whose active component is chondroitin sulfate and seed lectin *Cratylia mollis* (Cramoll 1.4) associated with cryotherapy and therapeutic ultrasound in knee cartilage injury rabbits. The seed extract of *C. mollis* 10% (w / v) was prepared in 0.15 M NaCl, fractionated with ammonium sulfate (40-60% saturation). The fraction obtained (F40-60) was subjected to affinity chromatography on Sephadex G-75. The Cramoll 1.4 was obtained by elution with D-glucose bioselective 0.3 M in 0.15 M NaCl, dialyzed against 0.15 M NaCl for 24h and lyophilized. The study was conducted by analyzing the cellular communities (mean 250 cells / individual), obtained in the histological studies. We used 18 male white rabbits California albino weighing between 2.5 and 3.5 kg, corresponding to two to three months of age (Masoud et al. 1986), totaling an average of 4500 cells analyzed. Cartilage injury was performed to simulate knee osteoarthritis rabbit and subsequently, the animals were divided into nine groups (n = 2/grupo) treatment. Control Group (CG) with no therapeutic procedure; Group submitted to the application of ice (GG), Group underwent ultrasound therapy (GU) Group received muscular injection of condroton ®, (GSC), Group 1 received Cramoll , 4 (GCramoll); Group submitted to the application of ice and injection condroton ® (GGSG) Group undergoing therapy with ultrasound and condroton ® (GUSG); Group submitted to the application of ice and Cramoll 1.4 (GGCramoll) and group undergoing therapy with ultrasound and Cramoll 1.4 (GUCramoll). The results demonstrated that when compared to use of the therapeutic ultrasound condroton® (* p = 0.0251) and with therapeutic ultrasound cramol (p = 0.0414 *), increased area of chondroitin sulfate in both groups, but this increase was greater in the group treated with cramol. The use of concomitant use of cryotherapy condroton ® or cramol 1.4 revealed no differences in the study compared the effects of treatment between 60 and 90 days. The use of cramol 1.4 increased the area of chondroitin sulfate (* p = 0.0001), in osteoarthritis of the knee cartilage of rabbit at 60 and 90 days of treatment, compared with the control group. There is also increasing the area of the collagen with the use of condroton ® 60 days of treatment (* p = 0.0001), but decreasing its area within 90 days. Thus, the authors concluded that therapeutic ultrasound and *Cratylia mollis* 1,4 has positive effects on experimentally induced osteoarthrosis in the rabbit.

Keywords: Lectin. Cramoll 1,4. Cryotherapy. Therapeutic ultrasound. Osteoarthritis. Knee.

Lista de figuras da revisão bibliográfica

Figura 1. Desenho de um corte transversal da cartilagem demonstrando a função dos proteoglicanos no mecanismo de amortecimento. A. As proteoglicanas sob compressão, liberam água para o espaço intra-articular, diminuindo a espessura da cartilagem. B. Após a liberação da carga as proteoglicanas hidrofílicas, absorvem novamente água, aumentando a espessura da cartilagem.

Fonte: BUCKWALTER *et al*, 1999.

Figura 2. Em um modelo de material elástico linear, dois componentes escalares, a tensão hidrostática e a tensão de cisalhamento octaédrico, pode representar o estado de tensão total em qualquer local na cartilagem. Adaptado de DENNIS *et al*, 2004.

Figura 3. *Cratylia Mollis*. Sementes (à esquerda) e arbusto (à direita).

Figura 4. Modelo de monômero de Cra Com-1 (azul) e Com A (amarelo)

Fonte: <http://webenligne.cermav.cnrs.fr/lectines>.

Lista de figuras artigo 1 (em português)

Figura 1a. Grupo controle x Grupo Ultrassom. Comparação dos efeitos do Ultrassom Terapêutico sobre o colágeno e o sulfato de condroitina da cartilagem entre 60 e 90 dias de tratamento. Kruskal-Wallis, $p \leq 0,05\%*$.

Figura 1b. Grupo controle x Grupo Gelo. Comparação dos efeitos do Gelo (crioterapia) sobre o colágeno e o sulfato de condroitina da cartilagem entre 60 e 90 dias de tratamento. Kruskal-Wallis, $p \leq 0,05\%*$.

Figura 2a. Grupo controle x Grupo condroton[®]. Comparação dos efeitos do condroton[®] sobre o colágeno e a condroitina da cartilagem entre 60 e 90 dias de tratamento. Kruskal-Wallis, $p \leq 0,05\%*$.

Figura 2b. Grupo controle x Grupo Cramol. Comparação dos efeitos da Cramoll 1,4 sobre o colágeno e a condroitina da cartilagem entre 60 e 90 dias de tratamento. Kruskal-Wallis, $p \leq 0,05\%*$.

Figura 3a. Comparação dos efeitos da terapia do Ultrassom Terapêutico com condroton[®] e com Cramoll 1,4, na cartilagem entre 60 e 90 dias de tratamento. ANOVA Two way , $p=0,05\%*$.

Figura 3b. Comparação dos efeitos do Gelo (crioterapia) juntamente com sulfato de condroitina e com Cramoll 1,4, na cartilagem entre 60 e 90 dias de tratamento. ANOVA Two way $p=0,05\%*$.

Figura 4a. Comparação na área total do sulfato de condroitina, entre o grupo controle, o grupo tratado com Cramoll 1,4 e o grupo tratado com condroton[®] com 60 dias de tratamento. ANOVA One way – Kruskal-Wallis test $p=0,05\%*$.

Figura 4b. Comparação na área total do sulfato de condroitina, entre o grupo controle, o grupo tratado com Cramoll 1,4 e o grupo tratado com condroton[®] com 90 dias de tratamento. ANOVA One way – Kruskal-Wallis test $p=0,05\%*$.

Figura 5a. Comparação na área total do colágeno, entre o grupo controle, o grupo tratado com Cramoll 1,4 e o grupo tratado com condroton[®] com 60 dias de tratamento. ANOVA One way – Kruskal-Wallis test $p=0,05\%*$.

Figura 5b. Comparação na área total do sulfato de condroitina, entre o grupo controle, o grupo tratado com Cramoll 1,4 e o grupo tratado com condroton[®] com 90 dias de tratamento. ANOVA One way – Kruskal-Wallis test $p=0,05\%*$.

Lista de gráficos e figuras artigo 2

Figura 1: Comparação dos resultados do colágeno e do sulfato de condroitina entre os grupos controle e os grupos onde foram utilizados ultrassom nos períodos de 60 e 90 dias. Média/área celular (μm).

Figura 2: Comparação dos resultados do colágeno e do sulfato de condroitina entre os grupos controle e os grupos onde foram utilizados Crioterapia nos períodos de 60 e 90 dias. Média/área celular (μm).

Figura 3. Exame histológico da cartilagem de coelhos. Todas as amostras foram tratadas com ultrassom terapêutico. A e D= controle. B = colágeno 60 dias de tratamento. C = colágeno 90 dias de tratamento. E =condroitina 60 dias de tratamento. F = condroitina 90 dias de tratamento. Notar em “C”(seta) a distribuição do colágeno na superfície e camada média da cartilagem. Notar em “F” (seta) a maior tendência da condroitina em se aglomerar na superfície da cartilagem. (X 100).

Figura 4. Exame histológico da cartilagem de coelhos. Todas as amostras foram tratadas com 20m de crioterapia 3x semana (Gelo). A e D= controle. B = colágeno 60 dias de tratamento. C =colágeno 90 dias de tratamento. E =condroitina 60 dias. F = condroitina 90 dias de tratamento. Notar em “B e C”(setas) a mesma distribuição irregular do colágeno em toda cartilagem. Notar em “E e F” (setas) a ausência de mudança da condroitina na cartilagem após o tratamento com gelo. (X 100)

Lista de figuras artigo 3

Figura 1. Cortes histológicos Ultrassom + Cramol (x100). A. Controle HE; B. distribuição do colágeno após 60 dias de tratamento. C. distribuição do colágeno após 90 dias de tratamento. Observar a distribuição do colágeno na superfície da cartilagem (seta).

Figura 2. Cortes histológicos Crioterapia + Cramol (x100). A. Controle HE; B. distribuição do colágeno após 60 dias de tratamento. C. distribuição do colágeno após 90 dias de tratamento. Observar a distribuição do colágeno na superfície da cartilagem (seta).

Figura 3. Distribuição do colágeno na superfície da cartilagem após aplicação do ultrassom + Cramol, entre 60 e 90 dias de tratamento. One Way ANOVA, Kruskal Wallis test $p \leq 0,005\%$.*.

Figura 4. Distribuição do colágeno na superfície da cartilagem após aplicação de Crioterapia + Cramol, entre 60 e 90 dias de tratamento. One Way ANOVA, Kruskal Wallis test $p \leq 0,005\%$.*.

Lista de tabelas da revisão bibliográfica

TABELA 1. Classificação das lectinas quanto aos aspectos estruturais. Adaptado de PEREIRA, 2012.

Lista de abreviações

AO – Osteoartrose.

Con A - Concanavalina A; lectina de sementes de *Canavalia ensiformis*.

Cramoll - Cramoll 1,4; lectina de sementes de *Cratylia mollis*, isoformas 1,4.

Cra lectina - Cramoll 1,4.

RCA - *Ricinus Communis* aglutinina.

WGA - *Wheat germ agglutin*.

PNA - *Peanut agglutinin*.

UST - Ultrassom Terapêutico.

MEC - Matriz extra celular.

CDK - *Cyclin dependent kinases*.

TGF - *Transforming growth fator*.

BMP - *Bone morphogenetic proteins*.

MMP - Matriz metaloproteinases.

GAGS - Glicosaminoglicanos sulfatado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	vii
LISTA DE FIGURAS ARTIGO 1.....	viii
LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS ARTIGO 2.....	ix
LISTA DE FIGURAS ARTIGO 3.....	x
LISTA DE TABELAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	xi
LISTA DE ABREVIACÕES.....	xii
SUMÁRIO.....	xiii
CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. OBJETIVOS.....	9
OBJETIVO GERAL.....	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
3. JUSTIFICATIVA.....	11
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
4.1. MECANOBIOLOGIA DA CARTILAGEM ARTICULAR.....	13
4.2 COMPONENTES CELULARES DA CARTILAGEM.....	15
4.3 ÁCIDO HIALURÔNICO E SULFATO DE CONDRITINA.....	18
4.4 LECTINAS.....	22
4.5 LECTINA DE SEMENTES DE CRATYLIA MOLLIS (CRAMOLL 1,4L).....	25
4.6. BIOFÍSICA E FISIOLOGIA DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO....	27
4.7. BIOFÍSICA E FISIOLOGIA DA CRIOTERAPIA.....	29
4.8. EVIDÊNCIAS QUE FUNDAMENTAM A PRÁTICA CLÍNICA COM CRIOTERAPIA E ULTRASSOM TERAPÊUTICO.....	30
5. REFERÊNCIAS DA LITERATURA.....	32
ARTIGO 1	47
ARTIGO 2.....	74
ARTIGO 3.....	89
CONCLUSÕES DA TESE.....	104

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A osteoartrose (OA) é hoje uma das afecções mais comuns na prática diária do médico e nas clínicas de reabilitação. É a patologia articular mais comum da atualidade com cerca de 27 milhões de casos apenas nos EUA (SANDEL, 2012). Cerca de 10% da população norte americana acima dos 55 anos sofre com os problemas dessa patologia, e desses pacientes, um quarto apresenta a doença de uma forma extremamente agressiva (PEAT *et al.*, 2001). No Brasil, as doenças degenerativas articulares, são responsáveis por 30-40% das consultas nos ambulatórios dos reumatologistas, sendo a segunda patologia relacionada ao auxílio doença e a quarta a determinar aposentadoria (MOREIRA, 2002; DANIELA *et al* 2010).

Apesar de ser consenso que existem aspectos genéticos envolvidos na etiologia da OA (KERKHOF *et al*, 2011), o desenvolvimento, a manutenção e a degeneração articular são regulados por fatores mecânicos como a descarga de peso excessiva e duradoura e também o movimento normal realizado pelas articulações diartrodiais. Isso pode demonstrar que a OA pode ter várias etiologias, porém, todas elas levam a interação de fatores biológicos e mecânicos. Esses fatores podem levar a um quadro que é caracterizado por degeneração da cartilagem articular e subseqüentes alterações no osso subcondral (DENNIS *et al*, 2004). A compreensão exata do mecanismo biológico que ocorre nesse processo ainda não está completamente compreendida, porém, sabe-se que o ácido hialurônico e os proteoglicanos têm um papel fundamental na mecanobiologia que envolve a proteção da cartilagem (LAJEUNESSE & DELALANDRE, 2003). Reconhecer e interpretar a cartilagem como um órgão que desempenha um papel funcional através de interações mecânicas e biológicas no nível celular tecidual parece ser o caminho a ser percorrido pelas pesquisas sobre essa entidade patológica. Por esse motivo, o tratamento de eleição em muitos casos de OA, tem sido o medicamentoso. Atualmente, o uso de drogas sistêmicas ou intra-articulares, de forma terapêutica ou preventiva, já faz parte do arsenal médico terapêutico. As terapias farmacológicas sistêmicas têm como principal objetivo o alívio da dor, através de analgésicos (acetaminofen, inibidores específicos da cyclooxygenase-2) e anti-inflamatórios não hormonais (AINH) além dos opióides. Já as

terapias intra-articulares, têm sido largamente utilizadas no Brasil e no mundo, devido à rapidez dos efeitos analgésicos e de alívio dos sintomas de degeneração da cartilagem (REZENDE *et al*, 2004). Os medicamentos utilizados para esse tratamento são principalmente os glicocorticóides, o ácido hialurônico e os tratamentos tópicos. (i.e. capsaicina e metilsalicilatos). Estes medicamentos são extremamente caros, levando a gastos na casa dos US\$ 4 bilhões ao ano nos EUA, segundo o American College of Rheumatology Subcommittee on Osteoarthritis Guidelines (2000). No Brasil, estima-se um gasto em torno US\$ 2 bilhões ao ano com o tratamento de efeitos indesejáveis da OA (MORELAND, 2003; REZENDE *et al*, 2004; LEONARDO *et al*, 2011).

Desta maneira, a grande maioria dos medicamentos para a OA, baseiam-se no estímulo à formação e agregação dos glicosaminoglicanos da cartilagem. Por esse motivo, encontrar um composto biológico economicamente viável e que tenha competência terapêutica para a agregação do sulfato de condroitina e sulfato de queratano (glicosaminoglicanos) ao ácido hialurônico, é de extrema importância. Lectinas, através de sua capacidade de interação específica com carboidratos, são capazes de induzir o fenômeno de aglutinação celular (KENNEDY *et al*, 1995; LORIS *et al*, 1998). Além de sua função fisiológica, são de interesse biotecnológico, pois possuem habilidade de ligar-se a carboidratos com especificidade considerável, sendo excelentes modelos de estudo de interações proteína-carboidrato em nível atômico (RINI, 1995). Uma preparação contendo lectina de sementes de *Cratylia mollis*, isoformas 1,4 (Cramoll 1,4), tem se mostrado um excelente agente cicatrizante em lesões cutâneas (MELO *et al*, 2011), além da característica de glucoaglutinação da Cramoll, até o momento não se verifica contra indicações de sua utilização, além de que, esta foi utilizada por conveniência, pois a sua purificação é realizada no departamento de bioquímica da UFPE, o qual está vinculado este estudo.

A diminuição da condrogênese parece ser um achado constante na OA, e esta é orquestrada por inúmeras vias de sinalização (DE LISE *et al*, 2000). Muitas destas vias são mediadas por glicoconjugados de superfície. Os padrões de distribuição dos glicoconjugados de superfície celular são altamente dinâmicos e relacionados com modificações estruturais (ZSCHÄBITZ, 1998). O consumo de várias lectinas como a

Concanavalina A (Con A), Cramoll 1,4 e *Ricinus Communis* aglutinina (RCA) por células mesenquimais indiferenciadas tem sido relatada (SILVA *et al*, 2011; MILAIRE, 1991). Vários sítios de ligação desaparecem da superfície celular quando estas progridem, de sua fase mesenquimal, para seus derivados como a galactose (ZIMMERMANN, 1984). Estas modificações nos padrões de ligação das lectinas podem ser importantes na sinalização dos caminhos que se formam durante o desenvolvimento normal da cartilagem. Tem sido sugerido que hidratos de carbono e os seus receptores correspondentes (lectinas endógenas), descodificam estas informações biológicas (ZSCHÄBITZ *et al*, 1999). Desta forma, Glicoconjugados que reagem com lectinas endógenas podem induzir a condrogenese e osteogênese, diminuindo o processo de degeneração na OA. Uma população de células osteogênicas em culturas de medula óssea em ratos, foram encontradas ligadas à aglutinina de germén de trigo (WGA, do inglês wheat germ agglutin) permitindo assim, a síntese de proteínas ósseas específicas, tais como fosfatase alcalina, o colágeno tipo I e osteocalcina, para formar nódulos mineralizados (VON VLASSELAER *et al*, 1994). A lectina do amendoin (PNA, do inglês peanut agglutinin) também demonstrou uma capacidade potencial condrogênica em embriões de galinha (STRINGA, 1996). Estas linhas de evidência apoiam a teoria de um papel funcional das lectinas em glicoconjugados na morfogênese da cartilagem. À luz destas considerações, o autor testa a hipótese de que adicionando lectinas (Cramoll 1,4), via intramuscular em coelhos com osteoartrite induzida via cirúrgica, poderá modificar vias de sinalização induzidas pela interação das lectinas com colágeno e o sulfato de condroitina remanescente da cartilagem.

DETALHES DA METODOLOGIA

O presente estudo caracteriza-se como ensaio clínico de estudo terapêutico, prospectivo, com análise qualitativa e quantitativa (Sampaio e Mancini, 2007). O estudo foi realizado através da análise das comunidades celulares (média de 250 células/indivíduo), obtidas nos estudos histológicos, totalizando uma média de 6750 células. Foram utilizados inicialmente, vinte e sete coelhos machos da raça Califórnia, albinos, pesando entre 2,5 a 3,5 Kg, correspondendo de dois a três meses de idade (Masoud *et al*, 1986). Após estudo dos resultados piloto, foram excluídas da pesquisa, as amostras com 30 dias de tratamento, sendo inseridos, portanto, apenas 18 coelhos no experimento, totalizando uma média de 4500 células a serem analisadas. Essas exclusões foram resultantes da verificação que 30 dias não foram suficientes para a completa cicatrização da cartilagem. Os animais foram alojados em sala e confinados em gaiolas metálicas apropriadas, no biotério do Núcleo de Cirurgia Experimental (NCE), no departamento de Cirurgia da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, e alimentados com ração padrão peletizada e água *ad libitum*. O pesquisador teve auxílio dos técnicos do biotério para cuidar e tratar dos animais em todo o período da pesquisa. Os coelhos foram provenientes da Associação Pernambucana de Criadores de Coelhos (APCC), especialistas em coelhos para pesquisas.

Os procedimentos cirúrgicos descritos a seguir, foram orientados e supervisionados por veterinário especialista, do Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (DMFA/UFRPE). Como droga pré-anestésica cada animal recebeu 0,2 mg/kg de peso de acepromazina 1% via intramuscular. Esta via foi indicada para padronização metodológica, pois a via de infusão do condroton®, medicamento utilizado nesta pesquisa, tem como via de infusão a intramuscular, conforme padrão do medicamento utilizado. A anestesia foi realizada através de aplicação por via intramuscular de cloridrato de ketamina 5% na dose de 50 mg/kg de peso associada a xilazina 2% na dose de 3mg / kg de peso. Após tricotomia da área cirúrgica, assepsia, anti-sepsia e colocação de campos estéreis, foi realizada incisão parapatelar medial

seguida de artrotomia e luxação lateral da patela. Com o joelho fletido, foi exposto o côndilo femoral medial e com auxílio de trefina metálica, foi criado um defeito retirando um cilindro osteocondral de 3,2 mm/4,0 mm do joelho direito. A seguir, a cápsula articular foi suturada com fio de mononáilon 4,0 em pontos separados, o tendão patelar reposicionado e o retináculo medial e a pele foram fechados, também, com fios de mononáilon 4,0 em pontos separados (Cafalli *et al.*, 1993; Ribeiro *et al.*, 2004). No período pós operatório, foram administrados como analgésico em todos os coelhos, Rimadyl® Solução Injetável pela via subcutânea na dosagem de 2,2 mg de carprofeno por kg de peso corporal uma vez ao dia por duas semanas.

Os coelhos foram divididos em nove grupos de três indivíduos, após a retirada do cilindro osteocondral do joelho para simular o defeito na cartilagem. 1-Um grupo controle que não foi submetido a nenhum procedimento terapêutico-(1GC); 2-um grupo que foi submetido à aplicação de gelo (crioterapia) (2GG); 3-um grupo que foi submetido à terapia com ultrassom-(3GU); 4-um grupo que recebeu injeção de sulfato de condroitina, nas doses de 0,1 ml/kg de peso a cada quatro dias até a eutanásia (4SC); 5- um grupo que recebeu Cramoll 1,4 (1,0 mg/ml) nas doses de 0,1 ml/Kg de peso diariamente até o dia da eutanásia (5CM); 6. Um grupo que foi submetido a crioterapia e injeção de sulfato de condroitina, nas doses de 0,1 ml/kg de peso (6GS); 7. Um grupo que foi submetido a terapia com ultrassom e sulfato de condroitina, nas doses de 0,1 ml/kg de peso (7US); 8. Um grupo que foi submetido a crioterapia e Cramoll 1,4 (1,0 mg/ml) nas doses de 0,1 ml/Kg de peso (8GCR) e, 9. Um grupo que foi submetido a terapia com ultrassom e Cramoll 1,4 (1,0 mg/ml) nas doses de 0,1 ml/Kg de peso (9UC). Cramoll 1,4 foi obtida segundo o protocolo estabelecido por Correia e Coelho (1995). A crioterapia e a aplicação do ultrassom terapêutico foram realizadas três vezes por semana, consecutivamente até o dia da eutanásia dos animais, sempre no mesmo horário, seguindo os mesmo padrões (KNIGHT K, *et al*, 1995, FANG L, *et al*, 2012). No GG, foram aplicadas bolsas de gelo através de sacos plásticos, fixados com faixa crepon, em cima do joelho direito operado por vinte (20) minutos. No GU, a aplicação do ultrassom foi realizada durante cinco (5) min, com o mesmo aparelho, após tricotomia completa na região da interlinha do joelho direito na face medial da região proximal da perna direita,

onde o côndilo femural é mais exposto e permite bom acoplamento do transdutor (Pessina e Volpon, 1999). O cabeçote do ultrassom foi aplicado tomando-se cuidado para não passar diretamente em cima da incisão cirúrgica. Durante as sessões, os animais foram contidos manualmente, para que se mantivessem calmos e confortáveis. O aparelho de ultrassom utilizado foi do tipo pulsado, marca *KLD Avatar II*®, com era de 3,00 cm² de cabeçote, frequência de 1 MHz, e potência máxima de 10w. A frequência utilizada no estudo foi de 16Hz no ciclo de pulso de 20% (2:8), por um tempo de 5 minutos, intensidade de 535 mW/cm² (0,5W/cm²) e previamente calibrado. Após o término do tratamento, foi conferida a calibragem do aparelho por técnico especialista (Hekkenberg, 2001).

Foi realizada eutanásia de um animal de cada grupo para acompanhamento do processo cicatricial através da análise imunohistológica, após trinta (30), sessenta (60) e noventa (90) dias após o procedimento cirúrgico. Os sacrifícios foram executado com anestesia similar à do pré-operatório, seguida de injeção endovenosa de 60 mg/kg de cloreto de potássio (Ribeiro et al., 2004). Os joelhos operados foram retirados através de osteotomia e examinados cuidadosamente, para anotação dos dados da avaliação macroscópica e microscópica dos reparos obtidos

Após a retirada dos materiais, foram realizadas as blocagens dos materiais, e depois feitas lamínas em HE silanizadas. Todas as amostras foram colocadas em estufa para secagem por 24h. A preparação das lâminas para a desparafinização, foi realizada com banhos de xilol por 5m, seguido de três séries de 10 mergulhos (lavagem) em xilol. Depois, três séries de 10 mergulhos em álcool 100%, 70%, e 10 mergulhos com 2 minutos de imersão em PBS. Para a recuperação antigênica, as amostras foram imersas em 25 ml de Citrato Buffer + 250ml de água destilada, e colocadas no Steamer T-FAL 700®, por 20 minutos entre 95-100°C. Após esse tempo, as amostras foram deixadas em repouso por 20m até atingir a temperatura ambiente. Foram novamente lavadas as lâminas em PBS 2x5min. Após esta lavagem, as lâminas foram imersas em solução de metanol-0,3% com H₂O₂ (para bloquear a peroxidase endógena) por 20 minutos. Lavar em PBS 2x5min. Foram recobertas as lâminas com solução bloqueadora de background

por 20min, e lavadas em PBS 2x5min. As lâminas foram enxugadas ao redor do tecido e estes recobertos com o anticorpo primário (colágeno e condroitina) e PBS, com diluição de 1/50µl. Após estes procedimentos todas as lâminas foram incubadas over-night em câmara úmida a 4⁰C, e lavadas em PBS 2x10m. As lâminas foram enxugadas ao redor do tecido e colocado solução Linker Reagente Biotinylated Mouse & Rabbit IgG, cobrindo todo material da amostra na lâmina e deixado em descanso por 1h em temperatura ambiente. Os mesmos procedimentos foram realizados com solução de Reagente Streptavidin-Peroxidase. Após estas reações, as lâminas foram lavadas em PBS 2x10m e enxugadas ao redor do tecido. A revelação foi realizada com solução de 20µl DAB cromógeno/1ml DAB substrato, cobrindo todo o tecido por 10m. Todos reagentes utilizados foram da BioSystems, Inc.

