

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**SULFATO DE CONDROITINA: DA MATÉRIA-PRIMA À TERAPÊUTICA**

Elaborado por: Caetano Vaz dos Santos  
Acadêmico da Faculdade de Veterinária

**PORTO ALEGRE**

**2009/2**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**SULFATO DE CONDROITINA: DA MATÉRIA-PRIMA À TERAPÊUTICA**

**Autor: Caetano Vaz dos Santos**

**Monografia apresentada à  
Faculdade de Veterinária como  
requisito parcial para obtenção da  
Graduação em Medicina  
Veterinária.**

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo  
Meller Alievi**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliane  
Dallegrave**

**PORTO ALEGRE**

**2009/2**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**SULFATO DE CONDROITINA: DA MATÉRIA-PRIMA A TERAPÊUTICA**

Nome do Autor: Caetano Vaz dos Santos

**Monografia apresentada à Faculdade de Veterinária como requisito parcial para  
obtenção da Graduação em Medicina Veterinária**

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Meller Alievi

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliane Dallegrave

Aprovada por:

Prof. \_\_\_\_\_

( )

Prof. \_\_\_\_\_

( )

**PORTO ALEGRE**

**2009/02**

## RESUMO

Os avanços tecnológicos e científicos das últimas décadas influenciaram o aumento da longevidade tanto da população humana quanto dos animais de companhia. Este aumento da longevidade trouxe como consequência a maior incidência de doenças degenerativas relacionadas à idade. Entre estas doenças destaca-se a osteoartrose e entre as opções terapêuticas da osteoartrose, o fármaco que tem apresentado melhores resultados é o sulfato de condroitina. Outro ramo da medicina que já utiliza o sulfato de condroitina é a oftalmologia, como cicatrizante e lubrificante ocular, meio de conservação de córneas explantadas e como substância viscoelástica para uso cirúrgico. O Sulfato de Condroitina é uma glicosaminoglicana presente na substância fundamental dos tecidos conjuntivos de vertebrados, principalmente nas cartilagens. As principais fontes deste medicamento são tecidos cartilagosos de animais de açougue, especialmente bovinos, suínos e aves. O Brasil, devido à grande quantidade de animais abatidos, é um grande exportador de matéria-prima para fabricação do sulfato de condroitina. Há muito tem se estudado novas possibilidades terapêuticas destas moléculas na medicina humana e veterinária com resultados bastante promissores: revestimento de formas farmacêuticas, tratamento de tendinites, reparação óssea, colapso traqueal em cães, além de inibição de crescimento de células tumorais e atividade antioxidante.

Palavras chaves: tecido cartilagosos - sulfato de condroitina – osteoartrose

## ABSTRACT

*The scientific and technological advances of recent decades have influenced the increased longevity of both the human population and the pets. This increase in longevity has brought as consequence a higher incidence of degenerative diseases related to age. Among these diseases stands between osteoarthritis and treatment options of osteoarthritis, the drug that has shown better results is the chondroitin sulfate. Another branch of medicine that already use chondroitin sulfate is ophthalmology, as wound healing and ocular lubricant, method of preservation of explanted corneas and viscoelastic substance for surgical use. The chondroitin sulfate is a glycosaminoglycan present in the ground substance of connective tissue of vertebrates, especially in cartilage. The main sources of this product are cartilaginous tissues of animal butchery, especially cattle, pigs and poultry. Brazil, due to the large number of slaughtered animals, is a major exporter of raw materials for the production of chondroitin sulfate. It has long been studying new therapeutic possibilities of these molecules in human and veterinary medicine with very promising results: coating dosage forms, treatment of tendinitis, bone repair, tracheal collapse in dogs, and inhibition of tumor cell growth and antioxidant activity.*

*Key words: cartilaginous tissue – chondroitin sulfate – osteoarthritis*

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pag.</b>
<b>Figura 1</b> Estrutura química do sulfato de condroitina	16
<b>Figura 2</b> Laringe suína	18
<b>Figura 3</b> Cartilagem da escápula suína	19
<b>Figura 4</b> Septo nasal bovino	20
<b>Figura 5</b> Extremidade caudal do esterno de frangos de corte.	22
<b>Figura 6</b> Procedimentos gerais para extração e purificação do SC	26
<b>Figura 7</b> Produto final sulfato de condroitina	27
<b>Figura 8</b> Modelo esquemático da estrutura do agregado de proteoglicanas	37
<b>Figura 9</b> Relações entre agregados de proteoglicanas e as fibras colágenas na cartilagem articular	37
<b>Figura 10</b> Análise histológica da patela de animal tratado com SC	47
<b>Figura 11</b> Radiografias do joelho de cão	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABEF: Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frango  
ABIEC: Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne  
ABIPECS: Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína  
AINEs: anti-inflamatórios não esteróides  
ANFAL: Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para Animais  
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
CA: cartilagem articular  
cm: centímetros  
CsCl: cloreto de cálcio  
DAD: doença articular degenerativa  
DEAE: dietilaminoetil  
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético  
FDA: *Food and Drug Administration*  
g: gramas  
GAG: glicosaminoglicana  
h: hora  
HCl: ácido clorídrico  
HS: hialuronato de sódio  
IGF-I: *insulina-like-growth factor-I*  
IL 1: interleucina 1  
IL 6: interleucina 6  
IM: intra-muscular  
IV: intra-venoso  
KCl: cloreto de potássio  
kg: kilogramas  
L: litro  
M: mol  
mg: miligramas  
MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio  
min.: minuto  
MK: McCarey-Kaufman  
ml: mililitros

mm: milímetros

mM: milimol

MMP: metaloprotease

NaBH<sub>4</sub>: boroidreto de sódio

NaCl: cloreto de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

° C: graus Celcius

OA: osteoartrose

p/v: peso/volume

P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: pentóxido de fósforo

pH: potencial de hidrogênio

REG: retículo endoplasmático granular

RNA<sub>m</sub>: ácido ribonuclêico mensageiro

rpm: rotações por minuto

SC: sulfato de condroitina

SD: sulfato de dermatana

SIF: Serviço de Inspeção Federal

SNC: sistema nervosa central

TGF: *transforming growth factor*

TGF-β: *transforming growth factor-β*

TNF-α: fator de necrose tumoral- α

Tris-HCl: Tris-hidroclorato

TRX-20: 3,5 cloridrato de dipentadecicloxibenzamidina

U: unidade

v/v: volume/volume

x g: vezes a aceleração da gravidade

## ÍNDICE

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
2	<b>MATÉRIA-PRIMA DO SULFATO DE CONDROITINA</b> .....	13
2.1	<b>Tecido Conjuntivo e Matriz</b> .....	13
2.1.1	<u>Glicosaminoglicanas</u> .....	13
2.1.2	<u>Proteoglicanas</u> .....	14
2.1.3	<u>Sulfato de Condroitina</u> .....	15
2.2	<b>Estruturas Anatômicas Utilizadas</b> .....	17
2.2.1	Laringe e Traquéia Bovina e Suína.....	17
2.2.2	Cartilagem da Escápula Bovina e Suína.....	19
2.2.3	Septo Nasal Bovino.....	20
2.2.4	Aorta Bovina.....	21
2.2.5	Esterno das Aves.....	21
3	<b>EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DO SULFATO DE CONDROITINA</b> .....	23
3.1	<b>Histórico dos Métodos</b> .....	25
4	<b>PRINCIPAIS APLICAÇÕES DO SULFATO DE CONDROITINA</b> .....	34
4.1	<b>Osteoartrose</b> .....	34
4.1.1	Cartilagem Articular, Envelhecimento e Fisiopatogenia da Osteoartrose.....	36
4.1.2	Mecanismo de Ação do Sulfato de Condroitina na Osteoartrose.....	41
4.1.3	Osteoartrose em cães.....	42
4.1.4	Sulfato de Condroitina na Osteoartrose em Humanos.....	49
4.2	<b>Usos em Oftalmologia</b> .....	51
4.2.1	Ceratoconjuntivite Seca.....	51
4.2.2	Úlcera de Córnea.....	51
4.2.3	Uso Intra-Ocular Cirúrgico.....	53
4.2.4	Conservação de Córneas.....	53
4.3	<b>Outras Aplicações em Medicina Veterinária</b> .....	54
4.3.1	Tendinites em Equinos.....	54
4.3.2	Colapso Traqueal em Cães.....	55
4.4	<b>Perspectivas Futuras</b> .....	56
4.4.1	Reparação Óssea e Cartilagínea.....	56
4.4.2	Revestimento de formas farmacêuticas.....	57

4.4.3	Combate ao Câncer.....	58
4.4.4	Atividade Antioxidante.....	59
5	<b>EFEITOS ADVERSOS</b> .....	60
6	<b>MERCADO</b> .....	62
7	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	63
	REFERÊNCIAS.....	64

## 1 INTRODUÇÃO

O sulfato de condroitina (SC) é uma molécula presente na matriz de tecidos conjuntivos de vertebrados. Muito tem se pesquisado sobre o SC, desde sua biossíntese nos organismos, sua participação em doenças e principalmente suas aplicações terapêuticas. Os recentes avanços tecnológicos impulsionam ainda mais estas pesquisas, trazendo novas descobertas de possíveis aplicações do SC.