As fotos foram tiradas com câmara fotográfica Nikon com adaptador digital para microscopia DS-Fi1, PC SEATECH, Intel® Pentium® Dual CPU E2200 GHz, 1,99 GB de Ram com Sistema Microsoft Windows XP 2010. O foi utilizado software NIS-Elements F, para captação das imagens.

Quadro esquemático da metodologia do estudo.

grupo	1 controle	2 crioterapia	3 ultra som	4 sulfato condroitina	5 cramoll	6 crio + sulfato	7 ultra som + sulfato	8 gelo + cramoll	9 ultra som + cramoll	resultados estatísticos intergrupos
eutanásia	30	30	30	30	30	30	30	30	30	1 amostra
eutanásia	60	60	60	60	60	60	60	60	60	2 amostra
eutanásia	90	90	90	90	90	90	90	90	90	3 amostra
resultados estatísticos intragrupo										resultado final

Fonte: Dados do autor.

2 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Avaliar o efeito do Condroton[®] (sulfato de condroitina) e da lectina de sementes de *Cratylia mollis* (Cramoll 1,4), associados ou não à crioterapia e ultrassom terapêutico (UST) sobre lesão da cartilagem do joelho de coelhos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Realizar uma simulação de lesão via cirúrgica, na cartilagem do joelho de coelhos.
- Analisar através de imunohistologia, a área total do colágeno tipo II e do sulfato de condroitina, antes e após o tratamento com Condroton[®] e lectina de sementes de *Cratylia mollis* (Cramoll 1,4), associados à crioterapia e ultrassom terapêutico (UST) sobre a cartilagem do joelho de coelhos.
- Quantificar a área de colágeno e de sulfato de condroitina na cartilagem do joelho de coelhos.
- Avaliar através da área total (do colágeno e do sulfato de condroitina) a capacidade do Condroton[®] e da Cramoll 1,4 no estímulo do processo de cicatrização da cartilagem do joelho de coelhos durante tratamento à base de calor (Ultrassom Terapêutico - UST).

- Avaliar através da área total (do colágeno e do sulfato de condroitina) a capacidade do Condroton[®] e da Cramoll 1,4 no estímulo do processo de cicatrização da cartilagem do joelho de coelhos durante tratamento à base de crioterapia (Gelo).
- Identificar a distribuição do colágeno e do sulfato de condroitina, na cartilagem dos coelhos do estudo, após o tratamento com Condroton[®] (sulfato de condroitina) e da lectina de sementes de *Cratylia mollis* (Cramoll 1,4), associados à crioterapia e ultrassom terapêutico (UST).

3 JUSTIFICATIVA

As moléculas de proteoglicanos enchem grande proporção do volume cartilaginoso com cadeias de aminoglicanos carregadas que atraem água e cátions e repelem todos os outros, inflando em consequência disso o reticulado de fibrilas de colágeno com água. A comparação do volume máximo que os proteoglicanos podem ocupar na solução com suas concentrações na cartilagem articular mostra que, se os proteoglicanos da matriz cartilaginosa se expandissem totalmente eles encheriam um volume muitas vezes maior do que nos tecidos que os contém (BUCKWALTER & MARTIN, 1999). Entretanto, na matriz, essas moléculas exercem uma pressão constante para expandir-se, restringida apenas pela malha de fibrila colágena. A compressão da matriz intacta leva bem junto as cadeias de glicosaminoglicanos, aumentando mais ainda a resistência, forçando a água para fora do domínio molecular. A liberação da pressão permite as moléculas reexpandir-se (Figura 1).

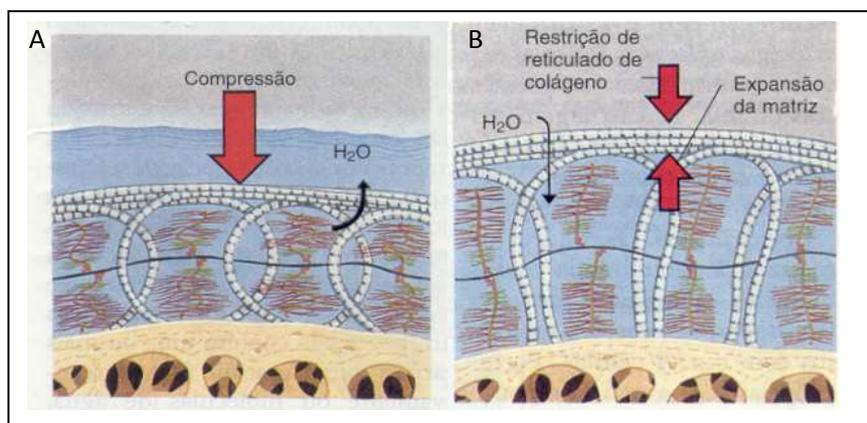


Figura 1. Desenho de um corte transversal da cartilagem demonstrando a função dos proteoglicanos no mecanismo de amortecimento. A. Os proteoglicanos sob compressão, liberam água para o espaço intra-articular, diminuindo a espessura da cartilagem. B. Após a liberação da carga os proteoglicanos hidrofílicos, absorvem novamente água, aumentando a espessura da cartilagem.

Fonte: BUCKWALTER *et al*, 1999.

O rompimento da cadeia de colágeno permite que os proteoglicanos se expandam e possa causar perda de proteoglicanos, para conseqüentemente aumentar a concentração de água e diminuir a concentração de proteoglicanos. A manutenção desse quadro leva ao

processo de degeneração cartilaginosa que conhecemos clinicamente como OA (BUCKWALTER & MARTIN, 1999; GOBEZIE *et al*, 2007; HEESCH *et al*, 2007).

Estudar o comportamento mecanobiológico com a aplicação do frio (crioterapia) e do calor (ultrassom terapêutico-UST) nos componentes cartilagosos fibrilares representados pelo colágeno e não fibrilares que correspondem aos glicosaminoglicanos, pode responder a vários questionamentos sobre o comportamento desses nos tratamentos fisioterapêuticos que ainda são baseados em dados empíricos (BLEAKLEY *et at*, 2004; GLENN JR *et al*, 2004; SILVEIRA *et at*, 2006). O domínio desse conhecimento pode sugerir a mudança da utilização de medicamentos de alto custo como eleição principal do tratamento da OA, para a utilização da terapia com aplicação de gelo (crioterapia) e a aplicação de calor profundo (UST). Dessa forma diminuindo os altos investimentos dos recursos públicos nessa afecção tão comum. Observa-se que, a maioria dos trabalhos publicados apresentam resultados macroscópicos de tratamentos das desordens físicas com utilização do calor e do frio, e muito poucos, demonstram análises imunohistológicas especificamente da cartilagem degenerada. Portanto, estudos que se propõem a verificar as alterações moleculares provocadas pela utilização do frio e do calor na cartilagem com OA, ainda são muito escassos, deixando dúvidas sobre como os elementos fibrilares e não fibrilares da cartilagem se comportam na presença desses agentes físicos. Além do mais, é importante reconhecer se esses tratamentos podem potencializar os efeitos do sulfato de condroitina e de Cramoll 1,4 na cicatrização da cartilagem após a lesão. Além disso, estudar o comportamento do sulfato de condroitina e de Cramoll 1,4 na capacidade de se agregarem ao colágeno e ao ácido hialurônico, inclusive na presença de calor e/ou do frio intra-articular, podem contribuir a desvendar os mecanismos de reconstituição da cartilagem. Pode-se então formalizar algumas questões sobre dúvidas que pairam sobre esse assunto: A quantidade de sulfato de condroitina se altera na presença de calor ou frio intra-articular? O calor e/ou o frio colaboram ou não para agregação dos proteoglicanos com o ácido hialurônico? A utilização da Cramoll 1,4 pode colaborar na agregação do sulfato de condroitina presente na cartilagem, contribuindo para melhorar a regeneração do tecido? Pode-se sugerir com bases científicas uma terapia alternativa com menor custo para a OA?

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 MECANOBIOLOGIA DA CARTILAGEM ARTICULAR

Compreende-se que as áreas da cartilagem enriquecidas com proteoglicanos, são mais resistentes às alterações degenerativas que acometem as articulações durante a OA. Um exame sistemático de várias articulações, sobre uma ampla gama de idades mostra claramente que as cartilagens mais bem conservadas são encontradas em áreas de suporte de carga. Este aumento da carga em locais específicos da cartilagem estimulam portanto, a proteção da cartilagem de maneira a que esta se torne mais resistente a estas cargas. As diferenças e variações entre os padrões de tensões (força e intensidade), levam a deformações que podem influenciar a biologia das células da cartilagem (DENNIS, 2004). Estudos identificaram que cada vez mais um grande número de genes são identificados na matriz extra celular (MEC), que banha a cartilagem sinovial. Estes genes tem papel mecanosensitivos, que incluem na MEC proteínas (colágenos, proteoglicanos); proteínas de crescimento e regulação do ciclo celular; ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDKs do inglês *cyclin dependent kinases*); citocinas (IL-1, IL-4, IL-6); fatores de crescimento, fatores de transformação de crescimento (TGFs do inglês *transforming growth factor*), proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs do inglês *bone morphogenetic proteins*), proteína codificada pelo gene IHH; matriz metaloproteinases (MMPs); angiogênicos, antiangiogênicos e endostatina, (HENDERSON, 2002; WONG, 2003). Esta lista ainda está crescendo. Possivelmente, a função destes receptores é a de preservação e proteção da articulação quando em uso (ZIBA *et al*, 2012; FUI & KIM, 2012).

As forças que incidem sobre a articulação e conseqüentemente, sobre áreas específicas da cartilagem tem influência no processo degenerativo, que se caracteriza pela diminuição do número de células da cartilagem. A questão é entender porque estes componentes se separam. Existem pesquisas que se utilizam das forças intra-articulares para melhor compreensão do comportamento da cartilagem sobre pressão. A mecanobiologia da cartilagem é uma área em ampla evolução dentro deste campo de

pesquisa (DENNIS, 2004). No estudo da mecanobiologia da cartilagem, as forças internas articulares podem ser simuladas, através de mecanismos externos à articulação, de maneira a imprimir compressões e trações de forma intermitente sobre esta estrutura. Existem duas principais forças na cartilagem, uma tensão hidrostática e uma chamada força de tensão de cisalhamento octaédrico. Estas forças parecem ter um comportamento ótimo na cartilagem (Figura 2).

De uma perspectiva mecanobiológica, os resultados de numerosas simulações computacionais dão suporte à visão de que na maioria das condições de cargas fisiológicas na cartilagem de crescimento, a ossificação é inibida pela aplicação de tensão de compressão hidrostática local intermitente e essa inibição é inclusive, acelerada por força de tensão de cisalhamento octaédrico (CARTER, 1987; _____, 1988; _____, 2001). Por outro lado, o crescimento e ossificação são aceleradas por uma tensão de tração leve. Desta maneira, entende-se que a estrutura celular da cartilagem tende a ser mantida pela tensão de compressão hidrostática leve.

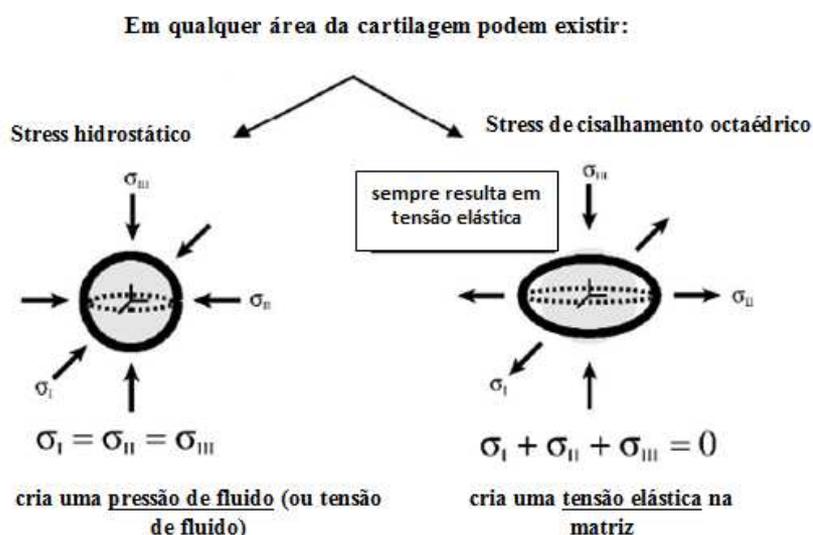


Figura 2. Em um modelo de material elástico linear, dois componentes escalares, a tensão hidrostática e a tensão de cisalhamento octaédrico, pode representar o estado de tensão total em qualquer local na cartilagem. Adaptado de Denis et al, 2004.

Estas forças intra-articulares levam a um processo patológico inicial da OA, que é degradativo e hipermetabólico. Nestes casos ocorre perda inicial de proteoglicanos e

subsequente aumento da síntese de proteoglicanos, caracterizado por quantidades relativamente aumentadas de sulfato de condroitina e insuficiência relativa de proteína de ligação. O colágeno é relativamente preservado nos estágios iniciais desta patologia. Além disso, na cartilagem articular, as mudanças nos condrócitos e na matriz cartilaginosa resultam na perda da estrutura normal, e em tentativas de reparação e remodelagem do osso subcondral. Devido a essas reações de reparação e remodelagem, bem como as diferentes forças intra-articulares, o aspecto degenerativo não é uniformemente progressivo e o índice de degeneração articular varia entre os indivíduos e as articulações.

4.2 COMPONENTES CELULARES DA CARTILAGEM

Todas as articulações sinoviais têm como principal função o movimento, e este apenas ocorrem perfeitamente, se existir uma superfície adequada para que as extremidades ósseas possam se relacionar. Os músculos têm um papel muito importante na produção destes movimentos, fornecendo estabilidade articular e consequente absorção de carga nestas áreas (VALDERRABANO *et al*, 2011). Estes movimentos ocorrem através do deslizamento e do rolamento das superfícies ósseas, por meio da cartilagem articular, que por sua vez é o principal componente funcional intra-articular. A cartilagem aparece no esqueleto apendicular por volta da 50^o semana fetal, com a condrificação do fêmur. Este evento biológico importante ocorre muito precocemente, por volta de sete semanas, principalmente devido às contrações musculares realizadas involuntariamente pelo feto, ainda no ventre da mãe (DENNIS, 2004). Desta forma, estas fortes contrações musculares associadas aos movimentos fetais, são fundamentais para o desenvolvimento das articulações, e também como um guia para o processo de ossificação pericondral e endocondral (DENNIS, 2004; VALDERRABANO *et al*, 2011). A ossificação endocondral contribui para o aumento do comprimento dos ossos longos, durante a formação embrionária, colaborando para o crescimento da criança, através das placas cartilaginosas epifisárias (POOLE, 2000; PETIT, 2011). As placas epifisárias são formadas principalmente pela cartilagem articular sinovial, e estas são divididas em zonas

de repouso, zona proliferativa e zona hipertrófica (PETIT, 2011) . Na zona de repouso, mais profunda, existem os condrócitos, células responsáveis pela síntese da matriz extracelular, presente também nas outras camadas mais superficiais da cartilagem, como na zona proliferativa, no qual se expressa grandemente o colágeno tipo II e os agregados de proteoglicanos. Na zona proliferativa, os condrócitos dividem-se ativamente e sintetizam diferentes tipos de moléculas de colágenos (tipo II, IX e XI), além dos proteoglicanos específicos da cartilagem articular. (MWALE *et al*, 2002; PETIT, 2011; DENNIS, 2004). Na zona hipertrófica observam-se importantes alterações e sínteses celulares, estimuladas por fatores de crescimentos (TNF- α), que culminam com a hipertrofia, crescimento e morte dos condrócitos, dando origem ao osso maduro. Os condrócitos são responsáveis pelo desenvolvimento e pela manutenção da estrutura da cartilagem articular, principalmente nas áreas mais próximas a sua camada superficial (HILDA *et al*, 2005).

Neste período precoce de formação da cartilagem, é possível identificar um tecido conectivo especializado com grande quantidade de matriz extracelular (MEC). Esta matriz é a rede que agrega todos os componentes celulares da cartilagem. Estes são compostos por uma densa rede de fibras colágenas, proteoglicanos, água, sais inorgânicos, além de glicoproteínas e lipídios (CINTRA *et al*, 2003). Na matriz extracelular, encontra-se principalmente o colágeno tipo II (60%), envolvido por uma gama complexa de proteoglicanos, macro moléculas de açúcar, que forma um tipo de gel firme, muito hidratado (MWALE F *et al*. 2002). Segundo Cintra (2003), o proteoglicano é formado por um núcleo proteico central e possui glicosaminoglicanos sulfatados (GAGS) ligados a esse núcleo. Pode-se dizer que os proteoglicanos nada mais são de que conjuntos de glicosaminoglicanos, que têm o papel de absorver água para o interior da cartilagem, com o intuito de manter sua espessura, otimizando seu papel de amortecedor de estresse mecânico. Os componentes glicosaminos têm em sua estrutura, receptores de glicose o que poderia ser útil para sua agregação na presença de lectinas. Em casos de colapso da cartilagem, o efeito glucoaglutinador das lectinas, poderia manter a integridade da matriz extracelular e a integridade da cartilagem (TOEGEL, 2009). Na proteína de ligação central do ácido hialurônico, encontram-se os sulfatos hidrofílicos dos

proteoglicanos, o sulfato de queratano e o sulfato de condroitina. Parece que o papel principal destes sulfatados, é a capacidade hidrofílica de absorver líquido, propriedade característica da cartilagem articular. Via de regra, o sulfato de condroitina parece ser o mais importante dos dois sulfatos presentes na cartilagem articular, porém, na realidade pouco se conhece na função destes sulfatos, quando submetidos aos efeitos do frio e do calor, presentes em muitos protocolos de tratamento da OA.

Além do emaranhado de fibras colágenas e da grande quantidade de proteoglicanos existentes na cartilagem, encontra-se também, como já dissemos, o ácido hialurônico. Este tem como função servir de arcabouço para apoio dos proteoglicanos, através de uma proteína de ligação central, tendo como principal papel na matriz, manter sua viscoelasticidade e fornecer proteção de carga na cartilagem (ERIC *et al*, 2009; ALEXANDRA *et al*, 2010). O ácido hialurônico é um glicosaminoglicano de alto peso molecular, composto de uma sequência molecular contínua e repetitiva de ácido glucorônico e N-acetil-glucosamina. A Glucosamina (N-acetil-glucosamina) é um produto do metabolismo da glicose e este produto de degradação é um dos constituintes dos galatos e dos glicosaminoglicanos (TOFFOLLETTO *et al*, 2005; PAVELKA *et al*, 2002; LEE & SPICER, 2000). Segundo Toffoletto (2005), os glicosaminoglicanos são polímeros lineares compostos por unidades dissacarídeas repetitivas onde uma das unidades é invariavelmente uma hexosamina (D-glucosamina ou D-galactosamina) e outra um ácido hexurônico (glucorônico ou idurônico) ou uma galactose em uma sequência não ramificada apresentando substituições de grupamentos sulfatos em várias posições da cadeia polissacarídica. (BROCKMEIER, 2006; HEMPFLING, 2007; YAGISHITA *et al*, 2005). Além de fornecer a lubrificação das superfícies ósseas e a absorção de choque nas articulações, o ácido hialurônico atua como a espinha dorsal dos proteoglicanos da matriz extracelular, criando uma via através da qual as células hidratadas podem migrar tanto para dentro quanto para fora da articulação (BROCKMEIER & SHAFFER, 2006; HEMPFLING, 2007). Estudos recentes também sugerem que o ácido hialurônico promove a proliferação e a diferenciação dos condrócitos, o que tem despertado interesse na sua utilização como base para o desenvolvimento de técnicas de engenharia de tecidos (ERIC *et al*, 2009).

Completando a estrutura molecular da cartilagem, existe o colágeno tipo II. Este na cartilagem parece ter um papel importante na fixação dos proteoglicanos e ácido hialurônico na matriz celular. Sintetizado pelos condrócitos, proporciona equilíbrio no arcabouço da cartilagem. Estudos demonstraram que o colágeno tipo II (CII) sobre a superfície articular, protege a cartilagem através de ligações colágeno-anti-anticorpos (NOYORI *et al*, 1998). Além disso, o CII tem sido largamente utilizado como importante marcador da cartilagem (BILLINGHURST *et al*, 1997; NELSON *et al*, 1998; MATYAS *et al*, 2004). É considerado também o principal componente fibrilar da cartilagem, composto de três cadeias, formando uma tríplice hélice que contém um resíduo de glicina em cada terceira posição, enquanto que as regiões N-terminal (peptídeo pro-colágeno N-terminal) e C-terminal (peptídeo pro-colágeno C-terminal) não exibem este tipo de sequência e não têm a forma tripla helicoidal. Uma característica notável do colágeno tipo II é o alto conteúdo de carboidratos, que está ligado à resíduos de hidroxilisina (FRANCIS *et al*, 1978).

4.3 ÁCIDO HIALURÔNICO E SULFATO DE CONDROITINA

A compreensão e a caracterização da importância dos mediadores bioquímicos e inflamatórios que atuam na progressão da degeneração articular podem proporcionar terapêuticas direcionadas para alvos específicos, como por exemplo, TNF- α , IL-1 e MMPs (FRANCISCO, 2007). Atualmente, a administração de precursores da matriz extracelular, como condrorepositores que auxiliam os condrócitos na reposição do tecido lesado, tem sido largamente utilizada. Dentre os condrorepositores mais utilizados estão o sulfato de condroitina, o sulfato de glicosamina e o ácido hialurônico (VERBRUGGEN 2006; KAMONWAN *et al*, 2009; ELENA, 2011). Em relação à terapia medicamentosa, o sulfato de condroitina, sulfato de glicosamina e o ácido hialurônico são os condrorepositores que têm o maior nível de evidência e os mais recomendados (ERIC, 2009; ALEXANDRA, 2010).

Dois estudos clínicos demonstraram manutenção do espaço articular no exames radiográficos, com melhoras dos sintomas da AO (REGINTER JY *et al*, 2001;

PAVELKA K, 2002), porém, estes resultados são questionados em relação à metodologia adotada pelos autores, pois foram baseados apenas na diminuição ou não do espaço articular através de raios X, e não ao nível molecular da cartilagem. Na literatura consultada, verifica-se que ainda não existe consenso em relação aos efeitos na cicatrização da cartilagem pelo uso dos sulfatos de condroitina, da glicosamina, nem tampouco do ácido hialurônico.

Um estudo utilizando modelos de cachorros portadores de doença articular degenerativa (artrose) demonstrou que apesar de não serem observadas significâncias estatísticas, o grupo tratado com hialuronato de sódio e sulfato de condroitina apresentou sinais de aumento da atividade dos condrócitos, o que sugeriu que estes compostos podem ser utilizados para se minimizar os efeitos da artrose (GONÇALVES, 2008). Outros dois estudos prospectivos, randomizados e duplo cego, observaram a eficácia do ácido hialurônico de alto e baixo peso molecular, em pacientes com diagnóstico de OA no joelho. O ácido hialurônico foi injetado no joelho destes pacientes, uma vez/semana em um período de cinco semanas de tratamento. O acompanhamento após a dose intra-articular foi realizado por doze semanas. Os autores verificaram melhoras nos sintomas da OA em ambos os tratamentos, e creditaram este resultado, principalmente à propriedade visco elástica do ácido hialurônico (ARENSI, 2006, KAMONWAN *et al*, 2009). Entretanto, hialuronato de sódio de alto peso molecular foi injetado nos joelhos de dez pacientes, os quais foram avaliados através de raio X, exames clínicos, laboratoriais (ELISA) e análise do líquido sinovial (SUPARTZ, 2007). Os autores deste estudo, sugerem que as injeções de hialuronato de sódio, acelerou o colapso da cartilagem na AO dos pacientes. Uma das explicações dos autores foi a hipótese de que apesar de ser injetado hialuronato de sódio de alto peso molecular, apenas pequenos fragmentos se deslocam a partir do seu receptor no condrócito (CD-44), causando condrólise pela falta de estabilidade da matriz extra celular (ALEXANDRA *et al*, 2010).

Outros autores referem que fragmentos de ácido hialurônico de alto ou baixo peso molecular, estimulam a maturação dendrítica celular, com conseqüente produção de citocinas pró inflamatórias e ativação de células T do sistema imunitário. Estes

mecanismos aumentam a produção de metaloproteinases da matriz e colapso da cartilagem (TERMEER, 2000; FERNANDES, 2002).

Existem, algumas divergências em relação à posologia e diferentes formulações na utilização do sulfato de glicosamina. Em um estudo, vinte artigos foram selecionados mostrando os benefícios da glicosamina sobre a dor e a função dos joelhos. Porém, parece que estes resultados tiveram conflitos de interesse com o laboratório que patrocinou os trabalhos (FRANCISCO, 2007).

Após processos degenerativos, a aglutinação celular com precipitação de polissacarídeos ou glicoconjugados, que ocorrem na reposição da cartilagem articular, parece envolver processos celulares, que são semelhantes com o papel das lectinas de plantas, que reconhecem carboidratos livres ou ligados a superfícies celulares através de sítios de ligação nos quais a hidrofobicidade é a principal força de interação (KENNEDY *et al.*, 1995). Esses mecanismos ainda não foram totalmente esclarecidos. Verifica-se, no entanto, que existem receptores celulares presentes na cartilagem que são responsáveis pela sua manutenção. A parte glicídica de glicoproteínas tem um papel fundamental no enovelamento de proteínas, oligomerização, classificação e transporte (HELENIUS & AEBI, 2001). Há crescentes evidências de que as lectinas intracelulares animais desempenham papéis importantes no controle de qualidade e na classificação de glicoproteínas ao longo da via de excreção. Algumas sequências de aminoácidos dessas lectinas são semelhantes aos de lectinas de plantas. Por exemplo, uma lectina da família da aglutinina de gérmen de trigo, pode ser potencialmente importante nas vias de sinalização celular, simulando uma lectina de um mamífero (MASNIKOSA *et al.*, 2006). A aglutinina do gérmen de trigo também estimulou os receptores de insulina em casos de ausência desta (WILDEN *et al.*, 1989). O sulfato de condroitina parece ser uma dessas glicoproteínas, que têm funções similares às das lectinas, principalmente quando se analisa sua função na cartilagem. Ao lado da água, das fibras colágenas, e outros componentes, tais como proteínas de adesão e lipídios, a matriz extracelular da cartilagem consiste de numerosas glicoproteínas e proteoglicanos que funcionam na manutenção da saúde da cartilagem. Além disso, a espinha dorsal da proteína de grandes proteoglicanos da cartilagem é frequentemente associada com carboidratos, tais como

sulfato de condroitina, sulfato de heparano e o sulfato de queratano. Todos estes componentes são secretados por condrócitos para a matriz extracelular ou permanecem associados com a membrana plasmática para formar um revestimento pericelular de manutenção.

Outro componente importante na arquitetura funcional da cartilagem é o sulfato de condroitina, um glicosaminoglicano composto por repetição do dissacarídeo ácido β -glucurônico e ácido N-acetyli- β -D-sulfato de galactosamina (POSPÍCHAL *et al*, 2007). Tem sido relatado como um biomarcador em potencial para algumas doenças, tais como câncer nos ossos e no ovário (POTHACHAROEN *et al*, 2006); devido à secreção de SC em nível elevado em fluidos corporais de pacientes. Além disso, o sulfato de condroitina tem sido utilizado para o tratamento de doenças inflamatórias e degenerativas, como artrose, artrite e lumbago. Atualmente, tem aumentado muito a indicação do sulfato de condroitina com a finalidade de melhorar e restaurar a condição da degeneração da cartilagem nos pacientes com OA (MORREALE & MONOPULO, 1996; OHSHIKA *et al*, 2011). O sulfato de condroitina, tem como função, a absorção de água da matriz, com a finalidade de aumentar seu tamanho longitudinal, aumentando a espessura da cartilagem, e portanto, auxiliando ativamente na mecânica da proteção cartilaginosa. Por este motivo, o sulfato de condroitina é frequentemente utilizado nos tratamentos que envolvam degeneração da cartilagem. Parece que seu mecanismo, consiste em formar um revestimento pericelular que permite a manutenção célula-substrato de adesão, reduzindo o atrito na cartilagem, sendo essencial para manter a pressão hidrostática e resistência para suportar cargas através de força de tensão de cisalhamento octaédrico (CARTER *et al*, 1987; _____, 1988; _____ 2001).

4.4 LECTINAS

O termo “lectina” (do latim *legere*, pegar, escolher) foi primeiro empregado por BOYD E SHAPLEIGH, em 1954, para descrever aglutininas grupo sanguíneo-específicas encontradas em sementes e outras partes de determinadas plantas (ANDRADE, 2003). As lectinas são proteínas capazes de reconhecer sítios específicos e ligar-se de forma reversível a carboidratos sem alterar a estrutura covalente das ligações glicosídicas dos sítios (PEREIRA, 2012). Largamente distribuídas na natureza, as lectinas originam-se de plantas e bactérias que aglutinam células e precipitam polissacarídeos ou glicoconjugados (LIENER *et al.*, 1986). Cada molécula de lectina contém dois ou mais sítios de ligação para carboidratos di ou polivalentes. As lectinas podem interagir com os açúcares da superfície das células, podendo originar uma ligação cruzada levando à uma precipitação de polissacarídeos, glicoproteínas, peptidoglicanos, ácido teicóico, glicofosfolípidios, etc. Este fenômeno é denominado aglutinação celular (CORREIA & COELHO, 1995; MO *et al.*, 2000). A capacidade de aglutinar diferencia as lectinas de outras macromoléculas ligantes de açúcares, como por exemplo, as glicosidases e glicotransferases (GOLDSTEIN, *et al.*, 1986). As lectinas são consideradas moléculas que reconhecem e decifram as informações contidas nos oligossacarídeos da superfície celular (PEREIRA, 2012). As especificidades das lectinas são definidas pelo monossacarídeo ou oligossacarídeo que inibe as reações de precipitação ou aglutinação induzidas por lectinas (KOMPELLA & LEE, 2001). Essa interação entre a lectina e o carboidrato aumenta tanto a afinidade quanto a especificidade das lectinas, através de subsítios e subunidades de suas membranas (PEREIRA, 2012).

Existem plantas que possuem duas ou mais lectinas que diferem na sua especificidade, estas são denominadas lectinas de isolectinas (SHARON & LIS, 1990).

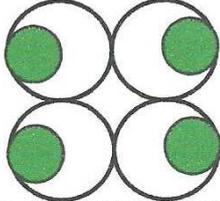
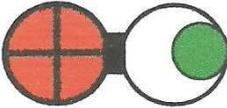
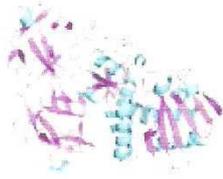
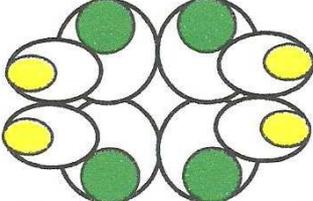
Isolectinas são definidas como um grupo de proteínas intimamente relacionada, resultantes da expressão de diferentes genes, porém, com estrutura semelhante em uma mesma espécie. O termo isoforma foi proposto para lectinas pertencentes a mesma espécie, cuja heterogeneidade de origem genética não foi bem definida (PAIVA & COELHO, 1992). Desta forma, várias centenas de lectinas demonstraram, através de

análises detalhadas, que elas são um grupo grande e heterogêneo de proteínas que diferem fortemente quanto à especificidade aos carboidratos, estrutura molecular e atividade biológica (VAN DAMME *et al.*, 1996; ANDRADE, 2003).

O comportamento das lectinas nos vários sistemas biológicos tem sido largamente elucidado através das suas análises físico químicas (PERERA 2012). As proteínas oligoméricas, tem como principal fator de integridade estrutural, as suas relações entre as cadeias que a compõem. O estudo dos possíveis desdobramentos de proteínas diméricas e tetraméricas, é muito utilizado para se compreender, como ocorrem a estabilidade e a integridade estrutural destes compostos oligoméricos. Sendo assim, por conta da similaridade nas suas estruturas primárias, secundárias e terciárias as lectinas de leguminosas são as mais utilizadas nos estudos que envolvem estas ligações estruturais. (SRINIVAS *et al.*, 2001; PERERA 2012).

Portanto, as lectinas de leguminosas podem ser divididas de acordo com a quantidade de seus sítios de ligação. Estas são as MEROLECTINAS (com apenas um domínio de ligação a carboidratos); as HOLOLECTINAS (lectinas com no mínimo dois ou mais domínios homólogos de ligação a carboidratos); as QUIMEROLECTINAS (proteínas com um ou mais domínios de ligação a carboidratos e um domínio não relacionado que possui uma atividade biológica distinta e independente); e finalmente as SUPERLECTINAS (lectinas que possuem dois domínios de ligação a carboidratos estrutural e funcionalmente diferentes, tabela 1, (VAN DAMME, 1998; PERERA 2012).

Tabela 1. Classificação das lectinas quanto aos aspectos estruturais. Adaptado de PEREIRA, 2012.

Representação Esquemática	Exemplo
<p>Merolectina Proteína monomérica com um único sítio ativo.</p> 	 <p>Lectina de <i>Hevea brasiliensis</i> ANDERSEN <i>et al.</i>, 1993</p>
<p>Hololectina Proteína tetramérica com quatro sítios ativos homólogos.</p> 	 <p>Lectina de <i>Arachis Hypogaea</i> RAVISHANKAR <i>et al.</i>, 2001</p>
<p>Quimerolectina Proteína com um sítio de ligação a carboidrato e um outro domínio que possui uma função não lectínica.</p> 	 <p>Lectina de <i>Ricinus communis</i> RUTEMBER <i>et al.</i>, 1991</p>
<p>Superlectina Proteína com dois domínios diferentes com afinidade por carboidratos distintos.</p> 	 <p>Lectina de <i>Musa acuminata</i> MEAGHER <i>et al.</i>, 2005</p>

4.5 LECTINA DE SEMENTES DE CRATYLIA MOLLIS (CRAMOLL)

A lectina da semente de *Cratylia Mollis* tem sido vastamente estudada no Nordeste do Brasil. Esta região é a origem do feijão Camaratu, cuja planta leguminosa é purificada a *Cratylia mollis* (figura 3). O feijão Camaratu pertence à família das *Phaseoleae*, subfamília *Dioclineae*, a qual abrange o gênero *Canavalia*, botanicamente relacionado a *Cratylia mollis* (CORREIA E COELHO, 1995). Esta lectina, denominada Cramoll 1,4 é fortemente inibida por metil α -D-manosídeo e conforme, portanto com a classe de lectinas ligantes de glicose/manose, similar às isoladas da *Canavalia ensiformis* (*Concanavalina A*, Con A) e *Lens culinaris* (lectina de lentilha) (LIMA *et al*, 1997). Cramoll 1,4 possui forte ligação para tecidos humanos com câncer, particularmente para aqueles de glândulas mamárias, útero e cérebro (BELTRÃO *et al*, 1998).



Figura 3 – *Cratylia mollis*. Sementes (à esquerda) e arbusto (à direita).

Estudos por Cristalografia e Raios-X revelaram duas diferentes formas de cristal da Cramoll 1,4 (TAVARES *et al*, 1996). O modelo do monômero de Cramoll 1, constituído a partir de estudos cristalográficos da Cramoll estão representados na Figura 4.



Figura 4 – Modelo de monômero de Cramoll 1(azul) e Com A (amarelo)

Fonte: <http://webenligne.cermav.cnrs.fr/lectines>.

A mistura de Cramoll 1, cuja concentração é maior nas sementes, e sua isoforma, Cramoll 4, podem ser separadas por cromatografia de troca iônica (CORREIA & COELHO, 1995). Posteriormente, as isoformas Cramoll 2 e Cramoll 3 foram isoladas por PAIVA & COELHO (1992).

Várias atividades biológicas têm sido atribuídas às diferentes isoformas isoladas de *Cratylia mollis*, das quais podemos citar: atividade mitogênica de linfócitos (MACIEL *et al*, 2004), adjuvante na terapia do câncer (ANDRADE *et al*, 2003; BELTRÃO *et al*, 1998), atividade imunoestimuladora (MELO *et al*, 2010a; MELO *et al*, 2010b), atividade anti-inflamatória e anti-helmíntica (MELO *et al*, 2011c; FERNANDES, 2010) e na reparação de feridas em ratos saudáveis e imunodeprimidos (MELO *et al*, 2011b).

4.6. BIOFÍSICA E FISILOGIA DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO

O Ultrassom terapêutico (UST) tem sido utilizado há mais de 60 anos na gestão da dor, e no tratamento de lesões músculo-esqueléticas. É definido como uma onda sonora que tem frequência maior do que 20 kHz (acústico = 20-20,000 Hz). Existem duas formas de Ultrassom: o terapêutico e o ultrassom com finalidades diagnósticas. O ultrassom diagnóstico é usado para imagens médicas, e envolve a emissão de impulsos de onda inferior a 1 w/cm². Em contrapartida, o ultrassom terapêutico é utilizado no tratamento de diversas doenças, com ondas de 1 ou 3 MHz, transmitidos como formas de onda contínuas ou pulsadas, dependendo do efeito fisiológico desejado (ZHANG SHU, 2012).

Apesar de todos estes anos, a evidência de seus efeitos biofísicos favoráveis só começaram a ser publicados na década de 90. Os resultados de vários estudos clínicos, identificaram os efeitos benéficos do UST (FERNANDA GJ, 2011; FRÉZ AR, 2006), porém, ainda não existe consenso entre os pesquisadores, pois a maioria dos estudos publicados, foram ensaios *in vitro*, (ANGLES JM, 1990; ZHANG SHU, 2012). Atualmente, os estudos que utilizam modelos animais, têm sido largamente utilizados, pelo fato da influência de sua evidência terapêutica benéfica. Adicionalmente, os estudos *in vitro* não evidenciam modulações fisiológicas importantes, decorrentes de ajustes estimulados pelo UST, (VICTOR EG, *et al*, 2012; SHU BIN *et al*, 2012). Desta maneira, a utilização de coelhos para a análise da cicatrização da cartilagem, pode ser uma opção eficiente neste contexto.

Os efeitos primários e mais importantes dos UST são devido a mecanismos não-térmicos, mediados por um processo chamado de cavitação. Cavitação essencialmente descreve a interação biofísica de inclusões gasosas (bolhas), dentro dos tecidos quando expostos a uma forma de onda incidente (por exemplo, ultrassons). As bolhas que ocorrem na aplicação do ultrassom, provocam pressões ora positiva ora negativa na região intra celular. Esse comportamento oscilatório induz a duas formas de cavitação: estável (não-inercial), que é descrita como uma oscilação fásica da bolha no interior do campo de ultra-som, que tem influência benéfica em locais de tecidos moles. Além desta,

existe a cavitação instável (inércia), que é descrita como um rápido colapso da bolha, que produz temperaturas muito altas e/ou "radicais livres" locais, com pressões que resultam na produção de substâncias tóxicas e eventual dano tecidual. (WU J , 2008; ZHANG Z, *et al* 2012).

Bioefeitos térmicos do ultrassom

A elevação de temperatura local causada pelo UST varia de acordo com as propriedades dos tecidos que são tratados. Seus efeitos térmicos dependem do coeficiente de absorção do tecido, a densidade, a perfusão, duração de pulso além da frequência de repetição do pulso. Uma propriedade fundamental do UST, é que ele tem a capacidade de aquecer os tecidos de forma focal, ou seja, ocorre o aquecimento apenas no local tratado, evitando assim, dissipação sistêmica do calor, ativando de forma inadequada os mecanismos fisiológicos de termorregulação. Os fatores que afetam o aumento da temperatura dos tecidos incluem o campo de aplicação, as características dos tecidos envolvidos, condutividade térmica de tecido e a irrigação sanguínea do local a ser tratado (TONOMURA *et al*, 2008). Os tecidos que são pobres em vascularização (p.ex. tendão e gordura), e em tecidos que conduzem o calor (osso), tem maior aumento da temperatura quando submetidos ao UST, (KUMAGAI, K, 2012). Os tecidos adjacentes aos ossos são particularmente susceptíveis ao aumento do calor por condução. O poder de absorção de calor pelos tecidos está diretamente relacionado com o teor de proteínas presente nos tecidos. O colágeno, por sua vez, tem elevada capacidade de absorção do calor, sendo portanto, um dos componentes mais estimulados com a aplicação do UST, (WU, J, 2008). O terapeuta pode utilizar o UST em formas diferentes de ondas (pulsátil ou contínua), sendo que as formas pulsáteis tendem a produzirem menos calor e portanto serem de aplicação mais seguras.

4.7. BIOFÍSICA E FISIOLOGIA DA CRIOTERAPIA

A crioterapia tem sido utilizada desde tempos antigos, devido seus efeitos benéficos sobre as lesões (KNIGHT K, *et al*, 1995, FANG L, *et al*, 2012). Os efeitos mais relevantes da crioterapia sobre os tecidos são principalmente, a diminuição da hipóxia secundária, a redução do metabolismo do tecido, reduzindo conseqüentemente, o edema e diminuindo a inflamação, restringindo portanto, a liberação dos mediadores pró inflamatórios (BANFI G *et al*, 2010). Além disso, a crioterapia também diminui a condução nervosa, sendo frequentemente indicada para tratamentos contra afecções dolorosas (COSTELLO JT *et al*, 2012). Do ponto de vista biofísico, a crioterapia parece desempenhar um papel importante na inibição das sínteses protéicas, bem como no impedimento do funcionamento normal da transmissão de sódio e potássio celular. Estas alterações podem ser maiores ou menores, de acordo com a camada de gordura no local da aplicação da crioterapia (JUTTE LS *et al*, 2012). Estes efeitos podem levar também, à diminuição do número de pontes cruzadas muscular. Porém, estudos demonstram que, apesar disso, a cinestesia, ou seja, a capacidade de discernir a posição dos membros no espaço permanecem inalterados (DOVER G, 2004). O mesmo ocorre com a propriocepção articular (UCHIO Y *et al* 2003). Desta forma, a crioterapia pode ser utilizada como ferramenta importante na diminuição da dor, sem impedir o controle motor (OSBAHR DC, 2002).

Em relação à fisiologia da cartilagem, a diminuição da temperatura em até 10° abaixo da temperatura corporal, leva a alterações sobre os parâmetros de transporte de solutos na cartilagem. MOEINI M *et al* (2012), avaliaram os efeitos da temperatura na cartilagem, observando as alterações nas mioglobinas, dextranos, insulina e no sulfato de condroitina. Estes autores identificaram que todos os componentes citados, tiveram tendências para aumentar o coeficiente de partição com o aumento da temperatura, exceto o sulfato de condroitina, com alterações significativas entre 22 e 37 ° C para o dextrano, insulina, e mioglobina. Estranhamente, a difusividade para a insulina diminuiu significativamente à medida que a temperatura aumentou de 22 para 37 ° C, enquanto que a difusividade do sulfato de condroitina não exibiu nenhuma dependência da temperatura.

Isso demonstra que a diminuição da temperatura intra-articular parece não provocar nenhuma alteração em relação à área do sulfato de condroitina e do colágeno articular.

4.8. EVIDÊNCIAS QUE FUNDAMENTAM A PRÁTICA CLÍNICA COM CRIOTERAPIA E ULTRASSOM TERAPÊUTICO

Atualmente, o UST tem sido muito utilizado com o objetivo de cicatrização óssea. Em um estudo utilizando ratos marcados geneticamente com uma proteína verde fosforescente, realizou-se uma fratura transversa femoral em um dos membros traseiros. O local da fratura foi exposto a Ultrassom de baixa intensidade pulsátil (low-intensity pulsed ultrasound - LIPUS), diariamente no grupo de tratamento. Os animais sem tratamento LIPUS serviu como grupo de controle. A avaliação radiológica mostrou que a área do calo ósseo (osso maduro), foi significativamente maior no grupo LIPUS do que no grupo de controle em 2 e 4 semanas pós-fratura. A análise histomorfométrica no local da fratura mostrou um aumento significativo de células ósseas marcadas (green fluorescent protein-GFP) no grupo LIPUS após 2 semanas de tratamento, em comparação com o grupo de controle. O grupo LIPUS exibiu uma percentagem significativamente mais elevada de células GFP expressando fosfatase alcalina (GFP / AP) do que o grupo de controle em 2 semanas pós-fratura. Não houve diferença significativa na percentagem de GFP / AP células entre o grupo LIPUS (2,0%) e o grupo de controle (1,4%), 4 semanas pós-fratura. Células de estroma derivadas do fator-1 e CXCR4 foram identificados imuno-histoquimicamente no local da fratura no grupo LIPUS. Estes dados indicam que o LIPUS induziu a ossificação através de células progenitoras circulantes osteogênicas para o local da fratura (KUMAGAI, K *et al* 2012).

Tem sido demonstrado que a aplicação de frio possui importantes efeitos fisiológicos em indicações músculo-esqueléticas (CAMERON 1999, KNIGHT, 1995). Atividade metabólica e vasoconstritora, como um resultado da aplicação de frio, produz uma diminuição fluxo sanguíneo local, ajuda a controlar a inflamação (LUCKMANN 1987) e diminui a dor do paciente (KNIGHT, 1995). A diminuição da dor pode causar um aumento na amplitude de movimento e função. No entanto, a aplicação do frio deve

ser cuidadosamente supervisionada. No início da aplicação de frio, ocorre vasoconstrição periférica. Porém, depois de aplicação prolongada (durante 20 minutos) pode aparecer uma reação estranha à vasoconstrição alternando vasoconstrição e vasodilatação ("reação de caça"), quando se espera vasodilatação apenas como parte do mecanismo homeostático para regulação da temperatura (KNIGHT, 1995, BROSSEAU L *et al*, 2012). Nesta reação, a dor pode voltar na articulação tratada quando a temperatura volta a aumentar após a aplicação do gelo (LUCKMANN 1987).

5. REFERÊNCIAS DA LITERATURA

ALEXANDRA, M. Intra-articular hyaluronic acid increases cartilage breakdown biomarker in patients with knee osteoarthritis. *Clin Rheumatol*, vol. 29, 619–624, 2010.

American College of Rheumatology Subcommittee on Osteoarthritis Guidelines: Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee. *Arthritis Rheum*, vol. 43, pp.1905-1915, 2000.

ANDRADE, C.A.S.; MAGALHÃES, N.S.S. *Atividade antitumoral de lectina de cratyliia mollis encapsulada em lipossomas*. 2003.62 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências Biológicas, UFPE, Recife. 2003.

ANGLES JM, WALSH DA, LI K, BARNETT SB, EDWARDS MJ. Effects of pulsed ultrasound and temperature on the development of rat embryos in culture. *Teratology*, 1990, 42: 285-293.

ARENSI, F. Comparison of efficacy and therapeutic safety of two treatments based on hyaluronic acid (Go-On and Hyalgan) in knee osteoarthritis. *Minerva Ortop Traumatol*, 57: 105- 11, 2006.

AUBRY, JF. High-intensity therapeutic ultrasound: metrological requirements versus clinical usage. *Metrologia*, 2012, Vol.49(5), pp.S259-S266.

BANFI, G; LOMBARDI, G; COLOMBINI, A; MELEGATI, G. Whole-body cryotherapy in athletes. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 40(6):509-17, 2010.

BELTRÃO, E.I.C., CORREIA, M.T.S., FIGUEREDO-SILVA, J., COELHO, L.C.B.B. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratyliia mollis* lectin to human mammary tissues. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 74, 125–134, 1998.

BLEAKLEY C; MCDONOUGH S; MACAULEY D. The use of ice in the treatment of acute soft-tissue injury: a systematic review of randomized controlled trials. *Am J Sports Med* 2004, 32:251-261.

BOYD, W. C. AND SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, 119 (3091), 419, 1954.

BILLINGHURST, R.C.; DAHLBERG, L; IONESCU, M. Reiner A, Bourne R, Rorabeck C, et al. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest.* 99:1534–45. 1997.

BROCKMEIER, S.F.; SHAFFER, B.S. Viscosupplementation therapy for osteoarthritis. *Sports Med Arthrosc.* 14(3):155-162. 2006.

BROSSEAU L, YONGE KA, ROBINSON V, MARCHAND S, JUDD M, WELLS G, TUGWELL P. Termoterapia para el tratamiento de la osteoartritis (Cochrane Review). In: The Cochrane Library, Issue 1, 2006.

BUCKWALTER, J; MARTIN, J. Doença articular degenerativa. *Clinical Symposia. Novartis.* 47(2): 9, 1999.

BULLOUGH, P.G. The pathology of osteoarthritis. In: Moskowitz R, Howell D, Goldberg V, Mankin H, editors. *Osteoarthritis: diagnosis and medical/surgical management.* Philadelphia: WB Saunders; 1992, p. 36–69.

CÁRDENAS SANDOVAL, ROSY PAOLA ; GARZÓN-ALVARADO, DIEGO ALEXANDER ; RAMÍREZ MARTÍNEZ, ANGÉLICA MARIA. A mathematical model of the process of ligament repair: effect of cold therapy and mechanical stress. *Journal of theoretical biology*, 2012, Vol.302, pp.53-61.

CARTER, D.R; BEAUPRE, G.S: Skeletal Function and Form: Mechanobiology of Skeletal Development, Aging, and Regeneration. Ed 1. Cambridge, England: *Cambridge University Press*, 2001.

CARTER, D.R; ORR, T.E; FYHRIE, D.P. Influences of mechanical stress son prenatal and postnatal skeletal development. *Clin Orthop*, 219:237–250, 1987.

CARTER, D.R; WONG, M. The role of mechanical loading histories in the development of diarthrodial joints. *J Orthop Res*, 6:804–816, 1988.

CINTRA, P.F.A. Influência da Lesão Condral na concentração de Glicosaminoglicanas sulfatadas no Líquid Sinovial. (Dissertação de Mestrado), UFSCAR, 2003.