A principal aplicação do SC é o tratamento da osteoartrite (OA), doença articular degenerativa, que atinge pessoas e animais, estando relacionada com o envelhecimento. O SC tem mostrado excelentes resultados neste tratamento, devolvendo a qualidade de vida aos portadores da doença.

O fenômeno da longevidade, tanto no Brasil como no mundo inteiro, foi alavancado pelas mudanças no estilo de vida das pessoas. A participação de fatores ambientais, de processos tecnológicos e científicos desenvolvidos na medicina, associados à melhora nas condições socioeconômicas, mesmo nos países em desenvolvimento, são os fatores determinantes do aumento da expectativa de vida.

O aumento acentuado do número de idosos, particularmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil, trouxe diversas consequências para a sociedade. A população idosa brasileira está mais sujeita a problemas de saúde, como enfermidades crônicas que possuem baixa ou nula taxa de mortalidade e alto grau de incapacidade, como é o caso da osteoartrite (OA), onerando ainda mais os orçamentos na área da saúde, já tão carente de recursos (Veras, 1994).

Por volta de 1900, menos de 5% da população chegava aos 65 anos de idade. Atualmente as pessoas com mais de 65 anos contabilizam mais de 12% da população dos EUA (Roach, 2001). Atualmente, a população brasileira com idade igual ou superior a 60 anos é da ordem de 15 milhões de habitantes. A sua participação no total da população nacional dobrou nos últimos 100 anos, passando de 4% em 1900 para 9% em 2000. Projeções recentes indicam que este segmento poderá ser responsável por 15 % da população brasileira no ano de 2020 (Caramano et al., 1997). O último censo populacional (2001) mostrou que os idosos no Brasil, correspondem a 9,1% da população. Segundo Ramos *et al.* (1993), em 2025, o Brasil terá a sexta maior população de idosos do mundo.

O grande desafio atualmente é fazer com que o prolongamento da vida seja acompanhado de melhoria de sua qualidade, autonomia e independência, associados à sabedoria, indicadores essenciais para uma vida saudável e feliz (Néri, 2001).

Outra consequência deste envelhecimento da população foi o aumento de animais domiciliares. Estes idosos, principalmente os de poder aquisitivo mais elevado, buscam nos animais de companhia uma maneira de se ocuparem e se tornarem úteis.

Na última década, o conceito de “pet” ou do animal doméstico, como parte efetiva da família, tornou-se fato no Brasil, por inúmeros fatores. Com a expansão dos grandes centros urbanos, os animais de estimação suprem a carência de companhia das pessoas que vivem em pequenos espaços. Já foi comprovado em estudos científicos que, além de desempenharem um papel importante na qualidade de vida de seus proprietários, eles também podem atuar como apoio em situações tensas e de estresse, como no caso de separações e perdas de pessoas próximas. A importância dessa companhia torna-se mais evidente no relacionamento com as crianças. O toque, o carinho, as brincadeiras e as obrigações com o animal desenvolvem características fundamentais da personalidade infantil, como afeto, confiança e responsabilidade. (PetBR, 2003).

Segundo a Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para Animais (ANFAL), existe atualmente no país cerca de 21 milhões de cães com endereço fixo, a segunda maior população do planeta, atrás apenas dos Estados Unidos. Destes, 34% são alimentados com ração industrializada, um indício dos cuidados diferenciados de que são objetos (Veja On Line, 2003).

Estes cães domésticos também estão se beneficiando dos mesmos fatores ambientais e processos tecnológicos e científicos desenvolvidos na medicina, associados à melhora nas condições socioeconômicas, estando, portanto também atingindo idades mais avançadas e também desenvolvendo doenças degenerativas relacionadas com a idade.

Alternativas terapêuticas para melhorar condições clínicas crônicas associadas à idade avançada, tanto em homens quanto em animais, são hoje objeto de estudo e desenvolvimento, dentre elas, destaca-se o uso do SC na doença articular degenerativa.

Em países asiáticos a principal fonte de SC é a cartilagem de peixes e até répteis, devido aos hábitos alimentares destes povos. Nos países ocidentais, a principal fonte do SC são os tecidos cartilagosos dos animais de açougue, fato que deixa o Brasil em posição de destaque no fornecimento destas matérias-primas para o mundo.

Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC, 2005), o Brasil produz mais de nove milhões de toneladas de carne bovina, ocupando o segundo lugar na produção mundial. Segundo a Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína (ABIPECS, 2006), a produção nacional é de 3,23 milhões de toneladas, sendo o quarto país produtor. Já se tratando de carne de frango, o Brasil produz 9,7

milhões de toneladas, ficando como terceiro maior produtor mundial, segundo dados da Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frango (ABEF, 2007). Estes números mostram a capacidade da indústria frigorífica Brasileira em fornecer os subprodutos do abate destes animais para a fabricação de medicamentos opoterápicos, tanto no mercado interno quanto no mercado externo.