CORREIA, M.T.S., COELHO, L.C.B.B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 55, 261–273, 1995.

COSTELLO, J.T; ALGAR, L.A; DONNELLY, A.E. Effects of whole-body cryotherapy (-110 °C) on proprioception and indices of muscle damage. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 22(2): 190-8, 2012.

DANIELLA, P.N; KYOSEN, Y.K.N; ERIKA, A.S; MARIA, M.B; MARTA, R.S. Capacidade funcional, condições sócio econômicas e de saúde de idosos atendidos por equipes de Saúde da Família de Goiânia. *Ciência & Saúde Coletiva*. 15:(6), 2887(12), 2010.

DE LISE, A.M; FISCHER, L; TUAN, R.S. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage*, 8, 309–334, 2000.

DENNIS, R.C; GARY, S.B; MARCY W. et al. The Mechanobiology of Articular Cartilage Development and Degeneration. *Clinical orthopaedics and related research*, 427, 69–77, 2004.

DOVER, G; POWERS, M.E. Cryotherapy does not impair shoulder joint position sense. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, .85(8):1241-1246, 2004.

ELENA, V.T. Developmental Mechanisms in Articular Cartilage Degradation in Osteoarthritis. *Arthritis*, 1-16, 2011.

ERIC, J.S. et al. Hyaluronic Acid Viscosupplementation and Osteoarthritis : Current Uses and Future Directions. *Am J Sports Med*, 37: 1636, 2009.

ERIC, J.S; JENNIFER, A.H; MARK, D.M.; ROY, D.A.; and JEFFREY, E.R. Hyaluronic Acid Viscosupplementation and Osteoarthritis : Current Uses and Future Directions. *Am J Sports Med*, 37: 1636. 2009

FANG, L; HUNG, C.H; WU, S.L; FANG, S.H; STOCKER, J. The effects of cryotherapy in relieving postarthroscopy pain. *Journal of Clinical Nursing*, 21:636-643, 2012.

FERNANDES J.C; MARTEL-PELLETIER J.; PELLETIER J.P. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 39 (1–2):237–246, 2002.

FERNANDES, M.P.; INADA, N.M.; CHIARATTI, M.R.; ARAÚJO, F.F.B.; MEIRELLES, F.V.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; ALVES, M.J.M.; GADELHA, F.R.; VERCESI, A.E. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by *Cratylia mollis* seed lectin. *J. Bioenerg. Biomembr.* 42, 69–78, 2010.

FRANCIS G; BUTLER, W.T; FINCH, J.E. The Covalent Structure of Cartilage Collagen. Amino acid sequence of residues 552-661 of bovine $\alpha 1(\text{ii})$ chains. *Biochem. J.* 175: 921-930 921. 1978.

FUI, G.G; KIM, S.M; Intrinsic danger: activation of Toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, Vol. 51(1), 7-23. 2012.

GLENN, J. R. E.; SPINDLER, K. P.; WARREN, T. A.; MCCARTY, E. C.; SECIC, M. Cryotherapy Decreases Intraarticular Temperature after ACL Reconstruction. *Clin Orthop Relat Res.*, Nashville, USA, v. 421, p. 268-272, Apr. 2004.

GOBEZIE, R; KHO, A; KRASTINS, B; SARRACINO, D.A; THORNHILL, T.S; CHASE, M; MILLETT, P.J. High abundance synovial fluid proteome: distinct profiles in health and osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 9(2): 1-3. 2007.

GOLDSTEIN (Eds.), The lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine. Academic Press, Orlando, FL, pp. xi-vv, 1986.

GONÇALVES, G; MELO E.G; GOMES, M.G; NUNES, V.A; REZENDE, C.M.F; Effects of chondroitin sulfate and sodium hyaluronate on chondrocytes and extracellular matrix of articular cartilage in dogs with degenerative joint disease. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 60(1) 93-102, 2008.

HEESCH, K.C; MILLER, Y.D; BROWN, W.J. Relationship between physical activity and stiff or painful joints in mid-aged women and older women: a 3-year prospective study. *Arthritis Research & Therapy*, 9: 1-2. 2007.

HELENIUS, A; AEBI, M.: Intracellular functions of N-Linked Glycans. *Science*. 291, 2364–2369. 2001.

HEMPFLING, H. Intra-articular hyaluronic acid after knee arthroscopy: a two-year study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.*15(5): 537-546. 2007.

HENDERSON, J.H; CARTER, D.R: Mechanical induction in limb morphogenesis: The role of growth-generated strains and pressures. *Bone.* 31:645–653, 2002.

HILDA Et al. Structure and secretory activity of cultured chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Biocell*, 29(2):163-167. 2005.

KAMONWAN, B.; WARAT, T.; SARINEE, K.; THAWEE, S. and RUNGPETCH, S. Comparative efficacy of low- and high molecular weight intra-articular hyaluronic acids in patients with knee osteoarthritis. *J Health Res* 23(2): 87-92, 2009.

KENNEDY, J.F; PALVA, P.M.G; CAVALCANTI, M.S.M; COLEHO, L.C.B.B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrates Polymers*, v. 26, 219-230, 1995.

KERKHOF, H. J. *et al.* Recommendations for standardization and phenotype definitions in genetic studies of osteoarthritis: the TREAT-OA consortium. *Osteoarthritis Cartilage* 19, 254–264. 2011.

KNIGHT K: Cryotherapy in Sport Injury Management. Champaign, IL, Human Kinetics 1995.

KRADTAP, S; HARTWEL; SRIPAORAYA, W. and GRUDPAN, K. Assay of Chondroitin Sulfate Using Time Based Detection in a Simple Lab on Chip. *Journal of Analytical Chemistry*, Vol. 66, No. 2, 135–138. 2011.

KRADTAP, H.S.; PATHANON, K.; FONGMOON, D.; KONGTAWELERT, P. and GRUDPAN, K. *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 388, no. 8, 1839. 2007.

KOMPELLA, U.B. AND LEE, V.H. L. Delivery systems for penetration enhancement of peptide and protein drugs: design considerations. *Adv. Drug Deliv. Rev.*46, 211–245, 2001.

KUMAGAI, K; TAKEUCHI, R; ISHIKAWA, H; YAMAGUCHI, Y; FUJISAWA, T; KUNIYA, T; TAKAGAWA, S; MUSCHLER, GF ; SAITO, T. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates fracture healing by stimulation of recruitment of both local and circulating osteogenic progenitors. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 2012, Vol.30(9), pp.1516-21.

LAJEUNESSE, D.; DELALANDRE, A.; MARTEL-PELLETIER, J.; PELLETIER, J.P. Hyaluronic acid reverses the abnormal synthetic activity of human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. *Bone*. (33):703-10. 2003.

LEONARDO, R.S.; LARYCE, G.; THIAGO, M.S.; FLAVIO, R.L.M. Nexo tecnico epidemiologico previdenciario: perfil dos beneficios previdenciaros e acidentarios concedidos pelo INSS na regio do Vale do Itajai (SC) antes e depois da norma. *Revista Brasileira de Medicina do Trabalho*, Sept, p.69(9). 2011.

LIENER, I.E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I.J. PREFACE IN: I.E. LIENER, N. SHARON AND I.J. GOLDSTEIN (Eds.), *The lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine*. Academic Press, Orlando, FL, pp. xi-vv, 1986.

LORIS R, HAMELRYCK T, BOUCKAERT J, WYNS L. Legume lectin structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1383, 9-36. 1998.

LIMA, V.L.M.; CORREIA, M.T.S.; CECHINEL, Y.M.N.; SAMPAIO, C.A.M.; OWENAND, J.S.; COELHO, L.C.B.B. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential

matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin–cholesterol acyltransferase. *Carb. Polym.* 33, 27–32. 1997.

MACIEL, E.V.M.; ARAÚJO-FILHO, V.S.; NAKAZAWA, M.; GOMES, Y.M.; COELHO, L.C.B.B.; CORREIA, M.T.S. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals* 32, 57–60. 2004.

MASNIKOSA, R.; BARICEVIC, I.; JONES, D.R.; NEDIC, O. Characterisation of insulin-like growth factor receptors and insulin receptors in the human placenta using lectin affinity methods. *Growth Horm IGF Res.* 16, 174–184. 2006.

MATYAS, J.R.; ATLEY, L.; IONESCU, M.; EYRE, D.R.; POOLE, A.R. Analysis of Cartilage Biomarkers in the Early Phases of Canine Experimental Osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 50(2):543–552. 2004.

MILAIRE, J. Lectin binding sites in developing mouse limb buds. *Anat Embryol* 184, 479–488. 1991.

MELO, C.M.L.; CASTRO, M.C.A.B.; OLIVEIRA, A.P.; GOMES, F.O.S.; PEREIRA, V.R.A.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G. Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes. *Phytother. Res.* 24, 000–10. 2010a.

MELO, C.M.L.; PAIM, B.A.; ZECCHIN, K.G.; MORARI, J.; CHIARRATI, M.R.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G. Cramoll 1,4 lectin increases ROS production, calcium levels and cytokine expression in treated spleen cells of rats. *Mol. Cell. Biochem.* 339. 2010b.

MELO, C.M.L.; MELO, H.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; SILVA, M.B.; PEREIRA, V.R.A. Mitogenic response and cytokine production induced by cramoll 1,4 lectin in splenocytes of inoculated mice. *Scand. J. Immunol.*, 73, 112–121. 2010c.

MELO, C.M.L.; PORTO, C.S.; MELO-JÚNIOR, M.R.; MENDES C.M.; CAVALCANTI, C.C.B.; COELHO, L.C.B.B.; PORTO, A.L.F.; CARNEIRO-LEÃO, A.M.A.; CORREIA, M.T.S. Healing activity induced by Cramoll1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. *International Journal of Pharmaceutics (Print)*, v. 408, 113-119, 2011.

MO, H.; WINTER, H. C; GOLDESTINE, I. J. Purification and characterization of a Neu5Ac a 2–6 Gal b-1–4 Glc/GlcNac–specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. *J. Biol. Chem.*, 275, 10623–29, 2000.

MOEINI, MOHAMMAD ; LEE, KWAN-BONG ; QUINN, THOMAS M. Temperature affects transport of polysaccharides and proteins in articular cartilage explants. *Journal of Biomechanics*, 2012, Vol.45(11), pp.1916-1923.

MORREALE, P; MONOPULO, R. J. *Rheumatol.*, vol. 23, 1385. 1996

MOREIRA, C. Reumatologia: Diagnóstico e tratamento. 2º edição; *Medsa*, Rio de Janeiro. (5):289-307.2002.

MORELAND, L.W. Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. *Arthritis Res Ther*, 5:54–67 (DOI 10.1186/ar623). 2003.

MWALE, F.; TCHETINA, E.; WU, C.W.; POOLE, A.R.: The assembly and remodeling of the extracellular matrix in the growth plate in relationship to mineral deposition and

cellular hypertrophy: an in situ study of collagens II and IX and proteoglycan. *J Bone Miner Res* 17:275-28. 2002.

NELSON, F.; DAHLBERG, L.; LAVERTY, S.; REINER, A.; PIDOUX, I.; IONESCU, M. et al. Evidence for altered synthesis of type II collagen in patients with osteoarthritis. *J Clin Invest.*102:2115–25. 1998.

NOYORI, K.; TAKAGI, T.; JASIN, H.E. Characterization of the macromolecular components of the articular cartilage surface. *Rheumatol Int.* 18:71–77. 1998.

OHSHIKA, S.; ISHIBASHI, Y.; KON, A.; KUSSUMI, T.; KIJIMA, H.; TOH, S. Potential of exogenous cartilage proteoglycan as a new material for cartilage regeneration. *International Orthopaedics (SICOT)*. 3-9; 2011.

OSBAHR, D.C; CAWLEY, P.W; SPEER, K.P. The effect of continuous cryotherapy on glenohumeral joint and subacromial space temperatures in the postoperative shoulder. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*, 18(7): 748-54, 2002.

OTTAWA, Panel Evidence-Based Clinical Practice Guidelines for Electrotherapy and Thermotherapy Interventions in the Management of Rheumatoid Arthritis in Adults. *Phys Ther.*84:1016 –1043. 2004.

PAIVA, P. M. G; COELHO, L.C.B.B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Appl. Biochem. Biotechnol*, 36, 113–17, 1992.

PAVELKA, K.; GATTEROVA, J.; OLEJAROVA, M.; MACHACEK, S.; GIACOVELLI, C.; ROVATTI, L.C. Glucosamine sulphate use delay of progression of knee osteoarthritis. *Arch Intern Med.* 162: 2113-23. 2002.

PAVELKA, K.; GATTEROVA, J.; OLEJAROVA, M.; MACHACEK, S.; GICOVELLI, G.; ROVATI, L.C. Glucosamine Sulfate Use and Delay of Progression of Knee Osteoarthritis: a 3-year, randomized, placebo-controlled, double-blind. *Arch Intern Med.* 14;162(18):2110-23. 2002.

PEAT, G.; MCCARNEY, R.; CROFT, P. Knee pain and osteoarthritis in older adults: a review of community burden and current use of primary health care. *Ann Rheum Dis.* (60):91-7. 2001.

PEREIRA, D.S.T.; CORREIA, M.T.S.; CARNEIRO-LEÃO, A.M.A. Avaliação da eficácia do Hidrogel de Cramol 1,4 irradiado no reparo tecidual de queimaduras térmicas de segundo grau. 2012 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas, UFPE, Recife. 2012.

PETIT, T. *BioMedical Engineering OnLine.* 10:4. 2011.

POOLE, A.R.; LAVERTY, S.; MWALE, F. Endochondral bone formation and development in the axial and appendicular skeleton. *In The osteoporosis primer Edited by: Press CU.* 3-17. 2000.

POINTON, MONIQUE ; DUFFIELD, ROB ; CANNON, JACK ; MARINO, FRANK. Cold water immersion recovery following intermittent-sprint exercise in the heat. *European Journal of Applied Physiology*, 2012, Vol.112(7), pp.2483-2494.

POSPÍČHAL R, NESMERÁK K, NEMCOVÁ I. *Anal. Lett.*, 2007, vol. 40, p. 1167.

POTHACHAROEN, P.; SIRIAUNKGUL, S.; ONG-CHAI, S.; SUP, A.J.P.; KUMJA, P.; WANAPHIRAK, C.; SUGAHARA, K.; HARDINGHAM, T. and KONGTAWELERT, P. *J. Biochem*, vol. 140, no. 4, 517.2006.

REGINSTER, J.Y.; DEROISY, R.; ROVATI, L.C.; LEE, R.L.; LEJEUNE, E.; BRUYERE, O. et al. Long-terms effects of glucosamine sulfate on osteoarthritis progression: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Lancet*. 357: 251-6. 2001.

REZENDE, U.M.; HERNANDEZ, A.J.; CAMANHO, G.L.; AMATUZZI, M.M. Cartilagem Articular e Osteoartrose. *acta ortop Brás*. 8(2): 100-101. 2004.

RINI, J.M. Lectin structure. *Annual Reviews of Biophysics and Biomolecular Structure*, v.34, p. 551-577, 1995.

SANDELL, L. J. *Nat. Rev. Rheumatol.* 8, 77–89 (2012); published online 10 January 2012; doi:10.1038/nrrheum. 199. 2011.

SHARON, N. AND LIS, H. Legume lectins – a large family of homologous proteins. *J. FASEB*, 4, 3198– 3208, 1990.

SHU, BIN; YANG, ZHIJIN; LI, XIANGPING; ZHANG, LI-QUN. Effect of Different Intensity Pulsed Ultrasound on the Restoration of Rat Skeletal Muscle Contusion. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2012, Vol.62(2), pp.329-336.

SILVA, M.C.C.; SANTANA, L.A.; SILVA, R.A.; LIMA, A.L.R.; JOANA, G.F.; PAIVA, M.G.; COELHO, L.C.B.B.; OLIVA, M.L.V.; ZINGALI, R.B.; CORREIA, M.T.S. Immobilized *Cratylia mollis* lectin: An affinity matrix to purify a soybean (*Glycine max*) seed protein with in vitro platelet antiaggregation and anticoagulant activities. *Process Biochemistry* (1991), v. 46, 74-80, 2011.

SILVEIRA, D. W. S.; BOERY, E. M.; OLIVEIRA, R. N. S. Reflexões acerca da crioterapia na fase aguda da artrite reumatóide e suas correlações com a crioglobulinemia. *Rev Saúde Com*, Jequié, BA, v. 2, n. 2, p. 154-156, 2006.

SRINIVAS, V.R.; BHANUPRAKASH, R. G., CHITTOOR, N. A.; SWAMINATHAN, P.; MITRA, N. AND SUROLIA, A. Legume lectin family, the “natural mutants of the quaternary state”, provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. *Biochim. Biophys. Acta*, 1527, 102-111, 2001.

STINGA, E.; TUAN, R.S.: Chondrogenic cell subpopulation of chick embryonic calvarium: isolation by peanut agglutinin affinity chromatography and in vitro characterization. *Anat Embryol Berl* 194, 427–437, 1996.

SUPARTZ, package insert. In: Smith and Nephew, Memphis; Revised: January 30 2007.

TAVARES, G.A.; CARACELLI, I.; BURGER, R.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C. B.B. AND OLIVA, G. Crystallization and preliminary x-ray studies on the lectin from the seeds of *Cratylia mollis*. *Acta Crystal.*52, 1046, 1996.

TERMEER, C.C.; HENNIES, J.; VOITH, U.; AHRENS, T.; WEISS, J.M.; PREHM, P. et al. Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells. *J Immunol.* 165(4):1863–1870. 2000.

TOEGEL, S. Lectin binding patterns reflect the phenotypic status of in vitro chondrocyte models. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal.* 45:351–360. 2009.

TOFFOLETTO, O.; TAVARES, A.; CASARINI, D.E. Et al. Pharmacokinetic Profile of Glucosamine and Chondroitin Sulfate Association in Healthy Male Individuals. *Acta Ortop Bras* 13(5), 235-237. 2005.

TONOMURA H, TAKAHASHI KA, MAZDA O, ARAI Y, SHIN-YA M, INOUE A, HONJO K, HOJO T, IMANISHI J, KUBO T. Effects of heat stimulation via microwave applicator on cartilage matrix gene and Hsp70 expression in the rabbit knee joint. *J Orthop Res* 2008; 26:34–41.

UCHIO, Y; OCHI, M; FUJIHARA, A; ADACHI, N; IWASA, J; SAKAI, Y. Cryotherapy influences joint laxity and position sense of the healthy knee joint. *Archives of physical medicine and rehabilitation*, 84(1):131-5, 2003.

VAN DAMME, E.J.M.; BARRE, A.; ROUGE, P.; VAN LEUVEN, F. AND PEUMANS, W.J. The NeuAc (a-2,6)–Gal/GalNac – binding lectin from elderberry (*Sambucus nigra*) bark, a type–2 ribosome-inactivating protein with an unusual specificity and structure. *Eur. J. Biochem.* 235, 128–37, 1996.

VALDERRABANO, V.; STEIGER, C. Treatment and Prevention of Osteoarthritis through Exercise and Sports. *Journal of Aging Research*. 1-6. 2011.

VERBRUGGEN, G. Chondroprotective drugs in degenerative joint diseases. *Rheumatology* 45:129-38, 2006.

VICTOR, EG; SILVEIRA, PCL; POSSATO, JC; DA ROSA, GL; MUNARI, UB; DE SOUZA, CT; et al. Pulsed ultrasound associated with gold nanoparticle gel reduces oxidative stress parameters and expression of pro-inflammatory molecules in an animal model of muscle injury. *Journal of Nanobiotechnology*, March 12, 2012, Vol.10, p.11.

VON, V.P.; FALLA, N.; SNOECK, H.; MATHIEU, E.: Characterization and purification of osteogenic cells from murine bone marrow by two-color cell sorting using anti-sca-1 monoclonal antibody and wheat germ agglutinin. *Blood* 84, 753–763.1994.

WILDEN, P.A.; MORRISON, B.D.; PESSIN, J.E. Wheat germ agglutinin stimulation of alpha beta heterodimeric insulin receptor beta-subunit autophosphorylation by noncovalent association into an alpha 2 beta 2 heterotetrameric state. *Endocrinology*.124, 971–979. 1989.

WONG, M.; CARTER, D.R.; Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: A research perspective. *Bone*.33:1–13. 2003.

WU, J; NYBORG, WL. Ultrasound, cavitation bubbles and their interaction with cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, Vol.60(10), pp.1103-1111.

YAGISHITA, K.; SEKIYA, I.; SAKAGUCHI, Y.; SHINOMIYA, K.; MUNETA, T. The effect of hyaluronan on tendon healing in rabbits. *Arthroscopy*.21(11): 1330-1336. 2005.

ZHANG, SHU; CHENG, JIQI; QIN, YI-XIAN ZHANG, CHI. Mechanobiological Modulation of Cytoskeleton and Calcium Influx in Osteoblastic Cells by Short-Term Focused Acoustic Radiation Force (ARF Modulates the Cytoskeleton and Calcium Influx). *PLoS ONE*, 2012, Vol.7(6), p.e38343

ZHANG, Z; CHEN, J; CHEN, L; YANG, X; ZHONG, H; QI, X; BI, Y; XU, K. Low frequency and intensity ultrasound induces apoptosis of brain glioma in rats mediated by caspase-3, Bcl-2, and surviving. *Brain Research*, 2012, Vol.1473, pp.25-34.

ZSCHÄBITZ, A.: Glycoconjugate expression and cartilage development of the cranial skeleton. *Acta Anat (Basel)* 161, 254–274.1998.

ZIBA, R.; TONI, M.; JARI, Y.; DAVID, A.C. Filamins in Mechanosensing and Signaling. *Annual Review of Biophysics*, Vol.41, p.227-246. 2012.

ARTIGO 1

ARTIGO 1

(submetido ao periódico *Osteoarthritis and cartilage*)

Effect of chondroitin sulfate and Cramoll 1,4 associated with cryotherapy and the therapeutic ultrasound in osteoarthritis surgically induced in the rabbit knee

Maria Tereza dos Santos Correia, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50670-420, Brasil, mtscorreia@gmail.com.

Marcelo Weinstein Teixeira, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Área de Fisiologia. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos CEP: 52171900 - Recife, PE – Brasil, Tel: 81-33021390; Ramal: 218 marceloteixeira@gmail.com.

Aluizio Falcão de Andrade Vanderlei, Centro de Ciências Biológicas e de Saúde – CCBS, Universidade Católica de Pernambuco. Rua Abel de Sá Bezerra Cavalcanti, n 85, ap. 202. Bairro: Casa Amarela CEP: 52051-270, Recife, Pernambuco-Brasil, Tel.: 2119-4172. aluizio-fisio@hotmail.com.

Ayla Karla Bastos de Souza, Centro de Ciências Biológicas e de Saúde – CCBS, Universidade Católica de Pernambuco. Rua. Leonardo da Vinci, Blco 112, apto 2102, imbiribeira, CEP 51190-350, Recife, Pernambuco-Brasil, Tel.: 81-3339-4523. aylakarla@hotmail.com.

Corresponding Author:

Paulo Henrique Altran Veiga, Centro de Ciências Biológicas e de Saúde – CCBS, Universidade Católica de Pernambuco. Rua Jose de Holanda 510, blco B apto 602, Bairro Torre, CEP – 50710-140, Pernambuco-Brasil, Tel.: 81-9723-4463; paulohveiga@gmail.com.

Running-title : Chondroitin and Cramoll 1,4 in osteoarthritis.

Abstract

Objective: To investigate the effects of Cramoll 1.4 and chondroitin sulfate (condroton ® Injectable 10ml), in the healing of knee cartilage in rabbits with surgically induced osteoarthritis, and compare the effects of cryotherapy and therapeutic ultrasound in the healing process.

Design: clinical study. The study was conducted by analyzing the cellular communities obtained in the histological studies. We used 18 male white rabbits California totaling an average of 4500 cells analyzed. Cartilage injury was performed simulating the rabbit knee osteoarthritis, and subsequently, the animals were divided into nine groups (n = 2 / group) treatment. Control group (CG) with no therapeutic procedure; Group submitted the application of ice (GG); Group underwent ultrasound therapy (GU) Group received muscular injection of condroton ®, (GSC), Group 1 received Cramoll 1,4 (GCramoll); Group submitted the application of ice and injection condroton ® (GGSG); Group underwent ultrasound therapy and condroton ® (GUSG); Group submitted the application of ice and Cramoll 1.4 (GGCramoll) and group undergoing therapy with ultrasound and Cramoll 1.4 (GUCramoll).

Results: The results showed that compared the use of therapeutic ultrasound with condroton ® (* p = 0.0251) and Cramol 1,4 whih therapeutic ultrasound (* p = 0.0414), there was increased area of chondroitin sulfate in both groups, however, this increase was higher in the group treated with Cramol 1,4. The use of concomitant use of cryotherapy condroton ® or Cramol 1.4, the study showed no differences when comparing treatment effects between 60 and 90 days. The use of Cramol 1.4 increased the area of chondroitin sulfate (* p = 0.0001) in osteoarthritis of the knee cartilage of rabbit at 60 and 90 days of treatment compared with the control group. It was also observed, increasing the area of collagen using the condroton ® 60 days of treatment (* p = 0.0001), but decreases its area in the period of 90 days.