O aproveitamento racional dos subprodutos e resíduos cárneos, além de apresentar importância econômica no custo da carne, é de extrema relevância quanto aos aspectos laboral, ambiental e de saúde pública, pois, se não fossem aproveitados, seriam transformados em poluentes de difícil trato e em focos de disseminação de doenças (Barros e Licco, 2007).

Atualmente, o principal objetivo é converter o máximo de resíduos do abate em subprodutos comercializáveis ou co-produtos, com a finalidade de diminuir o impacto ambiental da indústria da carne e melhorar o rendimento econômico ou, no mínimo, diminuir o custo da gestão dos resíduos (Romy, 2001).

O presente trabalho aborda toda a cadeia produtiva do SC, desde as matérias-primas utilizadas e os métodos de extração e purificação até as principais aplicações terapêuticas e estudos recentes sobre novas possibilidades de uso. No que se refere às aplicações terapêuticas foi dada ênfase à OA, por ser a principal doença tratada com sucesso pelo SC.

## 2 MATÉRIA-PRIMA DO SULFATO DE CONDROITINA

### 2.1 Tecido Conjuntivo e Matriz

A matriz de um tecido conjuntivo é a substância fundamental amorfa e as fibras que preenchem o espaço entre as células. Os componentes da matriz dos tecidos conjuntivos são os constituintes responsáveis pelas propriedades biomecânicas específicas características destes tecidos. No tecido cartilaginoso, as capacidades compressivas e tensoras da cartilagem articular estão relacionadas às GAGs e às fibras colágenas e elásticas que a constituem. A habilidade para reter água (e desse modo resistir a compressão) está relacionada às glicosaminoglicanas (GAGs) da substância fundamental amorfa. As GAGs são polissacarídeos que contêm aminoaçúcares e se complexam às proteínas, formando as proteoglicanas. Numerosas proteoglicanas se complexam com o ácido hialurônico nos tecidos cartilaginosos para formar os agregados de proteoglicanas (Banks, 1998).

#### 2.1.1 Glicosaminoglicanas

A substância fundamental viscosa, semilíquida e gelatinosa da maioria dos tecidos conjuntivos é formada predominantemente por carboidratos denominados de mucopolissacarídeos. Os mucopolissacarídeos sulfatados foram chamados de mucopolissacarídeos ácidos; os mucopolissacarídeos não-sulfatados foram chamados de mucopolissacarídeos neutros (Banks, 1998). Os mucopolissacarídeos sulfatados estão presentes em todas as formas de vida que têm alguma organização celular (Cassaró e Dietrich, 1977).

Os carboidratos predominantes na substância fundamental são chamados de glicosaminoglicanas (GAGs). O termo significa literalmente um aminoaçúcar (glicosamino) polissacarídico (glicana). As GAGs são heteropolissacarídeos aniônicos lineares formados por unidades repetitivas dissacarídicas de alto peso molecular (Lamari e Karamanos, 2006). Um dos monossacarídeos na unidade dissacarídica é um aminoaçúcar – seja a N-acetilglicosamina, seja a N-acetilgalactosamina. Os outros monossacarídeos na unidade repetitiva podem ser, ou um ácido urônico, ou a galactose. As GAGs são um grupo heterogêneo de carboidratos que têm algumas propriedades significantes em comum. Elas são poliânions capazes de reter grande quantidade de água. A unidade repetitiva contém uma hexosamina e estas unidades repetitivas são diferentes nas várias GAGs, caracterizando o tipo de GAG. Todas as GAGs, exceto o ácido hialurônico, estão complexadas a proteínas e a proteoglicanas. As GAGs têm

uma distribuição variável por todo tecido conjuntivo, conforme a Tabela 1. Entre as GAGs incluem-se os seguintes compostos: o ácido hialurônico, a condroitina-4-sulfato, a condroitina-6-sulfato, o queratossulfato, o sulfato de dermatana e a heparina (Banks, 1998).