Conclusions: Thus, the authors concluded that the therapeutic ultrasound and Cramoll 1,4 has positive effects on experimentally induced osteoarthrosis in rabbits.

Keywords: Lectin. Cramoll 1,4. Cryotherapy. Therapeutic ultrasound. Osteoarthritis. Knee.

INTRODUCTION

The initial pathologic process of osteoarthritis (OA) is hypermetabolic and degradative with the initial loss of proteoglycans and subsequent increase in proteoglycan synthesis, characterized by relatively increased amounts of chondroitin sulfate and relative insufficiency of the binding protein. Collagen is relatively preserved in the early stages of this disease, and maintenance of cartilage static function is essential to maintain the hyaluronic acid aggregate with collagen and its glycosaturated appendices ^{1,2}.

Currently, OA is one of the most common articular diseases. According to informative data from the World Health Organization, at the international level, 9.6% of men and 18.0% of women over age 60 have symptomatic OA ³. Additionally, according to the Center for Disease Control, USA, one to five adults, i.e. 22% of population have been diagnosed with any type of arthritis ⁴. This high incidence reflects not only the suffering of affected individuals, but also the numbers involving the disease. Treating this disease is difficult and its prognosis is poor from the functional point of view. The exact understanding on the biological mechanism occurring in this process is not yet fully elucidated; however, it is known that hyaluronic acid and proteoglycans play a key role in mechano-biology involving the cartilage protection ⁵. Recognize and interpret the cartilage as an organ that plays a functional role through mechanical and biological interactions at the tissue cellular level seems to be the way to be made by research on this pathological entity.

The intra-articular therapies have been widely used in Brazil and worldwide due to the speed of the analgesic effects and relief of symptoms of cartilage degeneration⁶. The drugs used for this treatment are primarily glucocorticoids, hyaluronic acid, chondroitin sulfate and topical treatments (i.e. capsaicin and metylsalicilate). These medications are extremely expensive, leading to spending about 4 billion dollars/year in the U.S., according to the American College of Rheumatology Subcommittee on Osteoarthritis Guidelines⁷. In Brazil, it is estimated a cost of around US\$ 2 billion a year on treating the OA side effects^{8,6}. Furthermore, the great majority of drugs for OA are based on stimulating the formation and aggregation of glycosaminoglycans of the cartilage. Therefore, it is important to find a biological compound economically viable and with therapeutic competence for aggregation of chondroitin sulfate and keratan sulfate (glycosaminoglycans) with hyaluronic acid.

Several studies have demonstrated the role of lectins in biological models *in vivo* and *in vitro*. Currently, these specific proteins are considered as new modulators in the bioactive processes of various organisms^{9,10,11,12,13}. The Cramoll 1,4 (lectin of *Cratylia mollis*) is a glucose lectin/mannose extracted from seeds of *C. mollis*, a plant native to northeastern Brazil, which induces mitogenic activity of human lymphocytes¹⁴. The 1,4 Cramoll 1,4 is capable of binding, isolating and characterizing human plasma glycoproteins¹⁵, identifying changes in breast tissue¹⁶, causing death of the parasite *Trypanosoma cruzi*¹⁷, immunomodulatory activity.

Studying the mechano-biological behavior with the cold (cryotherapy) and heat (therapeutic ultrasound) application in the fibrillar cartilaginous components represented

by collagen and those non-fibrillar that correspond to the glycosaminoglycans can answer many questions about the role of OA rehabilitation protocols, which are still based on empirical data^{18,19,20}.

In this study, the authors propose to investigate the effects of Cramoll 1,4 and chondroitin sulfate (condroton®) in the healing of rabbit knee cartilage with surgically-induced osteoarthritis. The study also compares the effects of cryotherapy and therapeutic ultrasound in the healing process. The field of this knowledge may suggest changing the use of expensive drugs such as primary election of OA treatment to the application of ice therapy (cryotherapy) and heat application (ultrasound), thus reducing the high investments of public resources on this common condition.

These changes can be made based on immunohistological analysis, specifically on the degenerated cartilage, in addition to recognizing if these treatments can potentiate the effects of chondroitin sulfate and Cramoll 1,4 in the cartilage healing after injury.

METHOD

ANIMALS

The study was conducted by analyzing the cellular communities (mean 250 cells / individual), obtained in the histological studies. We used 18 male white rabbits California albino weighing between 2.5 and 3.5 kg, corresponding to two to three months of age (Masoud et al. 1986), totaling an average of 4500 cells analyzed²¹.

The animals were kept in appropriate metallic cages, in the vivarium of the Center for Experimental Surgery (NCE), Department of Surgery, Federal University of Pernambuco-UFPE, and fed on standard feed and water *ad libitum*.

EXTRACTION AND PURIFICATION OF LECTIN

10% seed extract from *C. mollis* (w/v) was prepared in 0.15 M NaCl, fractionated with ammonium sulfate (40-60% saturation). The fraction obtained (F40-60) was subjected to affinity chromatography on Sephadex G-75. The Cramoll 1,4 was obtained by bioselective elution with D-glucose 0.3 M in 0.15 M NaCl, dialyzed against 0.15 M NaCl for 24 h and lyophilized ²².

EXPERIMENTAL PROTOCOL AND GROUPS

As pre-anesthetic drug, each animal received 0.2 mg/kg of 1% acepromazine intramuscularly. Anesthesia was performed by intramuscular application of 5% ketamine hydrochloride at 50 mg/kg weight associated with 2% xylazine at 3 mg/kg. After shaving the surgical area, asepsis, antisepsis and placement of sterile drapes, incision was performed by medial parapatellar incision followed by arthrotomy and lateral patella dislocation. With the flexed knee was exposed the medial femoral condyle with the aid of metal trephine was created a defect by removing an osteochondral cylinder of 3.2 mm/4.0 mm from the right knee. Then, the articular capsule was sutured with nylon monofilament 4.0 in separated points, the patellar tendon repositioned and the medial retinaculum and skin were closed also with nylon monofilaments 4.0 in separated

points^{23,24}. During the postoperative period Rimadyl® Injectable Solution were administered subcutaneously at 2.2 mg per kg of carprofen per body weight once a day for two weeks as analgesic in all rabbits.

The rabbits were divided into nine groups (n = 2/group), after removal of the knee osteochondral cylinder to simulate the cartilage defect: Control Group (CG) with no therapeutic procedure; Group submitted to the ice application (GG), cryotherapy; Group subjected to therapy with ultrasound (GU); Group receiving intramuscular injection (IM) of chondroitin sulfate (condroton®) at 0.1 ml/kg of body weight every four days until euthanasia (GSC); Group receiving Cramoll 1,4 (1.0 mg/ml) at 0.1 ml/kg of body weight every four days until the day of euthanasia (GCramoll); Group subject to the ice application and condroton® injection (IM) at 0.1 ml/kg of body weight every four days (GGSG); Group subjected to treatment with ultrasound and condroton ® (IM) at 0.1 ml/kg of body weight every four days (GUSG), Group subjected to ice application and Cramoll 1,4 (1.0 mg/ml) at 0.1 ml/kg of body weight four days (GGCramoll) and Group subjected to treatment with ultrasound and Cramoll 1,4 (1.0 mg/ml) every four days until the euthanasia at 0.1 ml/kg of body weight (GUCramoll).

The application of cryotherapy and therapeutic ultrasound was performed three times a week consecutively until the day of euthanasia of animals always in the same time, following the same standards, simulating a normal physical and therapeutic protocol. In GG, ice packs were applied through plastic bags, fized with crepe range, above the operated right knee for 20 min. In the GU, the application of ultrasound was performed for 5 min with the same equipment after complete trichotomy of the interline

region of the right knee on the medial surface of the proximal right leg where the femoral condyle is more exposed and allows good transducer coupling ²⁵. The head of the ultrasound was applied taking care not to pass directly over the surgical incision. During the sessions, the animals were restrained manually to keep them calm and comfortable. The ultrasound device used was the pulsed- type KLD Avatar® II, 1 MHz, 535 mW/cm² intensity (0.5 W/cm²), 2:8 pulse and previously calibrated. After finishing the treatment, device calibration was checked by a technician ²⁶.

The euthanasia of animals was performed in each group at 60 and 90 days after surgery. The sacrifices were performed under anesthesia similar to that in the preoperative period, followed by intravenous injection of 60 mg/kg of body weight of potassium chloride ²⁴. The operated knees were removed by osteotomy and carefully examined to evaluate the macroscopic and microscopic repairs obtained.

IMMUNOHISTOLOGICAL EVALUATION

After removing the materials, blockages were made followed by slides on silanized HE. All samples were dried in oven for 24 hours. The slides preparation for deparaffinization was performed with 5m xylol baths, followed by three series of 10 dips (washing) in xylene. Subsequently, three series of 10 dips in 100% and 70% ethanol and 10 dips with 2-minute immersion in PBS were performed. For antigen retrieval, samples were immersed in 25 ml of buffer citrate + 250 ml distilled water and placed in T-FAL 700® Steamer for 20 minutes at 95-100 °C. Afterwards, samples were allowed to stand for 20 m to reach room temperature. Slides were again washed in PBS 2 x 5min. After

this washing, the slides were immersed in 0.3% methanol solution with H₂O₂ (to block endogenous peroxidase) for 20 minutes and washed in PBS 2x5min. Slides were covered with background blocking solution for 20min and washed in PBS 2x5min. The slides were wiped around the tissue and they were covered with the primary antibody (collagen and chondroitin) and PBS with 1/50 μ l dilution. After these procedures all slides were incubated over-night in a moist chamber at 40 °C, and washed in PBS 2 x 10 min. The slides were wiped around the tissue and placed in Linker Reagent Biotinylated Mice & Rabbit IgG solution, covering the entire sample material on the slide and allowed to rest for 1h at room temperature. The same procedures were repeated with Streptavidin-peroxidase reagent solution. Following these reactions, the slides were washed in PBS and 2 x 10 min and wiped around the tissue. The revelation was performed with 20 μ l DAB chromogen/1ml DAB substrate solution, covering the whole tissue for 10 m. All reagents used were BioSystems, Inc. The photos were taken with Nikon camera with digital adapter DS-FI1 for microscopy, SEATECH PC, Intel® Pentium® Dual CPU E2200 GHz, 1.99 GB of Ram Microsoft Windows XP with System 2010. The software NIS-Elements F was used for capturing the images. Morphometric analysis of cell count and total area of collagen and chondroitin sulfate was performed with ImageJ software.

STATISTICAL ANALYSIS

Continuous variables were presented as mean and standard deviation (descriptive statistical techniques). The Komogorov-Smirnov test was applied to test the assumption of normality of the variables involved in the study. After confirming the non-

parametricity, data were compared using the Mann Whitney U test and Kruskal-Wallis test for independent groups. For discriminating the differences (means comparison) among groups, analysis of variance two-way ANOVA and the Bonferroni post-test were used to prove the existence of differences among variables. The significance level was $p \leq 0.05$. Data were entered in Excel spreadsheet and the software used to obtain statistical calculations was the GraphPad Prism 4®.

ETHICAL ASPECTS

The present study is consistent with the ethical principles, in accordance with the Code of Ethics of the World Medical Association (Helsinki Declaration) for experiments involving animals.

RESULTS

1. TUS INCREASES THE AMOUNT OF COLLAGEN AND THE ICE INCREASES THE CHONDROITIN SULFATE.

When compared to the control group, changes were observed in the total area of collagen and chondroitin sulfate (um) in the groups treated with Ultra Sound, Ice, and Cramoll 1,4 and condroton®. With respect to collagen, significant increase was observed with the use of therapeutic ultrasound ($p = 0.0110^*$) compared to treatment beginning (Figure 1A). In the group treated with ice there was maintenance of chondroitin sulfate (Figure 1B). In the group treated with condroton®, researchers have identified increase in the area of chondroitin sulfate at 60 days, but with great decrease after 90 days (Figure 2A). In the group treated with Cramoll 1,4 there was large areas of collagen and chondroitin sulfate at 60 days of therapy, but there was a slight decrease at the 90 days of treatment (Figure 2B).

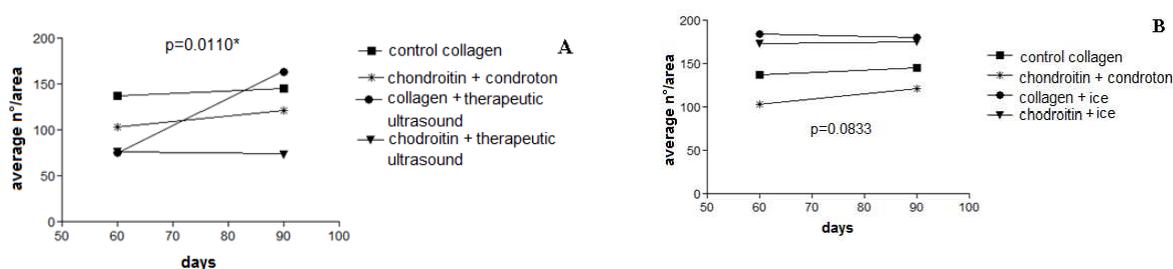


Figure 1. Comparison of the effects of therapeutic ultrasound (A) and Ice Therapy (cryotherapy) on collagen and chondroitin sulfate of cartilage between 60 and 90 days of treatment. Kruskal-Wallis test, $p \leq 0.05^*$. Control group versus Ultrasound Group (A) and control group x Ice Group (B).

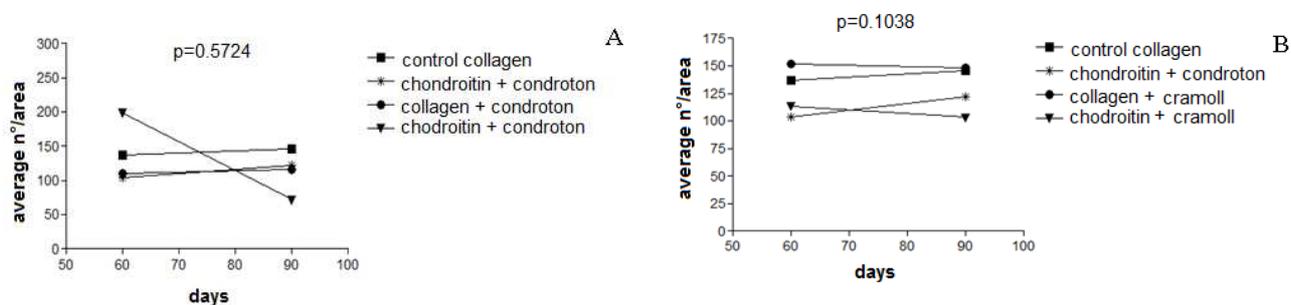


Figure 2. Comparison of the effects of condroton® (A) and Cramoll 1,4 (B) on the cartilage collagen and chondroitin between 60 and 90 days of treatment. Kruskal-Wallis test, $p \leq 0.05\%$ *. Control Group x Condron® Group (A) and Control group x Cramoll 1,4mol Group (B).

When compared the results of using therapeutic ultrasound (TUS) with condroton® and Cramoll 1,4, the authors found increased area of chondroitin sulfate in both groups ($p = 0.0251$ *, $p = 0.0414$ *); however, this increase was greater in the group treated with Cramoll 1,4 (Figure 3A). The use of cryotherapy with intramuscular reposition of condroton® or Cramoll 1,4 showed no differences in the study when compared the treatment effects between 60 and 90 days (Figure 3B).

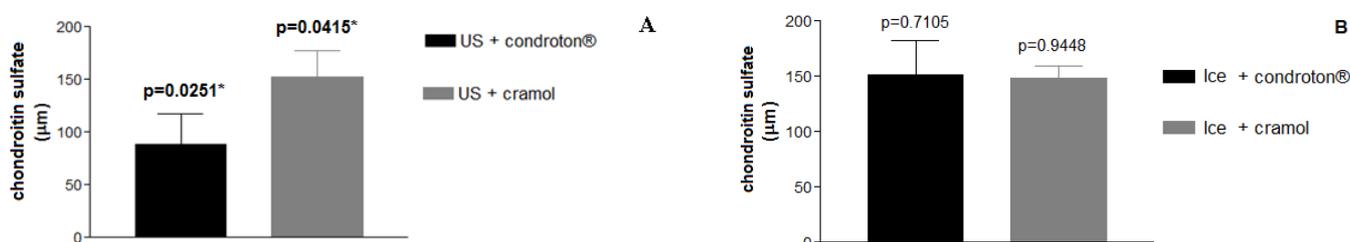


Figure 3. Comparison of effects of using Therapeutic Ultrasound with condroton® and Cramoll 1,4(A) and the Ice Therapy (cryotherapy) combined with chondroitin sulfate and Cramoll 1,4 (B) in the cartilage between 60 and 90 days of treatment. Two way ANOVA, $p = 0.05\%$ *.

1. CRAMOLL INCREASES THE AMOUNT OF CHONDROITIN IN 60 AND 90 DAYS

When comparing the results of the control group with those obtained with Cramoll 1,4 in 60 and 90 days of treatment, the authors observed increased amounts of chondroitin sulfate in both groups ($p = 0.0001^*$), Figure 4 A and B. There was increased area of collagen with the use of condroton® at 60 days of treatment, Figure 5A - ($p = 0.0001^*$), but decreasing at 90 days (Figure 5B).

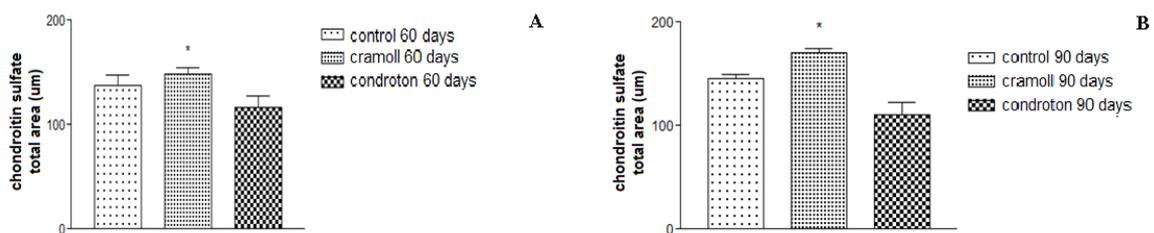


Figure 4. Comparison of the total area of chondroitin sulfate between the control group, the group treated with Cramoll 1,4 and the group treated with condroton® at 60 (A) and 90 (B) days of treatment. One-way ANOVA - Kruskal-Wallis test $p = 0.05\% ^*$.

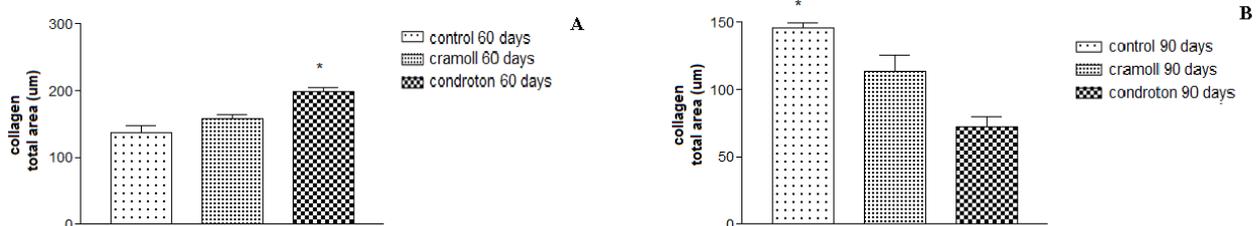


Figure 5. Comparison of the total area of collagen between the control group, the group treated with Cramoll 1,4 and the group treated condroton® at 60 (A) and 90 (B) days of treatment. One-way ANOVA - Kruskal-Wallis test $p = 0.05\% ^*$.

DISCUSSION

1. ULTRASOUND INCREASES THE COLLAGEN AMOUNT

In this study, the authors found that the use of therapeutic ultrasound (TUS), promoted significant increase in the collagen area present in the cartilage of rabbits analyzed. It is known that the ultrasound, as well as microwave, has been widely used as adjuvant in therapy of osteoarthritis. It is consensus that these types of heat affect mainly the deep layers of cartilage; however, the effects of hyperthermia in osteoarthritis are not well investigated clinically. ²⁷⁻²⁸ found that the microwave oven had the ability to increase the temperature of the intrarticular rabbit knee with 20 minutes of application 2.45 GHz intensity. The authors reported that the temperature increase has led to increased expression of collagen type II. In this study, the authors found that Hsp70 inhibition by quercetin inhibits the expression of proteoglycans; however, it maintains the increase of type-II collagen. This fact confirms the results of this study, with slight decrease of chondroitin sulfate (proteoglycan) using the heat promoted by therapeutic ultrasound but increased area of collagen. Moreover, the authors found remarkable increase in the accumulation of Heat Shock Proteins 70 (Hsp70) in chondrocytes, when subjected to intrarticular temperature increase. The Hsp70 is a member of a family of highly conserved proteins, synthesized in cells subjected to mechanical stress and loading, typically as those in the synovial articular cartilage. The Hsp70 protect thus the cartilage proteoglycans after intense stress and degeneration as found in the osteoarthritis. These proteins can interact with multiple polypeptides in a variety of cell assembly

processes so that to stimulate cartilage formation with the application of therapeutic ultrasound.

2. THE TUS WITH CRAMOLL INCREASES THE CHONDROITIN SULFATE AREA MORE THAN THE TUS WITH CONDROTON®

The TUS stimulates Hsp70 due to the increased articular temperature. The presence of the hsp70 gene in cartilage chondrocytes inhibits its apoptosis²⁹. Furthermore, glutamine that induces Hsp70 to protect the chondrocytes of cytotoxic stresses reduces the degeneration of articular cartilage when they are administered intrarticularly in osteoarthritis in rats^{30,31}. Importantly, the treatment based on the TUS has its limitations, mainly due to the knee anatomy, the joint depth, amount of fat and adjacent fatty coxin. For^{32,33}, the TUS stimulates bone callus formation. This is due to increased synthesis of extracellular matrix proteins in the cartilage, possibly changing the chondrocyte maturation and endochondral bone formation.

The ultrasound has been used widely with the indication of bone callus formation. This effect is attributed to the increased synthesis of proteins in the cartilage extracellular matrix and stimulating the maturation of chondrocytes retarding the osteoarthritis degeneration. Moreover, TUS stimulates the synthesis of proteoglycans and extracellular matrix, contributing to the fracture healing and the bone formation with the synthesis of collagen and prostaglandins.

Regarding the ice use (cryotherapy), it was observed the maintenance in the chondroitin sulfate area. Cryotherapy has been used since ancient times for its beneficial effects on injured tissues^{34,35}. Maintaining the area of chondroitin sulfate reflects the cryotherapy effects on the cartilage metabolism, lowering its hypoxia, preventing degenerative inflammatory mechanisms, releasing mediators that maintain the joint integrity^{36,37}.³⁸ showed the effects of cell preservation by cold. He reported that it is possible to preserve cells of vertebral disks for use in grafts in cases of their infeasibility. Other authors also have used hypothermia as important adjuvant in the preservation of various cells, including those present in cartilage^{39,40}.

3. CRAMOLL INCREASES THE AMOUNT OF CHONDROITIN IN 60 AND 90 DAYS

The use of Cramoll 1,4 as chondroprotective is irrelevant due to the effect of glycoagglutinator already known as lectins. The lecticans are part of a large family of chondroitin sulfate proteoglycans⁴¹, characterized by the presence of a C-type domain and its core proteins. The areas of C-terminal globular lecticans consist of one or two epidermal growth factors (EGF), a C-type lectin domain and one domain of protein regulatory complement (CRP)⁴². This arrangement of lecticans suggests their involvement in the recognition of carbohydrate bonds. Thus, Cramoll 1,4 which is a lectin, seems to recognize the proteoglycans present in the cartilage, rich in carbohydrates, such as any glycoprotein. In the present study, the group treated with

condroton showed significant decrease in the chondroitin sulfate at 90 days of treatment; however, the group treated with Cramoll 1,4 showed lesser decrease. This leads the authors to infer that the Cramoll 1,4 actually recognized the chondroitin sulfates present in the cartilage protecting them and reducing their degeneration. It is understood that the similarities with selectins and their abundant expression in the nervous system suggests that lecticans play an important role in carbohydrate recognition ^{43,42}.

Undoubtedly, proteoglycans formed by chondroitin sulfates and keratan have capital importance in the process of absorption and release of water by cartilage. Its inherent ability of hydrophilicity leads to the mechanism of increased cartilage thickness, providing the main cartilage function: the damping. Combined with hyaluronic acid, proteoglycans form a pericellular coating maintaining sufficient adhesion to reduce friction in the cartilage ⁴⁴. These components are essential for maintaining the hydrostatic pressure and allow the cartilage to resist loads.

It is known that lectins have as main characteristic the glucoagglutination. Lectins are proteins of non-immune origin which recognize carbohydrate such as complex polysaccharides. Their interactions with polysaccharides resemble the antigen-antibody binding and enzyme-substrate reactions ⁴⁵. The high specificity of lectins by carbohydrates can be used as a therapeutic option. The cramol can be used to interact with cartilage components, as they are formed mainly by proteoglycans. The authors of this study believe that this interaction may be the cause of increased chondroitin sulfate at 60 and 90 days of treatment with the cramoll.