Tabela 1: Tipo e Distribuição das Glicosaminoglicanas

<b>Tipo</b>	<b>Distribuição</b>
Ácido Hialurônico	Líquido sinovial, cordão umbilical, humor vítreo, tecido conjuntivo frouxo
Condroitina	Córnea
Condroitina-4-sulfato	Cartilagem, osso, córnea, aorta
Condroitina-6-sulfato	Cartilagem, núcleo pulposo, esclerótica, tendão, cordão umbilical
Queratossulfato	Cartilagem, osso, córnea, núcleo pulposo
Sulfato de Dermatana	Aorta, válvulas cardíacas, ligamento da nuca, esclerótica, pele, tendão
Heparina	Mastócitos
Sulfato de Heparina	Superfícies celulares

Fonte: Banks (1998)

### 2.1.2 Proteoglicanas

As proteoglicanas são conjugados de GAGs e proteínas. Devido a essas macromoléculas possuírem 95% de carboidratos, elas se comportam mais como açúcares do que como proteínas. Uma proteoglicana típica tem uma proteína central com o peso molecular de cerca de 20000, à qual numerosas GAGs estão complexadas (cerca de 100 cadeias de SC, 110 cadeias de queratossulfato e aproximadamente 15 outros oligossacarídeos) ficando com peso molecular de aproximadamente  $2,5 \times 10^6$ . Foram identificadas algumas regiões específicas da proteína central: região de conjugação do SC, a região de conjugação do queratossulfato e a região de conjugação do ácido hialurônico, sendo esta última envolvida na formação dos agregados de proteoglicanas. A natureza polianiónica das proteoglicanas as torna bastante adequadas para o desempenho de suas funções básicas e para sua importância

biológica. Por absorverem facilmente a água, elas contribuem para formação do líquido sinovial e para as propriedades compressivas de um tecido, atuando como depósito quando o excesso de água ocupa o espaço intersticial e proporcionando uma fonte de água facilmente disponível para as células. Assim, as proteoglicanas contribuem para a estabilidade e para o suporte proporcionado pelo tecido conjuntivo e ainda colaboram com a manutenção do volume de água e com a distribuição de eletrólitos por todo organismo (Banks, 1998).

### 2.1.3 Sulfato de Condroitina

Os sulfatos de condroitina são heteropolímeros aniônicos lineares de ácido D-glicurônico e N-acetil-D-galactosamina. O primeiro a descrever o SC foi Levene em 1925, ele mostrou que os constituintes do SC eram o ácido D-glicurônico, D-galactosamina, e ácido acético e sulfúrico (Roseman, 2001). Porém, a correta estrutura do SC foi elucidada mais tarde: composto por unidades repetidas de [ $\rightarrow 4$  ácido D-glicurônico  $\beta 1 \rightarrow 3$  N-acetil-D-galactosamina  $\beta 1$ ], também ficou elucidado que, nos mamíferos, a posição mais comum do radical sulfato (que determina qual o isômero formado) é o C4 e/ou o C6 da N-acetil-D-galactosamina, formando a condroitina-4-sulfato ou a condroitina-6-sulfato (Lamari e Karamanos, 2006). A condroitina-4-sulfato é chamada de sulfato de condroitina A e a condroitina-6-sulfato de sulfato de condroitina C. O sulfato de condroitina B é o sulfato de dermatana (SD), já que este possui algumas diferenças estruturais (Franson *et al.*, 1990). Estas diferenças incluem a 5-epimerização do ácido D-glicurônico a ácido L-idurônico e a O-sulfatação no C4 e C6 da N-acetil-D-galactosamina e no C2 do ácido L-idurônico (Casu *et al.*, 1998). Uma forma desse composto pode ser não-sulfatada. Esses isômeros têm uma distribuição diferenciada relacionada com o tecido, com a idade e com o estado de saúde do organismo (Banks, 1998). A Figura 1 ilustra a estrutura química dos três principais tipos de SC.

A síntese do SC começa com a proteína central sendo sintetizada no interior do retículo endoplasmático granular (REG) e sendo transportada para o aparelho de Golgi. No aparelho de Golgi ocorrem três etapas: formação da região de ligação, polimerização (alongamento das cadeias) e sulfatação dos polissacarídeos. A formação da região de ligação, que é comum a maioria das GAGs, é feita pela adição de um resíduo de xilose à uma serina específica na cadeia polipeptídica, seguida da adição de duas galactoses e um ácido glicurônico. Estas reações são catalisadas por glicosiltransferases específicas, com adição de um açúcar do respectivo uridina difosfato. A polimerização envolve a adição sequencial de N-acetil-Dgalactosamina e ácido glicurônico pela ação de diferentes N-

acetilgalactosiltransferases e glucuroniltransferases. A sulfatação ocorre em consequência da doação de sulfatos pela 3'-fosfoadenina 5'-fosfossulfato. Já a degradação de proteoglicanas em um tecido conjuntivo depende da ação sequencial de proteases, de glicosidasas, de acetilases e de sulfatases (Pavão *et al.*, 2006).