Cramoll 1,4 is a lectin isolated from seeds of *Cratylia mollis*²⁰ of the Leguminosae family which recognizes glycoproteins^{46,47}. The Cramoll 1,4 is involved in many biological activities such as antitumoral,¹⁶ and its specificity is correlated with Concanavalin A. There are several reports in the literature on these interactions^{48,49}. Some lectins have been used as models for studying the molecular basis of protein-carbohydrate interactions. Another study demonstrated that Lectins have a high level of similarity to the primary structure with carbohydrates and also presents notable variations in the carbohydrate binding⁵⁰.

The cells that synthesize all these cartilage proteins are chondrocytes. Any change in their function leads to the characteristic OA framework. Being the only vital elements inside the tissue, chondrocytes play a crucial role in the loss of cartilage function. It has been shown that the increased matrix catabolism and changes in its gene expression are important chondrocyte features under osteoarthritic conditions. In vitro studies using cell culture of chondrocytes have increased our understanding of the physiology of cartilage phenotype by altering the chondrocytic cells in the disease⁵⁰. In particular, immortalized lines of chondrocyte cells, such as C-28/I2 and T/C-28a2, have facilitated the experiments reproducibility to explore specific chondrocytes and their response to stimuli, such as cytokines or chondroprotective agents.

Thus, considering the results presented in this study, the authors arrived at some conclusions. Among them, when compared the results of using TUS with condroton® (p = 0.0251*) and TUS with Cramoll 1,4 (p = 0.0414*), the authors verified increased area of chondroitin sulfate in both groups, but this increase was greater in the group

treated with Cramoll 1,4. The use of cryotherapy concomitantly with condroton® or Cramoll 1,4 revealed no differences in the study compared to the effects of treatment between 60 and 90 days. The use of Cramoll 1,4 increased the area of chondroitin sulfate ($p = 0.0001^*$) in osteoarthritis of the rabbit knee cartilage at 60 and 90 days of treatment, compared with the control group. It was observed increased area of collagen with the use of condroton® at 60 days of treatment ($p = 0.0001^*$), but decreasing its area within 90 days.

ACKNOWLEDGMENTS

AUTHORS CONTRIBUTIONS

Maria Teresa Correia dos Santos, Advisor of the study.

Weinstein Marcelo Teixeira, the veterinarian responsible for the animal study.

Aluizio Falcão Vanderlei de Andrade and Ayla Karla Bastos de Souza, responsible researchers to conduct the study procedures (ultrasound and cryotherapy).

Paulo Henrique Veiga Altran, researcher responsible for the entire study (medications, cryotherapy, ultrasound and histology).

ROLE OF THE FUNDING SOURCE

This study was funded by CNPq.

CONFLICT OF INTEREST

All the authors declared there being no conflict of interest of any kind.

REFERENCES

1. Valderrabano V; Steiger C. Treatment and Prevention of Osteoarthritis through Exercise and Sports. *Journal of Aging Research. Review Article 2011; 1-6.*
2. Alexandra M. Intra-articular hyaluronic acid increases cartilage breakdown biomarker in patients with knee osteoarthritis. *Clin Rheumatol 2010, 29:619–624.*
3. World Health Organization. Department of Chronic Diseases and Health Promotion Chronic Respiratory Diseases and Arthritis (CRA) 20 Avenue Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland - accessed in aug 2012. [<http://www.who.int/chp/topics/rheumatic/en>]
4. Centers for disease control and prevention. Prevalence of Doctor-Diagnosed Arthritis and Arthritis-Attributable Activity Limitation— United States, 2007–2009. *MMWR . 2010; 59: 1261-1265.*
5. Lajeunesse D, Delalandre A, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. Hyaluronic acid reverses the abnormal synthetic activity of human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. *Bone.* 2003; 33: 703-10.
6. Rezende UM, Hernandez AJ, Camanho GL, AmatuZZi MM. Cartilagem Articular e Osteoartrose. *acta ortop bras.* 2004; 8(2): 100-101.
7. Marc CH, Roy DA, Karine TA, Maria B, Gordon G, Jessie M, et al. American College of Rheumatology. Recommendations for the Use of Nonpharmacologic and Pharmacologic Therapies in Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. *Arthritis care & research 2012; 64: 465–474.*

8. Moreland LW. Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. *Arthritis Res Ther* 2003; 5: 54-67.
9. Ghosh S, Majumder M, Majumder S, Ganguly NK, Chatterjee BP. Saracin: a lectin from *Saraca indica* seed integument induces apoptosis in human Tlymphocytes. *Arch. Biochem. Biophys* 1999; 371: 163–168.
10. Lopes FC, Cavada BS, Pinto VPT, Sampaio AH, Gomes JC. Differential effect of plant lectins on mast cells of different origins. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2005; 38: 935–941.
11. Das T, Mallick SK, Paul D, Bhutia SK, Bhattacharyya TK, Maiti TK. Microcontact printing of ConcanavalinA and its effect on mammalian cell morphology. *J. Colloid Interface Sci.* 2007; 314: 71–79.
12. Ghosh D, Maiti T.K. Immunomodulatory and anti-tumor activities of native and heat-denatured *Abrus agglutinin*. *Immunobiology.* 2007; 212: 589–599.
13. Song SK, Moldoveanu Z, Nguyen HH, Kim EH, Choi KY, et al. Intranasal immunization with influenza virus and Korean mistletoe lectin C (KML-C) induces heterosubtypic immunity in mice. *Vaccine* 2007; 25: 6359–6366.
14. Maciel EVM, Araújo-Filho VS, Nakazawa M, Gomes YM, Coelho LCBB, Correia MTS. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals.* 2004; 32: 57–60.
15. Lima VLM, Correia MTS, Cechinel YMN, Sampaio CAM, Owenand JS, Coelho LCBB. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma

- glycoproteins, including lecithin–cholesterol acyltransferase. *Carb. Polym* 1997; 33: 27–32.
16. Beltrão EIC, Correia MTS, Figueredo-Silva J, Coelho LCBB. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Appl. Biochem. Biotechnol* 1998; 74: 125–134.
 17. Fernandes MP, Inada NM, Chiaratti MR, Araújo FFB, Meirelles FV, Correia MTS, et al. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by *Cratylia mollis* seed lectin. *J. Bioenerg. Biomembr* 2010; 42: 69–78.
 18. Bleakley C, McDonough S, MacAuley D. The use of ice in the treatment of acute soft-tissue injury: a systematic review of randomized controlled trials. *Am J Sports Med* 2004; 32: 251-261.
 19. Glenn Jr RE, Spindler KP, Warren TA, McCarty EC, Secic M. Cryotherapy Decreases Intraarticular Temperature after ACL Reconstruction. *Clin Orthop Related Research* 2004; 421: 268–272.
 20. Silveira DWS, Boery EM, Oliveira RNS. Reflexões acerca da crioterapia na fase aguda da artrite reumatóide e suas correlações com a crioglobulinemia. *Rev Saúde Com* 2006; 2(2): 154-156.
 21. Masoud I, Shapiro F, Kent R, Moses A. A longitudinal study of the growth of the New Zealand white rabbit: cumulative and biweekly incremental growth rates for body length, body weight, femoral length and tibial length. *J Orthop Res* 1986; 4: 221-231.

22. Correia MTS, Coelho LCBB. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1995; 55: 261–273.
23. Cafalli FAZ, Borelli V, Holzchuh MP, Farias EC, Cipola WWV, Neto ACC, Livani B, Xavier CRM. Estudo experimental dos efeitos da radiação laser de baixa energia na regeneração osteocartilagínea em joelhos de coelhos: Aspectos histológicos. *Rev Bras Ortop* 1993; 28(9): 673-678.
24. Ribeiro JL, Camanho GL, Takitan LC. Estudo macroscópico e histológico de reparos osteocondrais biologicamente aceitáveis. *Acta Ortop Bras* 2004; 12(1): 17-21.
25. Pessina, AL, Volpon JB. Aplicação do ultrassom terapêutico na cartilagem de crescimento de coelhos. *Rev Bras Ortop* 1999; 34: 347-54.
26. Hekkenberg RT. Validated ultrasonic power measurements up to 20 W. *Ultrasound in Medicine & Biology* 2001; 27(3): 427-438.
27. Tonomura H, Takahashi KA, Mazda O, Arai Y, Shin-Ya M, Inoue A, et al. Effects of heat stimulation via microwave applicator on cartilage matrix gene and Hsp70 expression in the rabbit knee joint. *J Orthop Res* 2008; 26: 34-41.
28. Wen CT, Jong HSP, Chih CH, Ngok KC, Miao SL, Ching FH. Ultrasound Stimulation of Types I and III Collagen Expression of Tendon Cell and Upregulation of Transforming Growth Factor b. *Journal of orthopaedic research.* 2006, 1310-1316.

29. Terauchi R, Takahashi KA, Arai Y, Ikeda T, Ohashi S, Imanishi J, et al. Hsp70 prevents nitric oxide-induced apoptosis in articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1562–1568.
30. Grossin L, Etienne S, Gaborit N, Pinzano A, Cournil-Henrionnet C, Gerard C, et al. Induction of heat shock protein 70 (Hsp70) by proteasome inhibitor MG 132 protects articular chondrocytes from cellular death in vitro and in vivo. *Biorheology* 2004; 41: 521–534.
31. Etienne S, Gaborit N, Henrionnet C, Pinzano A, Galois L, Netter P, et al. Local induction of heat shock protein 70 (Hsp70) by proteasome inhibition confers chondroprotection during surgically induced osteoarthritis in the rat knee. *Biomed Mater Eng* 2008; 18: 253–260.
32. Yang KH, Parvizi J, Wang SJ, Lewallen DG, Kinnick RR, Greenleaf JF, et al. Exposure to low-intensity ultrasound increases aggrecan gene expression in a rat femur fracture model. *J Orthop Res* 1996; 5: 802-9.
33. Gebauer GO, Lin SS, Beam HA, Vieira PJ, Parsons R. Low-intensity pulsed ultrasound increases the fracture callus strength in diabetic BB wistar rats but does not affect cellular proliferation. *Clin Orthop Res* 2002; 20: 587-92.
34. Knight K. *Cryotherapy in Sport Injury Management*. 1ed. Champaign, IL, Human Kinetics 1995.
35. Michlovitz S, ed. *Thermal Agents in Rehabilitation*. 3ed. Philadelphia: F.A. Davis; 1996:107-139. 24.

36. Barber FA. A comparison of crushed ice and continuous flow cold therapy. *Am J Knee Surg* 2000; 13: 97–101.
37. Bocobo C, Fast A, Kingery W, Kaplan M. The effect of ice on intra-articular temperature in the knee of the dog. *Am J Phys Med Rehabil* 1991; 70: 181–185.
38. . Lam SKL, Chan SCW, Leung VYL, Lu WW, Cheung KMC, Luk KDK. The role of cryopreservation in the biomechanical properties of the intervertebral disc. *Eropean Cells and Materials* 2011; 22: 303-402.
39. Dhillon N, Bass EC, Lotz JC. Effect of frozen storage on the creep behavior of human intervertebral discs. *Spine* 2001; 26: 883-888.
40. Giraldo, HJM, Trochêz WDF, Valencia SJ, Zapata LN, Londoño PC, Pineda MC. Alginato en procesos de criopreservación celular y su rol como factor inductor de diferenciación condrogénica. *Rev.cienc.biomed* 2011; 2 (2): 201-209.
41. Ruoslahti, E. Brain extracellular matrix. *Glycobiology* 1996; 6: 489–492.
42. Miura R, Anders A, Iryna M, Kazuki H, Ronald L, Erkki R, et al. The Proteoglycan Lectin Domain Binds Sulfated Cell Surface Glycolipids and Promotes Cell Adhesion. *The journal of biological chemistry.* 1999; 274(16): 11431–11438.
43. Rauch U, Karthikeyan L, Maurel P, Margolis RU, Margolis RKJ. Chondroitin sulfate proteoglycans as mediators of axon growth and pathfinding. *Biol Chem* 1992; 267: 19536–19547.
44. Lee JY, Spicer AP. Hyaluronan: a multifunctional, mega Dalton, stealth molecule. *Curr. Opin. Cell Biol* 2000; 12: 581–586.

45. Oliveira, MDL, Nogueira ML, Correia MTS, Coelho LCBB, Andrade CAS.
Detection of dengue virus serotypes on the surface of gold electrode based on
Cratylia mollis lectin affinity. *Sensors and Actuators B* 2011; 155: 789–795.
46. Sharon N. Lectin carbohydrate complexes of plants and animals – an atomic
View. *Trends Biochem. Sci.* 1993; 18: 221–226.
47. Melo CML, Castro MCAB, Oliveira AP, Gomes FOS, Pereira VRA, Correia
MTS, et al. Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental
lymphocytes. *Phytother. Res* 2010a; 24:10.
48. Melo, CML, Paim BA, Zecchin KG, Morari J, Chiarrati MR, Correia MTS, et al.
Cramoll 1,4 lectin increases ROS production, calcium levels and cytokine
expression in treated spleen cells of rats. *Mol. Cell. Biochem* 2010b;339:
49. Melo CML, Melo H, Correia MTS, Coelho LCBB, Silva MB, Pereira VRA.
Mitogenic response and cytokine production induced by Cramoll 1,4 lectin in
splenocytes of inoculated mice. *Scand. J. Immunol.* 2010c; 73: 112–121

ARTIGO 2

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA CARTILAGEM DE COELHOS,
APÓS A UTILIZAÇÃO DA CRIOTERAPIA E DO ULTRASSOM
TERAPÊUTICO**

Maria Tereza dos Santos Correia, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50670-420, Brasil, mtscorreia@gmail.com.

Marcelo Weinstein Teixeira, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Área de Fisiologia. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos CEP: 52171900 - Recife, PE – Brasil, Tel: 81-33021390; Ramal: 218, marceloteixeira@gmail.com.

Aluizio Falcão de Andrade Vanderlei, Centro de Ciências Biológicas e de Saúde – CCBS, Universidade Católica de Pernambuco. Rua Abel de Sá Bezerra Cavalcanti, n 85, ap. 202. Bairro: Casa Amarela CEP: 52051-270, Recife, Pernambuco-Brasil, Tel.: 2119-4172. aluizio-fisio@hotmail.com.

Ayla Karla Bastos de Souza, Centro de Ciências Biológicas e de Saúde – CCBS, Universidade Católica de Pernambuco. Rua. Leonardo da Vinci, Blco 112, apto 2102, imbiribeira, CEP 51190-350, Recife, Pernambuco-Brasil, Tel.: 81-3339-4523, aylakarla@hotmail.com.

Autor para correspondência:

Paulo Henrique Altran Veiga, Centro de Ciências Biológicas e de Saúde – CCBS, Universidade Católica de Pernambuco. Rua Jose de Holanda 510, blco B apto 602, Bairro Torre, CEP – 50710-140, Pernambuco-Brasil, Tel.: 81-9723-4463;

paulohveiga@gmail.com.

RESUMO

A crioterapia e o ultrassom vem sendo utilizados como modalidades terapêuticas que visa melhorar a qualidade de vida e bem estar de pacientes com osteoartrose (OA). Entretanto, vários questionamentos sobre o comportamento destes agentes térmicos nos tratamentos fisioterapêuticos ainda são baseados em dados empíricos. O domínio desse conhecimento pode sugerir a mudança da utilização de medicamentos de alto custo como eleição principal do tratamento da OA para a utilização da terapia com aplicação de gelo (crioterapia) e a aplicação de calor (ultrassom), diminuindo os altos investimentos dos recursos públicos nessa afecção tão comum. **OBJETIVO:** Este estudo se propõe a verificar as alterações moleculares provocadas pela utilização do frio e do calor nos elementos fibrilares e não fibrilares da cartilagem do joelho de coelhos. **MÉTODOS:** foram utilizadas média de 1500 células de seis coelhos machos, divididos em três grupos de dois indivíduos, após a retirada do cilindro osteocondral do joelho para simular o defeito na cartilagem. 1-Um grupo controle que não foi submetido a nenhum procedimento terapêutico-(1GC); 2-um grupo submetido à aplicação de gelo (crioterapia) (2GG); 3-um grupo submetido à terapia com ultrassom-(3GU). Para testar a suposição de normalidade das variáveis envolvidas no estudo foi aplicado o teste Komogorov-Smirnov. Após a confirmação da não parametricidade dos dados, os dados foram comparados, através do teste U de Mann Whitney e Kruskal-Wallis para grupos independentes. **RESULTADOS:** Observou-se importante aumento na área do colágeno com a utilização do ultrassom terapêutico e discreto decréscimo com o uso do gelo. Em relação a área do sulfato de condroitina, o gelo demonstrou ganho em relação a 60 e 90 dias de tratamento. Ocorreu aumento significativo do colágeno nas áreas média e superficial da cartilagem e um leve declínio correspondente a área de condroitina. Verificou-se grande migração do sulfato de condroitina para a superfície da cartilagem. Do ponto de vista histológico, não ocorreram alterações evidentes em relação à distribuição do colágeno e da condroitina nas cartilagens estudadas após o tratamento com gelo. **CONCLUSÃO:** O calor aumenta a produção da área do colágeno na superfície da cartilagem com AO com 90 dias de tratamento. O frio preserva a área do sulfato de condroitina (proteoglicanas) da cartilagem. A utilização da crioterapia deve ser estimulada entre o início do tratamento e os primeiros 60 dias na AO. Após 60 dias a utilização do calor deve ser preconizada.

Palavras chave: Histologia; Cartilagem; Ultrassom terapêutico; Crioterapia; Colágeno;

INTRODUÇÃO

A crioterapia e a termoterapia vem sendo utilizadas como modalidades terapêuticas que visa melhorar a qualidade de vida e bem estar de pacientes com osteoartrose (OA), (Felice e Santana, 2009). Entretanto, vários questionamentos sobre o comportamento destes agentes térmicos nos tratamentos fisioterapêuticos ainda são baseados em dados empíricos (Bleakley e tal., 2004; Glenn Jr et al., 2004; Silveira et al., 2006). O domínio desse conhecimento pode sugerir a mudança da utilização de medicamentos de alto custo como eleição principal do tratamento da OA para a utilização da terapia com aplicação de gelo (crioterapia) e a aplicação de calor (ultrassom), diminuindo os altos investimentos dos recursos públicos nessa afecção tão comum. Na literatura, a maioria dos trabalhos publicados demonstram a utilização de modelos animais como forma de pesquisa devido a dificuldade na aceitação de grupos com seres humanos. Desta forma, analisar o comportamento mecanobiológico da cartilagem em coelhos com a aplicação do frio (crioterapia) e do calor (ultrassom terapêutico), nos componentes cartilaginosos fibrilares, representados pelo colágeno, e não fibrilares que correspondem aos glicosaminoglicanos, podem servir como resposta a estes questionamentos.

Fisiologicamente, a crioterapia contribui para redução dos processos inflamatórios provocados nas articulações diminuindo o edema, atuando indiretamente no alívio da dor e reduzindo o processo degenerativo da articulação através da diminuição da temperatura intrarticular (Fang, 2012; Banfi, 2009, _____2010). Conseqüentemente, este processo atua na diminuição das atividades de enzimas conhecidas como colagenases, que destroem o colágeno presente na cartilagem articular e são liberadas por leucócitos polimorfonucleares infiltrados na sinóvia quando a temperatura intrarticular encontra-se elevada (Silveira *et al.* 2006, Maes, 1995). Os resultados da aplicação da crioterapia realizando massagens com gelo em pacientes com OA do joelho, são significativos na diminuição da dor e conseqüentemente, na melhora da amplitude de movimento articular (Brosseau et al. 2006).

A aplicação do calor é considerada como uma forma de preparação para as terapias de exercício em pacientes com rigidez articular intensa ou com dificuldade para o relaxamento da musculatura, mostrando ser benéfico no alívio da dor (Peter, *et al* 2011, Arth Found 2003). O ultrassom terapêutico (UST) como parte desta modalidade termoterapêutica, destaca-se nos processos de cicatrização em lesões de tecidos moles, aumentando a síntese de colágeno e participando da regeneração da inervação periférica (Fenanda, 2011). Além disso, o uso do UST pode estimular a secreção de matriz celular (Fréz, *et al.* 2006). Esses efeitos demonstram que o UST possa ser utilizado como um importante fator contribuinte no processo de regeneração da cartilagem articular em

pacientes com OA. Contudo, algumas análises feitas sobre a influência do Ultrassom Pulsado de Baixa Intensidade (USPBI) na síntese e elaboração de Glicoaminoglicanos com diferentes intensidades sugerem que o USPBI possui um potencial limitado para fornecer um método eficaz na produção de matriz como parte de uma estratégia de engenharia de tecidos para reparação de cartilagens (Martins *et al*, 2011). Segundo Kengi, *et al*, (2009), o efeito direto do calor sobre o metabolismo e reparação da cartilagem articular é desconhecido, o que mostra a necessidade de mais estudos sobre esse tema.

De fato, a maioria dos trabalhos publicados apresenta resultados superficiais do tratamento das desordens físicas com utilização do calor e do frio, e poucos, demonstram análises imunohistológicas especificamente da cartilagem degenerada. Portanto, este estudo se propõe a verificar as alterações moleculares provocadas pela utilização do frio e do calor nos elementos fibrilares e não fibrilares da cartilagem do joelho de coelhos.

METODOLOGIA

Este trabalho caracteriza-se como ensaio clínico de estudo terapêutico com análise qualitativa e quantitativa (Sampaio e Mancini, 2007). Neste estudo, foram utilizadas média de 1500 células de seis coelhos machos da raça Califórnia, albinos, pesando entre 2,5 a 3,5 Kg, correspondendo de dois a três meses de idade (Masoud et al., 1986). Os coelhos foram divididos em três grupos de dois indivíduos, após a retirada do cilindro osteocondral do joelho para simular o defeito na cartilagem. 1-Um grupo controle que não foi submetido a nenhum procedimento terapêutico-(1GC); 2-um grupo submetido à aplicação de gelo (crioterapia) (2GG); 3-um grupo submetido à terapia com ultrassom-(3GU). No GG foi aplicado bolsas de gelo através de sacos plásticos, em cima do joelho direito operado por vinte (20) minutos. No GU, a aplicação do ultrassom foi realizada durante cinco (5) min, com o mesmo aparelho, após tricotomia completa na região da interlinha do joelho direito na face medial da região proximal da perna direita, onde o côndilo femural é mais exposto e permite bom acoplamento do transdutor (Pessina e Volpon, 1999). O aparelho de ultrassom utilizado foi do tipo pulsado, marca *KLD Avatar II*®, com era de 3,00 cm² de cabeçote, frequência de 1 MHz, e potência máxima de 10w. A frequência utilizada no estudo foi de 16Hz no ciclo de pulso de 20% (2:8), por um tempo de 5 minutos, intensidade de 535 mW/cm² (0,5W/cm²) e previamente calibrado. Foi realizada eutanásia de um animal de cada grupo para acompanhamento do processo cicatricial através da análise imunohistológica após sessenta (60) e noventa (90) dias do procedimento cirúrgico. O período de 90 dias é o suficiente para a completa cicatrização da cartilagem (Ribeiro *et al*, 2004). Os procedimentos de incubação e revelação do colágeno e do sulfato de condroitina foram realizados no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) localizado na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis contínuas foram apresentadas como média e desvio padrão (técnicas de estatística descritivas). Para testar a suposição de normalidade das variáveis envolvidas no estudo foi aplicado o teste Komogorov-Smirnov. Após a confirmação da não parametricidade dos dados, os dados foram comparados, através do teste U de Mann Whitney e Kruskal-Wallis para grupos independentes. Considerou-se o nível de significância $p \leq 0,05$. Os dados foram digitados na planilha Excel e o software utilizado para a obtenção dos cálculos estatísticos foi o GraphPad Prism 4®.

RESULTADOS

Quando comparados ao grupo controle, foram observadas alterações na área total (μm) do colágeno e do sulfato de condroitina nos grupos tratados com Ultrassom e Gelo. Em relação ao colágeno, observou-se importante incremento com a utilização do ultrassom terapêutico e discreto decréscimo com o uso do gelo. Em relação à área do sulfato de condroitina, o gelo demonstrou ganho em relação a 60 e 90 dias de tratamento (ver figura 1 e 2).

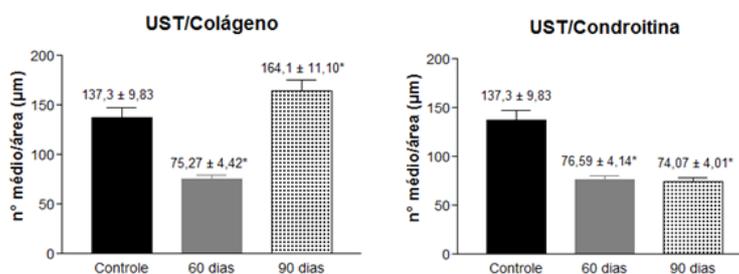


Figura 1: Comparação dos resultados do colágeno e do sulfato de condroitina entre os grupos controle e os grupos onde foram utilizados ultrassom nos períodos de 60 e 90 dias. Média/área celular (μm).

Teste U de Mann Whitney.

Diferença estatisticamente significante $p\text{-valor} \leq 0,05\%*$.

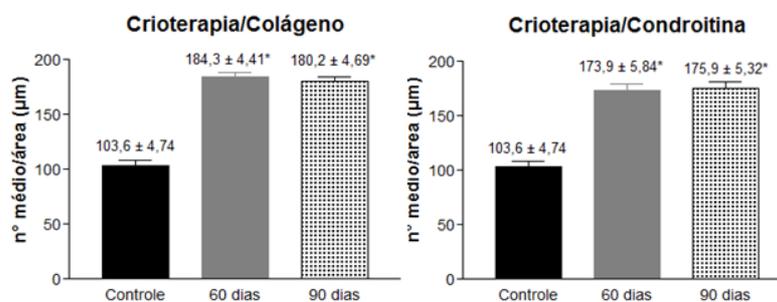


Figura 2: Comparação dos resultados do colágeno e do sulfato de condroitina entre os grupos controle e os grupos onde foram utilizados Crioterapia nos períodos de 60 e 90 dias. Média/área celular (µm).

Teste U de Mann Whitney.

Diferença estatisticamente significante p-valor $\leq 0,05\%$.

As figuras a seguir apresentam uma comparação dos efeitos do Ultrassom e do gelo em relação ao grupo controle na distribuição por área do colágeno e do sulfato de condroitina entre 60 e 90 dias de tratamento. Na figura 3, analisando isoladamente o grupo de coelhos que utilizou o UST, há um aumento significativo do colágeno nas áreas média e superficial da cartilagem e um leve declínio correspondente a área de condroitina. Porém, verifica-se (seta) grande migração do sulfato de condroitina para a superfície da cartilagem (F). Comparado ao grupo controle, o aumento do colágeno também é significativo apresentando um número médio por área maior ($164,1 \pm 11,10 \mu\text{m}$).

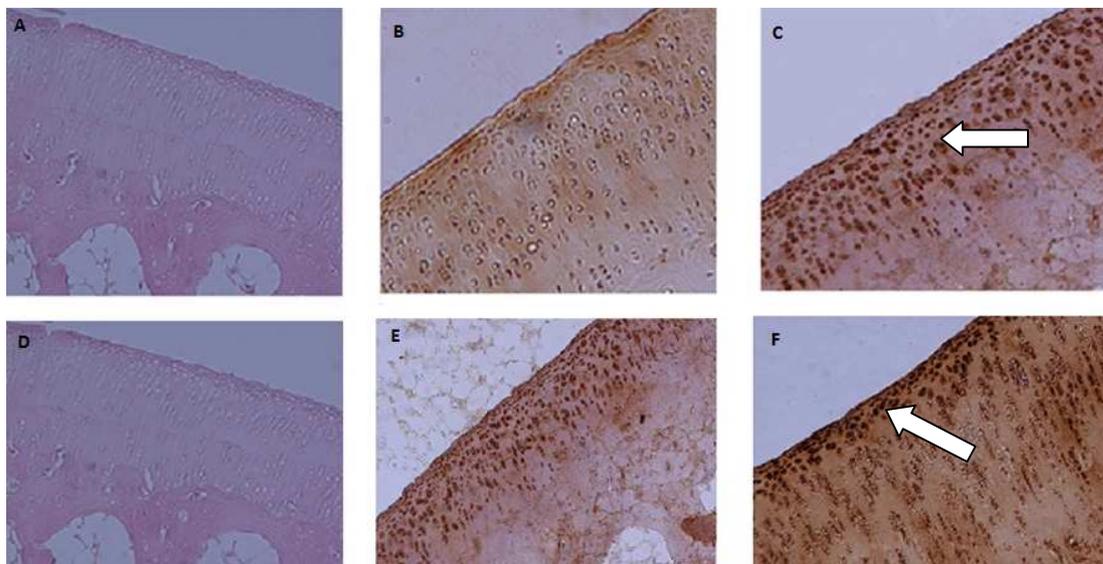


Figura 3. Exame histológico da cartilagem de coelhos. Todas as amostras foram tratadas com ultrassom terapêutico. A e D= controle. B = colágeno 60 dias de tratamento. C = colágeno 90 dias de tratamento. E =condroitina 60 dias de tratamento. F = condroitina 90 dias de tratamento. Notar em “C”(seta) a distribuição do colágeno na superfície e camada média da cartilagem. Notar em “F” (seta) a maior tendência da condroitina em se aglomerar na superfície da cartilagem. (X 100)

Na figura 4, verifica-se a área do colágeno e de condroitina no grupo tratado com gelo. Observou-se diminuição na área do colágeno (de 184,3 μm para 180,2 μm), porém, do ponto de vista histológico, não se verificam alterações evidentes em relação à distribuição do colágeno e da condroitina nas cartilagens estudadas. Desta forma, a figura 4 demonstra ausência de mudanças em relação ao tratamento com gelo.

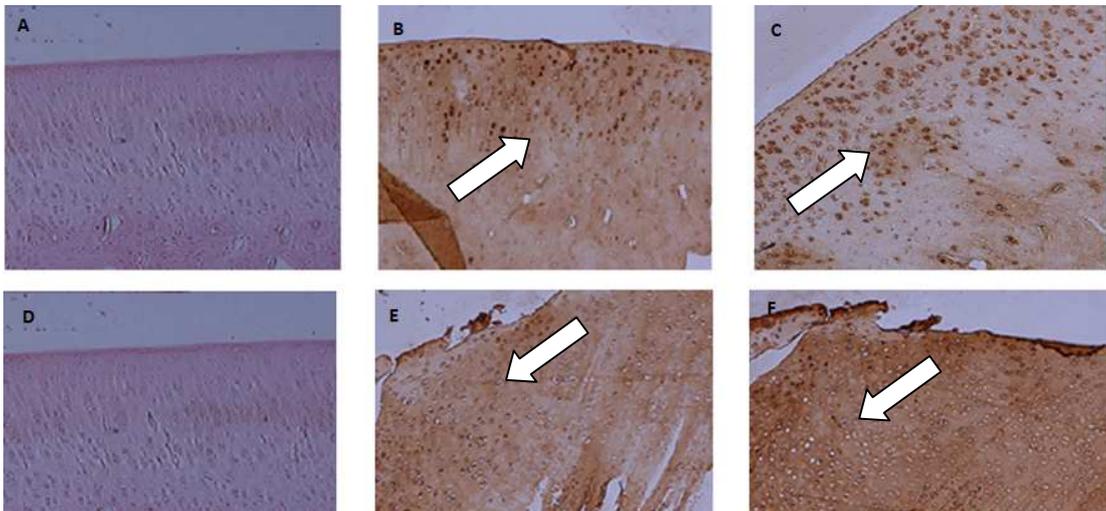


Figura 4. Exame histológico da cartilagem de coelhos. Todas as amostras foram tratadas com 20m de crioterapia 3x semana (Gelo). A e D= controle. B = colágeno 60 dias de tratamento. C =colágeno 90 dias de tratamento. E =condroitina 60 dias. F = condroitina 90 dias de tratamento. Notar em “B e C”(setas) a mesma distribuição irregular do colágeno em toda cartilagem. Notar em “E e F” (setas) a ausência de mudança da condroitina na cartilagem após o tratamento com gelo. (X 100)

DISCUSSÃO

Segundo os estudos de Petit (2011), compreende-se que a autoregulação da expressão do sinal para a síntese do colágeno depende das alterações fenóticas do condrócito principalmente da sua transição da fase pré para a fase hipertrófica após o qual há uma diminuição do colágeno tipo II e o aumento da mineralização celular cartilaginosa. Contudo, o aumento do colágeno observado no grupo de coelhos onde foi aplicado o UST entre 60 ($75,27 \pm 4,42$) e 90 ($164,1 \pm 11,10$) dias pode ser explicado através da biomodulação, pois, por meio da bioestimulação pode-se aumentar o metabolismo celular dos condrócitos da cartilagem e o conteúdo das substâncias químicas que são importantes para manter em equilíbrio o sistema de proteção mecânica da cartilagem articular (Rosa *et al*, 2003). Seguindo este raciocínio, para Fréz (2006) o ultrassom terapêutico, como parte da modalidade termoterapêutica, destaca-se nos processos de cicatrização em lesões de tecidos moles resultando no aumento da síntese de colágeno e na estimulação da secreção de matriz celular. O aumento da área do colágeno na superfície da cartilagem tratada com ultrassom, observado na figura 1C, evidencia bem, o estímulo dos condrócitos na reposição do colágeno nesta região, com a finalidade de proteção articular.

Bioefeitos térmicos do ultrassom

A elevação de temperatura local causada pelo UST varia de acordo com as propriedades dos tecidos que são tratados. Seus efeitos térmicos dependem do coeficiente de absorção do tecido, a densidade, a perfusão, duração de pulso além da frequência de repetição do pulso. Uma propriedade fundamental do UST, é que ele tem a capacidade de aquecer os tecidos de forma focal, ou seja, ocorre o aquecimento apenas no local tratado, evitando assim, dissipação sistêmica do calor, ativando de forma inadequada os mecanismos fisiológicos de termorregulação. Os fatores que afetam o aumento da temperatura dos tecidos incluem o campo de aplicação, as características dos tecidos envolvidos, condutividade térmica do tecido e a irrigação sanguínea do local a ser tratado (TONOMURA *et al*, 2008). Os tecidos que são pobres em vascularização (p.ex. tendão e gordura), e em tecidos que conduzem o calor (osso), tem maior aumento da temperatura quando submetidos ao UST, (KUMAGAI, K, 2012). Os tecidos adjacentes aos ossos são particularmente susceptíveis ao aumento do calor por condução. O poder de absorção de calor pelos tecidos está diretamente relacionado com o teor de proteínas presente nos tecidos. O colágeno, por sua vez, tem elevada capacidade de absorção do calor, sendo portanto, um dos componentes mais estimulados com a aplicação do UST, (WU, J, 2008).

Ainda referente ao grupo ultrassom, houve um decréscimo do sulfato de condroitina comparando os 60 dias de tratamento ($76,59 \pm 4,14$) com os 90 dias finais de terapia ($74,07 \pm 4,91$). Resultados semelhantes aos efeitos do UST foram relatados por Martins

(2011) em um modelo experimental de ratos onde concluíram que o ultrassom pulsado de baixa intensidade (PLIUS) pode ser benéfico na regeneração da cartilagem tanto *in vivo* ou como parte de um tecido *in vitro*, acreditando-se que as ondas produzidas possa ter um efeito direto sobre a mecânica das células expostas. Porém as análises sobre a influência do PLIUS na síntese e elaboração de Glicoaminoglicanos com diferentes intensidades sugeriram que o PLIUS possua um potencial limitado para fornecer um método eficaz na produção de matriz como parte de uma estratégia de engenharia de tecidos para reparação de cartilagens.

Os resultados do presente estudo identificaram a manutenção do colágeno e da condroitina na cartilagem com a aplicação das compressas de gelo no joelho dos coelhos. Estes resultados são corroborados com diversos estudos clínicos que demonstram os efeitos da crioterapia sobre a cartilagem na diminuição da temperatura intrarticular e das atividades enzimáticas permitindo, apesar do fornecimento reduzido de oxigênio, que as células em torno de uma lesão direta possam sobreviver, mostrando ser um fator determinante na manutenção da área dos componentes cartilagosos estudados, prevenindo os efeitos da hemoartrose e da sinovite secundárias a OA. Martin (2002) coaduna com essas reflexões. A hemoartrose sabidamente é precursora de mediadores inflamatórios aumentando potencialmente a temperatura intra-articular.

Atualmente, Petit (2011) entre outros colaboradores, verificou a utilização do nitrogênio rico em etileno plasma-polimerizado para a inibição da hipertrofia bem como da osteogênese de pacientes com OA tratados com células tronco mesenquimais. Porém, salientamos que a utilização do nitrogênio nesta técnica depende principalmente da diminuição da temperatura intra-articular. Diante disso, os autores do presente estudo acreditam que estes efeitos poderiam ser incrementados com a utilização da crioterapia diminuindo drasticamente os custos da aplicação do nitrogênio.

Além disso, segundo Glenn (2004) a crioterapia previne a degeneração e a destruição do sulfato de condroitina através da manutenção da pressão octahédrica impedindo, desta forma, os efeitos compressivos deletérios da cartilagem e otimizando a habilidade das proteoglicanas em potencializar sua função hidrofílica diminuindo a dor, a hipóxia secundária e o derrame articular.

CONCLUSÃO

- O calor (UST) aumenta a produção da área do colágeno na superfície da cartilagem com AO com 90 dias de tratamento.

- O frio preserva a área do sulfato de condroitina (proteoglicanas) da cartilagem.

- A utilização da crioterapia deve ser estimulada entre o início do tratamento e os primeiros 60 dias na AO.

- Após 60 dias a utilização do calor deve ser preconizada.

REFERÊNCIAS

1. BANFI, G; LOMBARDI, G; COLOMBINI, A; MELEGATI, G. Whole-body cryotherapy in athletes. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 40(6), 509-17, 2010.
2. BANFI G, MELEGATI G, BARASSI A, DOGLIOTTI G, MELZI D'ERIL G, DUGUÉ B, CORSI MM. Effects of whole-body cryotherapy on serum mediators of inflammation and serum muscle enzymes in athletes. *Thermal Biol* 2009.
3. BANFI G, DI GAETANO N, SIMON LOPEZ R, MELEGATI G. Decreased mean sphered cell volume values in top-level rugby players are related to the intravascular hemolysis induced by exercise. *Lab Hematol*. 13:103-7, 2007.
4. BLEAKLEY, C.; MCDONOUGH, S.; MACAULEY, D. The use of ice in the treatment of acute soft-tissue injury: a systematic review of randomized controlled trials. *Am J Sports Med*, Antrim, Ireland, v. 32, n. 1, p. 251-261, Jan. 2004.
5. BROSSEAU, L.; YONGE K. A.; ROBINSON V.; MARCHAND S.; JUDD M.; WELLS G.; TUGWELL P. Termoterapia para el tratamiento de la osteoartritis (Cochrane Review). In: *The Cochrane Library*, n. 1, Oxford: Update Software, 2006.
6. FANG, L.I; HUNG, C., WU, S., FANG, S., STOCKER, J. The effects of cryotherapy in relieving postarthroscopy pain. *Journal of Clinical Nursing*, 21,636-643, 2012.
7. FELICE, T. D.; SANTANA, L. R. Recursos fisioterapêuticos (Crioterapia e Termoterapia) na espasticidade: revisão de literatura. *Rev Neurocienc*, Dourados, MS, v. 17, n. 1, p. 57-62, 2009.
8. FERNANDA G J, NILTON M, VANESSA V MR, ANITA S L L, CLÁUDIO H B. O ultrassom terapêutico na medula espinhal acelera a regeneração do nervo ciático de ratos. *Acta Ortop Bras*. 19(4): 213-8, 2011.
9. FRÉZ, A. R.; ARIZA, D.; FERREIRA, J. R. L.; ALVES, E. P. B.; BREDA, G. R.; CENTENARO, L. A.; UEDA, T. K.; BERTOLINI, G. R. F. Efeito do ultrassom terapêutico contínuo em placas epifisárias de coelhos. *Rev Bras Med Esporte*, Cascavel, PR, v. 12, n. 3, p. 150-152, Mai/Jun. 2006.
10. GLENN, J. R. E.; SPINDLER, K. P.; WARREN, T. A.; MCCARTY, E. C.; SECIC, M. Cryotherapy Decreases Intraarticular Temperature after ACL

- Reconstruction. *Clin Orthop Relat Res.*, Nashville, USA, v. 421, p. 268-272, Apr. 2004.
11. KENJI, A. T.; TONOMURA, H.; ARAI, Y.; TERAUCHI, R.; HONJO, K.; HIRAOAKA, N.; HOJO, T.; KUNITOMO, T.; KUBO, T.; Hyperthermia for the treatment of articular cartilage with osteoarthritis. *Int. J. Hyperthermia*, Kyoto, Japan, v. 25, n. 8, p. 661–667, Dec. 2009.
 12. MAES M, COOREMAN E, DELANGHE J, SCHOUPE S, WAUTERS A, NEELS H, et al. Components of biological variation in plasma haptoglobin: relationship to plasma fibrinogen and immune variables, including interleukin-6 and its receptor. *Clin Chim Acta.* 239:23-35, 1995.
 13. MARTIN, S. S.; SPINDLER, K. P.; TARTER, J. W.; DETWILER, K. B. Does Cryotherapy Affect Intraarticular Temperature After Knee Arthroscopy? *Clin Orthop Relat Res.*, Nashville, USA, v. 400, p. 184–189, July 2002.
 14. MARTINS, M.; ANTONIO L. M. M. F.; COSTA, C. L. S.; COELHO, N. P. M. F.; COSTA, M. S.; CARVALHO, L. A. Ação anti-inflamatória da fração lipídica do ovisaries associado ao ultrassom terapêutico em modelo experimental de tendinite em ratos (*Rattus norvegicus*). *Rev Bras Fisioter*, São Carlos, v. 15, n. 4, p. 297-302, Jul./Ago. 2011.
 15. MASOUD, I.; SHAPIRO, F.; KENT, R.; MOSES, A. A longitudinal study of the growth of the New Zealand white rabbit: cumulative and biweekly incremental growth rates for body length, body weight, femoral length and tibial length. *J Orthop Res*, v. 4, n. 2, p. 221-231, 1986.
 16. PESSINA, A. L.; VOLPON, J. B. Aplicação de ultrassom terapêutico na cartilagem de crescimento do coelho. *Rev Bras Ortop*, Ribeirão Preto, SP, v. 34, n. 5, p. 347-54, Maio 1999.
 17. PETER, W. F. H.; JANSEN, M. J.; HURKMANS, E. J.; BLOO, H.; DEKKER-BAKKER, L. M. M. C. J.; DILLING, R. G.; Physiotherapy in hip and knee osteoarthritis: development of a practice guideline concerning initial assessment, treatment and evaluation. *Órgão oficial da sociedade portuguesa de reumatologia - acta reumatol port.* v. 36, n. 3, p. 268-281, Jul/Sept. 2011.
 18. PETIT, A.; DEMERS C. N.; LAURIAULT, P. L. G.; STACHURA, D.; WERTHEIMER, M. R.; ANTONIOU, J.; MWALE, F. Effect of nitrogen-rich cell culture surfaces on type X collagen expression by bovine growth plate

- chondrocytes. *Biomed Eng Online*, Montreal, Canada, v. 10, n. 4, p. 1-11, Jan. 2011.
19. RIBEIRO, J. L.; CAMANHO, G. L.; TAKITAN, L. C. Estudo macroscópico e histológico de reparos osteocondrais biologicamente aceitáveis. *Acta Ortop Bras*, São Paulo, v. 12, n. 1, p. 16-21, Jan./Mar. 2004.
 20. SAMPAIO, R. F. E.; MANCINI, M. C. Estudos de revisão sistemática: um guia para síntese criteriosa da evidência científica. *Rev bras fisioter*, v. 11, n. 1, p. 83-89, Jan./Fev. 2007.
 21. SILVEIRA, D. W. S.; BOERY, E. M.; OLIVEIRA, R. N. S. Reflexões acerca da crioterapia na fase aguda da artrite reumatóide e suas correlações com a crioglobulinemia. *Rev Saúde Com*, Jequié, BA, v. 2, n. 2, p. 154-156, 2006.
 22. TONOMURA H, TAKAHASHI KA, MAZDA O, ARAI Y, SHIN-YA M, INOUE A, HONJO K, HOJO T, IMANISHI J, KUBO T. Effects of heat stimulation via microwave applicator on cartilage matrix gene and Hsp70 expression in the rabbit knee joint. *J Orthop Res*, p. 26:34–41, 2008.
 23. KUMAGAI, K; TAKEUCHI, R; ISHIKAWA, H; YAMAGUCHI, Y; FUJISAWA, T; KUNIYA, T; TAKAGAWA, S; MUSCHLER, GF ; SAITO, T. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates fracture healing by stimulation of recruitment of both local and circulating osteogenic progenitors. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, Vol.30(9), pp.1516-21, 2012.
 24. WU, J; NYBORG, WL. Ultrasound, cavitation bubbles and their interaction with cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol.60(10), pp.1103-111, 2008.

ARTIGO 3

DISTRIBUTION OF COLLAGEN IN SYNOVIAL CARTILAGE AFTER THE APPLICATION OF CRAMOLL 1,4 ASSOCIATED WITH THERAPEUTIC ULTRASOUND AND CRYOTHERAPY

Maria Tereza dos Santos Correia, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50670-420, Brazil, mtscorreia@gmail.com.

Marcelo Weinstein Teixeira, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Área de Fisiologia, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900 Brazil, Tel: +55 (81) 3302-1390, ext. 218, marceloteixeira@gmail.com.

Aluizio Falcão de Andrade Vanderlei, Centro de Ciências Biológicas e de Saúde – CCBS, Universidade Católica de Pernambuco, Rua Abel de Sá Bezerra Cavalcanti, no. 85, Apt. 202, Casa Amarela, Recife, PE 52051-270 Brazil, Tel.: +55 (81) 2119-4172, aluizio-fisio@hotmail.com.

Ayla Karla Bastos de Souza, Centro de Ciências Biológicas e de Saúde – CCBS, Universidade Católica de Pernambuco, Rua Leonardo da Vinci, Blco 112, Apt. 2102, Imbiribeira, Recife, PE 51190-350 Brazil, Tel.: +55 (81) 3339-4523, aylakarla@hotmail.com.

Author for correspondence:

Paulo Henrique Altran Veiga, Centro de Ciências Biológicas e de Saúde – CCBS, Universidade Católica de Pernambuco, Rua Jose de Holanda, 510, Blco B Apt. 602, Torre, Recife, PE 50710-140 Brazil, Tel.: +55 (81) 9723-4463; paulohveiga@gmail.com.

ABSTRACT

Collagen appears to play an important role in the fixing of proteoglycans and hyaluronic acid in the cell matrix, providing balance in the cartilage framework. Thus, collagen can be a great marker to investigate the process of degeneration of cartilage, as in cases of osteoarthritis. A notable feature of type II collagen is the high content of carbohydrates, which is linked to hydroxylysine residues. The presence of these carbohydrate residues provides type II collagen with biological characteristics similar to lectins. Lectins are proteins able to recognize specific sites and reversibly bind to carbohydrates without changing the covalent structure of the glycosidic bonds of the sites. Cramoll 1,4 has been used therapeutically, inhibiting the inflammatory process and promoting the healing of tissues rich in carbohydrates. These are the main physiological effects of cryotherapy and Therapeutic Ultrasound (UST). However, several inquiries into the effects of these thermal agents in physical therapy treatments are based on empirical data. **OBJECTIVE:** The authors of this study intend to investigate whether the application of Cramoll 1,4, associated with cryotherapy and UST, influences the distribution of collagen in articular cartilage of rabbits. **METHODS:** In this study six (6) male rabbits were used, divided into three groups: a control group; a group with 60 days of therapy (ultrasound and Cramoll) and a group with 90 days of therapy (ice and Cramoll). **RESULTS:** There was an increase in collagen area after 90 days of treatment with ultrasound and Cramoll, with clear migration to the surface of the cartilage in knees of rabbits ($p=0.001^*$). The study demonstrated a decrease in the area of collagen in cartilage of rabbit knees ($p=0.001^*$) after 90 days of treatment with ice and Cramoll. **CONCLUSION:** Treatment with ultrasound and Cramoll increases the collagen area, providing beneficial effects to the knee cartilage of rabbits.

Key-words: Cramoll 1,4; Cryotherapy; Ultrasound; Osteoarthritis; Collagen;

INTRODUCTION

Endochondral ossification contributes to increased length of the long bones during embryo formation, contributing to the growth of the child through the cartilaginous epiphyseal plates (POOLE, 2000; PETIT, 2011). In the proliferation zone of epiphyseal plates, chondrocytes actively divide and synthesize different types of molecules of collagens (type II, IX and XI), in addition to the specific proteoglycans of joint cartilage

(MWALE *et al*, 2002; PETIT, 2011; DENNIS, 2004). In the extracellular matrix is mainly found type II collagen, surrounded by a complex range of proteoglycans, macro sugar molecules, which form a type of firm, very hydrated gel (MWALE F *et al*. 2002). Collagen appears to play an important role in the fixing of proteoglycans and hyaluronic acid in the cell matrix, providing balance to the cartilage framework. NOYORI *et al*, (1998) showed that the type II collagen (CII), protects the cartilage through collagen-anti-antibody bonds. In addition, CII has been widely used as an important marker of cartilage (BILLINGHURST *et al*, 1997; NELSON *et al*, 1998; MATYAS *et al*, 2004). Thus, collagen can be a great marker to investigate the process of degeneration of cartilage, as in cases of osteoarthritis (OA). A notable feature of type II collagen is its high content of carbohydrates, which is linked to hydroxylysine residues (FRANCIS *et al*, 1978). The presence of these carbohydrate residues provides type II collagen with biological characteristics similar to lectins. Lectins are proteins capable of recognizing specific sites and reversibly bind to carbohydrates without changing the covalent structure of the glycosidic bonds of the sites (PEREIRA, 2012). Widely distributed in nature, lectins originate from plants and bacteria that agglutinate cells and precipitate polysaccharides or glycoconjugates (LIENER *et al.*, 1986). Lectins are considered molecules that recognize and decode the information contained in oligosaccharides of the cell surface (PEREIRA, 2012). The seed lectin of *Cratylia mollis* has been widely studied in the Northeast of Brazil. This region is the origin of the Camaratu bean, a leguminous plant known scientifically as *Cratylia mollis*, and from which is purified the lectin Cramoll 1,4 (CORREIA AND COELHO, 1995). Various biological activities have been assigned to different isoforms of lectins of *Cratylia mollis*, of which we can mention: mitogenic activity of lymphocytes (MACIEL *et al*, 2004), adjuvant in cancer therapy (ANDRADE *et al*, 2003; BELTRÃO *et al.*, 1998), immuno-stimulatory activity (MELO *et al*, 2010a; MELO *et al*, 2008b; ANDRADE *et al*, 2011), anti-inflammatory and anthelmintic activity (MELO *et al*, 2011c; FERNANDES, 2010) and in repairing injuries in healthy and immuno-compromised rats (MELO *et al*, 2011b). These studies demonstrate that the Cramoll 1,4 has been used therapeutically, inhibiting the inflammatory process and promoting the healing of tissues rich in carbohydrates. These are the main physiological

effects of Cryotherapy and Therapeutic Ultrasound (UST). Cryotherapy and thermotherapy (UST) have been used as therapeutic modalities that aim to improve the quality of life and well-being of patients with osteoarthritis (OA). However, several inquiries into the effects of these thermal agents in physical therapy treatments are based on empirical data (BLEAKLEY *et al.*, 2004; GLENN JR *et al.*, 2004; SILVEIRA *et al.*, 2006). Given this knowledge, it may be possible to suggest a change from the use of high-cost medications as primary treatment of OA to the use of therapy with application of ice (cryotherapy) and the application of heat (ultrasound), decreasing the high investment of public resources in this very common disease. The authors of this study intend to investigate whether the application of Cramoll 1,4, associated with cryotherapy and UST, influences the distribution of collagen in articular cartilage of rabbits.