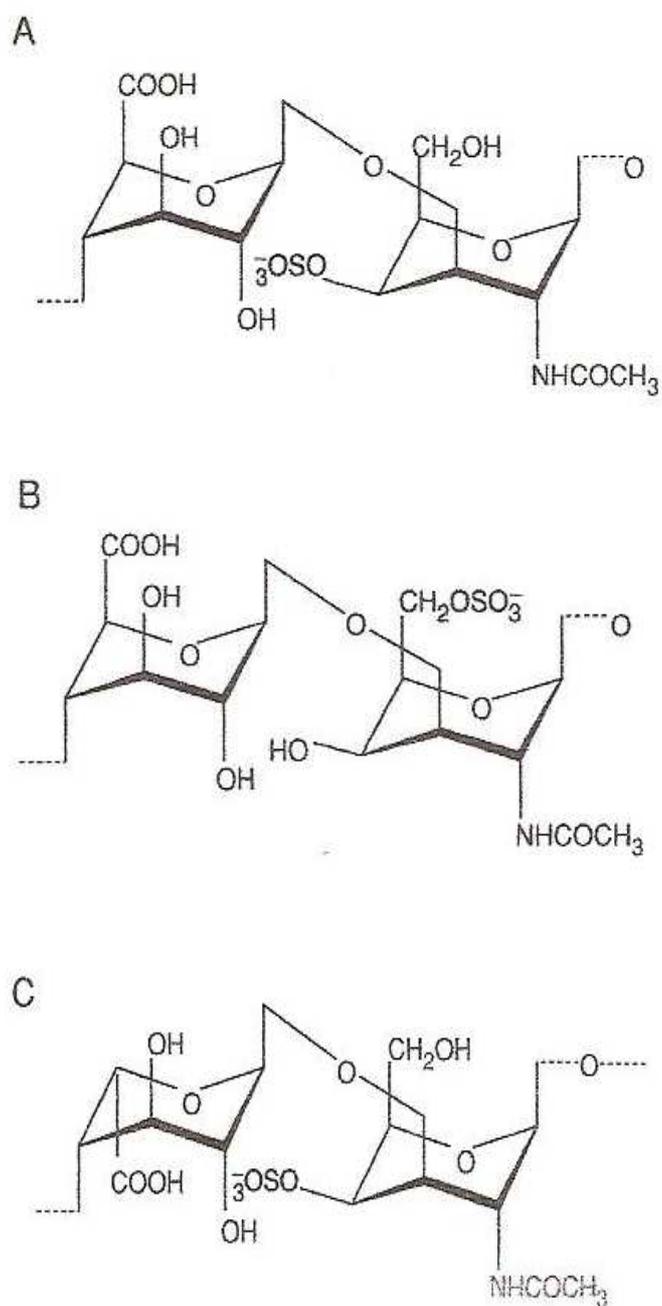


Figura 1: Estrutura química do sulfato de condroitina  
Fonte: Pavão *et al.* (2006)

## 2.2 Estruturas Anatômicas Utilizadas

### 2.2.1 Laringe e Traquéia Bovina e Suína

A laringe forma a conexão entre a faringe e a árvore traqueobrônquica. Situa-se abaixo da faringe e atrás da boca, suspensa da base do crânio pelo aparelho hióide; está parcialmente contida entre os ramos da mandíbula e parcialmente estendida no pescoço. As principais cartilagens que compõem a laringe são: cartilagem epiglótica, cartilagem tireóidea, cartilagem cricóidea e cartilagens aritenóideas. A cartilagem epiglótica compõe-se de cartilagem elástica e flexível enquanto as demais compõem-se de cartilagem hialina e, portanto, suscetíveis às alterações que afetam esse tecido com a idade; ilhas de calcificação e até de ossificação tornam-nas mais quebradiças com o avançar da idade, características não desejáveis para o produto.

A cartilagem epiglótica é predominantemente rostral e consiste em uma pequena haste e uma grande lâmina em forma de folha; estando a haste embutida entre a raiz da língua, o basi-hióide e o corpo da cartilagem tireóidea, unindo todas estas estruturas. A cartilagem tireóidea é a maior da série e consiste em duas lâminas laterais que se encontram ventralmente, onde se fundem em grau variável, formando a maior parte do assoalho da laringe. A parte mais rostral do corpo da cartilagem tireóidea é espessada formando uma saliência. As extremidades rostral e caudal da borda dorsal de cada lâmina articulam-se com o tíreo-hióide e o arco da cartilagem cricóidea, respectivamente. A cartilagem cricóidea apresenta um anel em forma de sinete e consiste em um “selo” dorsal expandido (lâmina) e um arco ventral mais estreito. A parte dorsal leva uma crista mediana e, em sua borda rostral, duas facetas para as cartilagens aritenóideas. O arco tem, em cada lado, uma faceta para articulação com a cartilagem tireóidea. As cartilagens aritenóideas possuem uma forma irregular, mais bem descrita como piramidal. Uma faceta caudal articula-se com a margem rostral da lâmina da cartilagem cricóidea, de onde se irradiam três processos: um vocal, um muscular e um corniculado.