METHODOLOGY AND ACTION STRATEGY

The study made use of six (6) male, albino rabbits, of the California breed, weighing between 2.5 to 3.5 Kg, two to three months of age (MASOUD *et al.*, 1986). The rabbits were divided into three groups of two individuals (control, 60 and 90 days) after the withdrawal of the osteochondral knee cylinder to simulate a cartilage defect: a control group (CG) with no therapeutic procedure; a group that received chondroitin sulfate injection, in doses of 0.1 ml/kg of body weight every four days until euthanasia (4CS); and a group that received Cramoll 1,4 (1.0 mg/ml) in doses of 0.1 ml/kg of body weight daily until the day of euthanasia (5CM). Cramoll 1,4 was obtained according to the protocol established by CORREIA AND COELHO (1995). As a pre-anesthetic drug each animal received 0.2 mg/kg of body weight of 1% acepromazine intramuscularly. Anesthesia was performed through intramuscular application of 5% ketamine hydrochloride at a dose of 50 mg/kg of body weight associated with 2% xylazine at a dose of 3 mg/kg. After shaving the surgical area, asepsis, antisepsis and sterile field placement, a medial, parapatellar incision was performed followed by lateral patellar dislocation and arthrotomy. With the knee flexed, the medial femoral condyle was exposed and with the aid of a metal instrument, a defect was produced by removing an

osteocondral cylinder of 3.2 mm/4.0 mm from the right knee. Next, the joint capsule was sutured with 4.0 monofilament nylon thread in separate stitches, the patellar tendon was repositioned and medial retinaculum and skin were closed, also, with 4.0 monofilament nylon thread in separate stitches (CAFALLI et al., 1993; RIBEIRO et al., 2004). In the post-operative period, Rimadyl® injectable solution was administered as an analgesic for all rabbits, subcutaneously at a dosage of 2.2 mg carprofen per kg of body weight once a day for two weeks. Euthanasia was performed of an animal in each group for monitoring of the healing process by immunohistological examination, thirty (30), sixty (60) and ninety (90) days after the surgical procedure. The sacrifices were executed with anesthesia similar to the preoperative one, followed by an intravenous injection of 60 mg/kg of potassium chloride (RIBEIRO et al., 2004).

The knees operated on were removed through osteotomy and carefully examined for macroscopic and microscopic evidence of repair. Samples were made of the materials, and then HE slides made silanized. The preparation of slides for deparaffinization, was performed with xylene baths for 5 min, followed by three series of 10 dips (washings) in xylene. Then, three series of 10 dips in 100% and 70% alcohol, and 10 dips for 2 minutes of immersion in PBS. For antigenic recovery, the samples were immersed in 25 ml of citrate buffer + 250 ml of distilled water, and placed in a T-FAL® 700 steamer for 5 minutes between 95-100°C. Once this was done, the samples were left to sit for 20 min until they reached room temperature. The slides were washed again in PBS twice for 5 min. After this washing, the slides were immersed in 0.3% methanol solution with H₂O₂ (to block endogenous peroxidase) for 20 minutes. Then, another washing in PBS twice for 5 min. A background blocking solution was used to cover the slides for 20 min, and washed in PBS twice for 5 min. The slides were wiped around the tissue and covered with the primary antibody (collagen and chondroitin) and PBS, at a 1/50 µl dilution. After these procedures all the slides were incubated overnight in a moist chamber at 40°C, and washed in PBS twice for 10 min. The blades were wiped around the tissue and Biotinylated Mouse & Rabbit IgG Reagent Linker was used to cover the entire sample material on the slide and left to sit for 1 hour at room temperature. The same procedures

were performed with Streptavidin-Peroxidase Reagent solution. After these reactions, the slides were washed in PBS twice for 10 min and wiped around the tissue. Revelation was done with a 20 μ l DAB chromogenic/1 ml DAB substrate solution, covering all the tissue for 10 min.

All reagents used were from BioSystems, Inc. Photographs were taken with a Nikon camera with digital adapter for DS-Fi1 microscopy, using a SEATECH PC, Intel® Pentium® Dual CPU E2200 GHz, 1.99 GB of RAM with Microsoft Windows XP 2010 operating system. The NIS-Elements F software was used to capture the images.

STATISTICAL ANALYSIS

Continuous variables were presented as mean and standard deviation (descriptive statistical techniques). To test the assumption of normality of variables involved in the study the Kolmogorov-Smirnov test was applied. After confirmation of non-parametricity of the data, the data were compared with the One Way ANOVA Kruskal Wallis test for independent groups. A significance level $p \leq 0.005$ was used. The data were entered in an Excel spreadsheet and the software used to obtain statistical calculations was GraphPad Prism 4®.

RESULTS

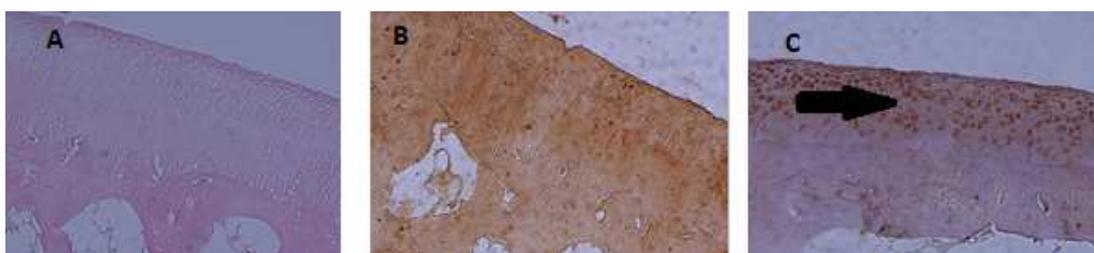


Figure 1. Histological Ultrasound + Cramoll (x100) sections. A. HE Control; B. distribution of collagen after 60 days of treatment; C. distribution of collagen after 90 days of treatment. Observe the distribution of collagen in the cartilage surface (arrow).



Figure 2. Histological Cryotherapy + Cramoll (x100) sections. A. HE Control; B. distribution of collagen after 60 days of treatment; C. distribution of collagen after 90 days of treatment. Observe the distribution of collagen in the cartilage surface (arrow).

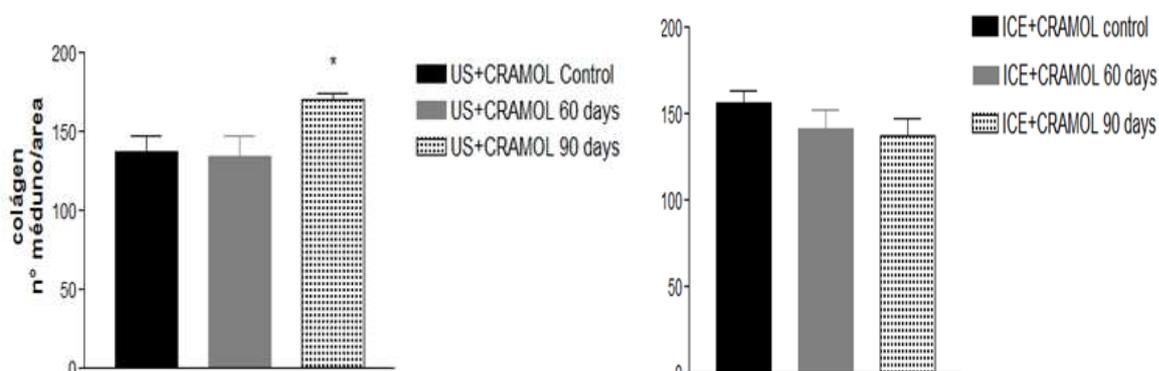


Figure 3. Distribution of collagen in the cartilage surface after application of ultrasound + Cramoll, between 60 and 90 days of treatment. One Way ANOVA, Kruskal Wallis test $p \leq 0.005\%$ *

Figure 4. Distribution of collagen in the cartilage surface after application of ultrasound + Cramoll, between 60 and 90 days of treatment. One Way ANOVA, Kruskal Wallis test $p \leq 0.005\%$ *

DISCUSSION

In the present study, a significant increase was found in the collagen area after 90 days of treatment with ultrasound and Cramoll, with clear migration to the surface of cartilage ($p=0.001^*$). This effect showed that ultrasound stimulated collagen as a protector of cartilage, due to its characteristic of structural maintenance. Cramoll is a lectin isolated from seeds of *Cratylia mollis* (CORREIA, MTS, 1995) of the Leguminosae family that known for its glycoproteins, (SHARON N, 1993; MELO CML, 2010a). Cramoll is involved in many biological activities, such as anti-tumor action, (BELTRÃO EIC 1998), and its specificity is correlated with the lectin Concanavalin A.

There are several reports in the literature about these interactions (MELO CML 2010b; _____2010c). Some authors have used the lectins as models for the study of the molecular basis of protein-carbohydrate interaction (SHARON N, 1995). Another study showed that legume lectins have a high degree of similarity with the primary structure of carbohydrates and also features notable variations in carbohydrate-binding (LIS H, 1998). The use of Cramoll as a chondro-protector is relevant due to the glycoagglutinating effect already known for lectins. Leticans are part of a large family of proteoglycans of chondroitin sulfate (RUOSLAHTI, E, 1996), characterized by the presence of a C-domain type lectin and its core proteins. The domains of globular, C-terminal lecticans consist of one or two epidermal growth factors (EGF), a C-type lectin domain and a domain of a complementary regulator protein (CRP) (RYU MIURA, 1999). This arrangement of lecticans suggests that they are involved in the recognition of carbohydrate bonds. In this way, Cramoll, which is a lectin, seems to recognize the proteoglycans present in cartilage, rich in carbohydrates, like any glycoprotein. A notable feature of type II collagen is its high content of carbohydrates, which is linked to hydroxylysine residues (FRANCIS *et al*, 1978). Probably these terminals were the site of aggregation stimulated by Cramoll 1,4.

Currently, UST has long been used in bone healing. In a study using rats genetically marked with a green fluorescent protein, a transverse femoral fracture was performed in the hind limbs. The fracture site was exposed to low-intensity pulsed ultrasound (low-intensity pulsed ultrasound-LIPUS) daily in the treatment group. Radiological assessment showed that the area of bone callus (mature bone) was significantly larger in the LIPUS group than in the control group at 2 and 4 weeks after fracture. Histomorphometric analysis of the site of the fracture showed a significant increase of marked bone cells (green fluorescent protein-GFP) in the LIPUS group after 2 weeks of treatment, in comparison with the control group. The LIPUS group exhibited a significantly higher percentage of GFP cells expressing alkaline phosphatase (GFP / AP) than the control group 2 weeks after fracture. These data indicate that LIPUS induced ossification by means of circulating osteogenic progenitor cells at the fracture site (KUMAGAI, K *et al* 2012).

Local temperature elevation caused by UST varies according to the properties of the tissues that are treated. Their thermal effects depend on the tissue absorption coefficient, its density, perfusion, pulse duration and pulse repetition frequency. A fundamental property of UST is that it has the ability to locally heat tissues, that is, heating occurs only in the local being treated, thus avoiding systemic heat dissipation, which would result in inappropriate activation of the physiological mechanisms of thermoregulation. The factors that affect temperature rise of the tissue include the application field, the characteristics of the tissues involved, thermal conductivity of the tissue and the blood supply of the site being treated (TONOMURA *et al*, 2008). Tissues that are poor in vascularization (e.g. tendons and fat), and in tissues that conduct heat (bone) have greater temperature increase when submitted to the UST (KUMAGAI, K, 2012). The tissues adjacent to bones are particularly susceptible to increased heat by conduction. The power of heat absorption by the tissues is directly related to the protein content present in the tissues. Collagen, in turn, has high heat absorption capacity, therefore, it is one of the components most stimulated with the application of UST (WU, J, 2008).

In regard to the use of cryotherapy and Cramoll, the study demonstrated a decrease in collagen area in the cartilage ($p=0.001^*$). The most relevant effects of cryotherapy on tissues are mainly the reduction of secondary hypoxia, reduced tissue metabolism, therefore reducing swelling and inflammation and restricting the release of pro-inflammatory mediators (BANFI G, *et al*, 2010). From the biophysical point of view, cryotherapy seems to play an important role in the inhibition of protein synthesis, as well as in preventing the normal operation of the transmission of cellular sodium and potassium. These changes may explain the decrease in the area of collagen in the cartilage of the present study. These effects can be larger or smaller, according to the layer of fat at the site of application of cryotherapy (JUTTE LS, *et al*, 2012).

CONCLUSION

In the present study, an increase in the collagen area was found after 90 days of treatment with ultrasound and Cramoll, with clear migration to the surface of the knee cartilage of rabbits ($p=0.001^*$).

The study demonstrated a decrease in the area of collagen in knee cartilage of rabbits ($p=0.001^*$) after 90 days of treatment with ice and Cramoll.

LITERATURE REFERENCES

ANDRADE, C.A.S.; MAGALHÃES, N.S.S. Atividade antitumoral de lectina de *Cratylia mollis* encapsulada em lipossomas. 2003.62 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências Biológicas, UFPE, Recife. 2003.

ANDRADE, CAS; OLIVEIRA, HP; OLIVEIRA, MDL; CORREIA MTS; COELHO, LCBB; MELO, CP. Protein unfolding studied by fluorescence methods and electrical impedance spectroscopy: the cases of *Cratylia mollis* and Concanavalin A. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, v. 88, p. 100-107, 2011.

BANFI, G; LOMBARDI, G; COLOMBINI, A; MELEGATI, G. Whole-body cryotherapy in athletes. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 40(6), 509-17, 2010.

BELTRÃO EIC, CORREIA MTS, SILVA FF, COELHO LCBB. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1998. 74, 125–134.

BLEAKLEY C, MCDONOUGH S, MACAULEY D. The use of ice in the treatment of acute soft-tissue injury: a systematic review of randomized controlled trials. *Am J Sports Med* 2004; 32: 251-261.

BILLINGHURST, R.C.; DAHLBERG, L; IONESCU, M. Reiner A, Bourne R, Rorabeck C, et al. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest.* 99:1534–45. 1997.

CAFALLI FAZ; BORELLI V; HOLZCHUH MP; FARIAS EC; CIPOLA WWV; NETO ACC; LIVANI B; XAVIER CRM. Estudo experimental dos efeitos da radiação laser de baixa energia na regeneração osteocartilágnea em joelhos de coelhos: Aspectos histológicos. *Rev Bras Ortop* 1993, 28(9): 673-678.

- CORREIA, M.T.S., COELHO, L.C.B.B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1995. 55, 261–273.
- DENNIS, R.C; GARY, S.B; MARCY W. et al. The Mechanobiology of Articular Cartilage Development and Degeneration. *Clinical orthopaedics and related research*, 427, 69–77, 2004.
- FERNANDES, M.P.; INADA, N.M.; CHIARATTI, M.R.; ARAÚJO, F.F.B.; MEIRELLES, F.V.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; ALVES, M.J.M.; GADELHA, F.R.; VERCESI, A.E. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by *Cratylia mollis* seed lectin. *J. Bioenerg. Biomembr.* 42, 69–78, 2010.
- FRANCIS G; BUTLER, W.T; FINCH, J.E. The Covalent Structure of Cartilage Collagen. Amino acid sequence of residues 552-661 of bovine α (ii) chains. *Biochem. J.* 175: 921-930 1978.
- GLENN JR RE, SPINDLER KP, WARREN TA, MCCARTY EC. SECIC M. Cryotherapy Decreases Intraarticular Temperature after ACL Reconstruction. *Clin Orthop Related Research* 2004; 421: 268–272.
- JUTTE LS, HAWKINS J, MILLER KC, LONG BC, KNIGHT KL. Skinfold thickness at 8 common cryotherapy sites in various athletic populations. *Am J Physiol Train.* 2012 Mar-Apr;47(2):170-7.
- KUMAGAI, K; TAKEUCHI, R; ISHIKAWA, H; YAMAGUCHI, Y; FUJISAWA, T; KUNIYA, T; TAKAGAWA, S; MUSCHLER, GF ; SAITO, T. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates fracture healing by stimulation of recruitment of both local and circulating osteogenic progenitors. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 2012, Vol.30(9), pp.1516-21.
- LIENER, I.E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I.J. PREFACE IN: I.E. LIENER, N. SHARON AND I.J. GOLDSTEIN (Eds.), *The lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine*. Academic Press, Orlando, FL, pp. xi-vv, 1986.
- LIS H, SHARON N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition, *Chem. Rev.* 1998. 98, 637–674.
- MACIEL EVM, ARAÚJO-FILHO VS, NAKAZAWA M, GOMES YM, COELHO LCBB, CORREIA MTS. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals.* 2004; 32: 57–60.

MASOUD, I; SHAPIRO, F; KENT, R; MOSES, A. A longitudinal study of the growth of the New Zealand white rabbit: cumulative and biweekly incremental growth rates for body length, body weight, femoral length and tibial length. *J Orthop Res* 1986, 4: 221-231.

MATYAS, J.R.; ATLEY, L.; IONESCU, M.; EYRE, D.R.; POOLE, A.R. Analysis of Cartilage Biomarkers in the Early Phases of Canine Experimental Osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 50(2):543–552. 2004.

MELO, C.M.L., CASTRO, M.C.A.B., OLIVEIRA, A.P., GOMES, F.O.S., PEREIRA, V.R.A., CORREIA, M.T.S., COELHO, L.C.B.B., PAIVA, P.M.G. Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes. *Phytother. Res.* 2010a. 24, 000–10.

MELO, C.M.L., MELO, H., CORREIA, M.T.S., COELHO, L.C.B.B., SILVA, M.B., PEREIRA, V.R.A. Mitogenic response and cytokine production induced by cramoll 1,4 lectin in splenocytes of inoculated mice. *Scand. J. Immunol.* 2010c, 73, 112–121.

MELO, C.M.L., PAIM, B.A., ZECCHIN, K.G., MORARI, J., CHIARRATI, M.R., CORREIA, M.T.S., COELHO, L.C.B.B., PAIVA, P.M.G. Cramoll 1,4 lectin increases ROS production, calcium levels and cytokine expression in treated spleen cells of rats. *Mol. Cell. Biochem.* 2010b. 339.

MELO, CML; PORTO CS; MELO, JMR; MENDES CM; CAVALCANTI CCB; BREITENBAC LC; COELHO B; PORTO ALF; LEÃO AMAC; CORREIA MTS. Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. *International Journal of Pharmaceutics* 408 (2011) 113–119.

NELSON, F.; DAHLBERG, L.; LAVERTY, S.; REINER, A.; PIDOUX, I.; IONESCU, M. et al. Evidence for altered synthesis of type II collagen in patients with osteoarthritis. *J Clin Invest.* 102:2115–25. 1998.

NOYORI, K.; TAKAGI, T.; JASIN, H.E. Characterization of the macromolecular components of the articular cartilage surface. *Rheumatol Int.* 18:71–77. 1998.

PEREIRA, D.S.T.; CORREIA, M.T.S.; CARNEIRO-LEÃO, A.M.A. Avaliação da eficácia do Hidrogel de Cramol 1,4 irradiado no reparo tecidual de queimaduras térmicas de segundo grau. 2012 f. Thesis (Doctorate in Biological Sciences) - Centro de Ciências Biológicas, UFPE, Recife. 2012.

POOLE, A.R.; LAVERTY, S.; MWALE, F. Endochondral bone formation and development in the axial and appendicular skeleton. In *The osteoporosis primer* Edited by: Press CU. 3-17. 2000.

PETIT, T. *BioMedical Engineering OnLine*. 10:4. 2011.

RIBEIRO, JL; CAMANHO, GL; TAKITAN, LC. Estudo macroscópico e histológico de reparos osteocondrais biologicamente aceitáveis. *Acta Ortop Bras* 2004, 12(1):17-21.

RUOSLAHTI, E. (1996) *Glycobiology* 6, 489–492.

RYU MIURA, ANDERS ASPBERG, IRYNA M. ETHELL, KAZUKI HAGIHARA, RONALD L. SCHNAAR, ERKKI RUOSLAHTI, AND YU YAMAGUCHI. The Proteoglycan Lectin Domain Binds Sulfated Cell Surface Glycolipids and Promotes Cell Adhesion. *The journal of biological chemistry*. 1999, Vol. 274(16), 11431–11438.

SHARON N. Lectin carbohydrate complexes of plants and animals – an atomic view, *Trends Biochem. Sci.*1993. 18.,221–226.

SHARON N, LIS H. Lectins – proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition, *Essays Biochem.* 1995.30, 59–75.

SILVA, MCC; SANTANA, LA; SILVA-LUCCA, RA; LIMA, AML; FERREIRA, JG; PAIVA, PMG; COELHO, LCBB; OLIVA, MLV; ZINGALI, RB; CORREIA MTS. Immobilized *Cratylia mollis* lectin: An affinity matrix to purify a soybean (*Glycine max*) seed protein with in vitro platelet antiaggregation and anticoagulant activities. *Process Biochemistry* 46 (2011) 74–80.

SILVEIRA DWS, BOERY EM, OLIVEIRA RNS. Reflexões acerca da crioterapia na fase aguda da artrite reumatóide e suas correlações com a crioglobulinemia. *Rev Saúde Com* 2006; 2(2): 154-156.

TONOMURA H, TAKAHASHI KA, MAZDA O, ARAI Y, SHIN-YA M, INOUE A, HONJO K, HOJO T, IMANISHI J, KUBO T. Effects of heat stimulation via microwave applicator on cartilage matrix gene and Hsp70 expression in the rabbit knee joint. *J Orthop Res* 2008; 26:34–41.

MWALE, F.; TCHETINA, E.; WU, C.W.; POOLE, A.R.: The assembly and remodeling of the extracellular matrix in the growth plate in relationship to mineral deposition and cellular hypertrophy: an in situ study of collagens II and IX and proteoglycan. *J Bone Miner Res* 17:275-28. 2002.

WU, J; NYBORG, WL. Ultrasound, cavitation bubbles and their interaction with cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, Vol.60(10), pp.1103-111.

CONCLUSÕES DA TESE

- ✓ Quando comparados os resultados do uso de UST com condroton ® ($p = 0,0251^*$) e UST com Cramoll 1,4 ($p = 0,0414^*$), os autores verificaram aumento da área de sulfato de condroitina em ambos os grupos, mas o aumento foi maior no grupo tratado com Cramoll 1,4.
- ✓ O uso de crioterapia concomitantemente com condroton ® ou Cramoll 1,4 não revelou nenhuma diferença no estudo em comparação com os efeitos de tratamento entre 60 e 90 dias.
- ✓ A utilização de Cramoll 1,4 aumentou a área de sulfato de condroitina ($p = 0,0001^*$) na osteoartrite de cartilagem do joelho de coelho, a 60 e 90 dias de tratamento, em comparação com o grupo controle.
- ✓ Observou-se aumento da área de colágeno, com a utilização de condroton ® aos 60 dias de tratamento ($p = 0,0001^*$), mas diminuindo a sua área dentro de 90 dias.
- ✓ O calor (UST) aumenta a produção da área do colágeno na superfície da cartilagem com AO com 90 dias de tratamento.
- ✓ O frio preserva a área do sulfato de condroitina (proteoglicanas) da cartilagem.
- ✓ A utilização da crioterapia deve ser estimulada entre o início do tratamento e os primeiros 60 dias na AO.
- ✓ Após 60 dias a utilização do calor deve ser preconizada.
- ✓ No presente estudo, um aumento na área de colágeno foi encontrado após 90 dias de tratamento com UST e Cramoll, com clara migração para a superfície da cartilagem do joelho de coelhos ($p = 0,001^*$).
- ✓ O estudo demonstrou uma diminuição da área de colágeno na cartilagem do joelho de coelhos ($p = 0,001^*$) após 90 dias de tratamento com gelo e Cramoll.