A traquéia e os brônquios formam um sistema contínuo de tubos que conduzem o ar entre a laringe e as passagens menores (bronquíolos) nos pulmões. A traquéia situa-se à frente da laringe, através do espaço visceral do pescoço, adentra o mediastino na entrada torácica e continua até sua bifurcação terminal sobre o coração. A parte cervical da traquéia mantém uma posição mediana, já a parte torácica desvia-se ligeiramente para direita, onde cruza o arco aórtico.

A parede da traquéia é composta de uma mucosa mais interna, uma camada média fibrocartilágnea e uma adventícia (no pescoço) ou serosa (no tórax). A mucosa continua revestindo a parte infraglótica da laringe e pode apresentar ligeira prega longitudinal, quando o lúmen se estreita. Contem glândulas mucosas uni e multicelulares, que produzem uma cobertura protetora de muco. A cobertura fibrocartilágnea é composta de numerosas faixas curvas de cartilagens, que formam anéis dorsalmente incompletos. As bordas das faixas estão unidas entre si por fibras de tecidos conjuntivos mais elásticos, contínuo com o pericôndrio. As terminações se unem pelo músculo traqueal liso, o qual liga a junção dentro do anel (Dyce *et al*, 1996).

Durante o abate dos bovinos, a carcaça já esfolada recebe uma incisão longitudinal na linha média ventral da região cervical, permitindo a dissecação do esôfago da traquéia até a região da cárdia, através de um instrumento chamado de saca-rolha. Esse procedimento é seguido por uma ligadura na porção inicial do esôfago, junto à laringe. Essa ligadura é feita com o objetivo de se evitar a contaminação da cabeça pelo conteúdo ruminal quando houver a incisão por ocasião da separação desta junto à laringe.

O passo seguinte é a evisceração abdominal e torácica, contemplando nesta o trato respiratório, o coração e a aorta torácica, seguindo todo conjunto para inspeção do Serviço de Inspeção Federal (SIF). Após esta operação, é removida a laringe com a traquéia, que será encaminhada para seção de miúdos para a separação, toaleta, embalagem e congelamento. Se devidamente toaletada obtém-se uma laringe com aproximadamente 240 g e uma traquéia com aproximadamente 36 - 40 cm e peso médio de 250 g.

Já o produto suíno é retirado de forma diferente. Após a inspeção das vísceras vermelhas pelo SIF, separa-se a laringe e traquéia, desviando-as para seção de manipulação de miúdos, onde é feita a retirada do esôfago, seguido de um breve toaleta. A laringe poderá ser separada da traquéia, pesando 80 g a primeira e 50 g a segunda; ou podem ser comercializadas juntas, como peça única, dependendo da especificação do laboratório. A Figura 2 ilustra uma laringe suína.

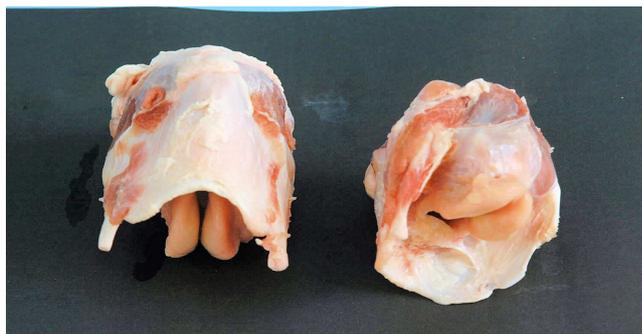


Figura 2: Laringe suína

### 2.2.2 Cartilagem da Escápula Bovina e Suína

A escápula é um osso plano que se situa sobre a parte craniodorsal do tórax, lateralmente comprimida, onde é mantida em posição por uma estrutura de músculos, sem formar uma articulação convencional com o tronco. É a base da região do ombro, termo que abrange muito mais que a proximidade imediata da articulação umeral ou do ombro. Nos ungulados, a escápula é prolongada dorsalmente por uma ampla lâmina semicircular de cartilagem, a cartilagem da escápula, que aumenta a área de fixação muscular. Essa cartilagem torna-se cada vez mais calcificada e, portanto, mais rígida com a idade (Dyce *et al.*, 1996). A cartilagem da escápula é articular, portanto do tipo hialina (Banks, 1998).

Após o resfriamento das meias-carcaças dos bovinos, estas poderão ser comercializadas divididas em três partes: traseiro serrote, dianteiro e ponta de agulha; ou poderão ser destinadas à sala de desossa. Na desossa do traseiro serrote é obtida a cartilagem da escápula, que fica na extremidade cranial da peça, entre os cortes filé de costela e capa de filé. Cada cartilagem mede aproximadamente 15 cm e deve pesar entre 50 – 60 g, se devidamente toaletada.

A cartilagem da escápula suína também é retirada na sala de desossa. Após a remoção da pele e toucinho, as carcaças são divididas em cortes: pernil, paleta, costela, carret e pescoço. Na desossa da paleta, encontra-se localizada na extremidade dorsal a cartilagem da escápula, com um peso aproximado, se bem toaletada, de 35 a 40 g. A Figura 3 ilustra um par de cartilagens da escápula suína.



Figura 3: Cartilagem da escápula suína

### 2.2.3 Septo Nasal Bovino

As cavidades nasais são divididas pelo septo nasal, que é predominantemente cartilágneo, todavia ossificado em sua maior parte caudal (lâmina perpendicular do osso etmóide). O septo encontra-se com a superfície superior do palato duro, que separa as cavidades do nariz e da boca. Em bovinos, a parte caudal do septo não alcança o palato e há uma única abertura, compartilhada por ambos os lados. Esse canal mediano único se prolonga com os pares de passagens nasais para o interior da nasofaringe (Dyce *et al.*, 1996).

Após a inspeção do SIF, a cabeça segue para a seção de cabeças, onde será desarticulada a articulação temporo-mandibular. Segue então o maxilar superior para a guilhotina abridora de cabeças, promovendo a abertura longitudinal próxima à linha média, expondo, dessa forma, a parte interna do osso nasal e conseqüentemente, no maior lado da cabeça, o tabique ou septo nasal. Com auxílio de uma faca pontiaguda corta-se todo o perímetro deste tabique, perfeitamente demarcado pela fusão do tecido cartilaginoso com tecido ósseo.

Cada tabique mede de 18 a 20 cm de comprimento, 5 a 7 cm de largura, com espessura média de 5 mm e peso médio de 120 g, estando ilustrados na Figura 4. É importante salientar que raças zebuínas possuem um tabique mais desenvolvido.

O septo nasal bovino é considerado pela indústria farmacêutica como a segunda melhor matéria-prima para extração do SC (ficando atrás apenas da cartilagem do esterno de frangos de corte), porém a produção do septo nasal bovino poderia ser enormemente superior, o fator limitante é a ausência da guilhotina abridora de cabeças em alguns abatedouros.



Figura 4: Septo nasal bovino

#### 2.2.4 Aorta Bovina

A parede arterial é composta de três túnicas concêntricas: túnica íntima, túnica média e túnica adventícia. O endotélio da túnica interna é formado por células pavimentosas típicas que revestem a luz do órgão, é sustentado por uma fina camada de tecido conjuntivo especializado, que é limitado externamente por uma lâmina elástica bem desenvolvida, a membrana elástica interna. A túnica média é a lâmina mais espessa e mais variável. É composta pela mistura elaboradamente organizada de tecido elástico e músculo liso. As grandes artérias, como a aorta, que devem dilatar-se consideravelmente com o débito sistólico dos ventrículos, possuem uma túnica média composta predominantemente de membranas elásticas fenestradas, concêntricas, com interposição de relativamente pouco músculo. A túnica adventícia é predominantemente fibrosa e transforma-se gradativamente no tecido fibroareolar (Dyce *et al.*, 1996).

A aorta torácica é obtida a partir do conjunto torácico, juntamente com o trato respiratório e o coração. Após a inspeção, segue para seção de miúdos para o toailete. A peça inteira, corretamente seccionada, mede aproximadamente 30 cm e pesa em média 150 g. A aorta torácica exige um toailete trabalhoso e demorado, já que possui tecido gorduroso bastante aderido a parede externa da artéria, que precisa ser removido com auxílio de uma faca e uma gancheira.

#### 2.2.5 Esterno das Aves

O esterno é um grande osso não segmentado, que, com seus longos processos forma parte considerável da parede corpórea ventral. Confere fixação aos grandes músculos do vôo. Tem uma quilha proeminente (carina) nas aves com grande capacidade de vôo, enquanto em outras espécies a quilha é baixa, mas compensada pela maior largura esternal. O esterno da galinha é relativamente longo e estreito e, embora a galinha tenha pouca capacidade para voar, possui uma quilha profunda. A extremidade caudal da quilha é cartilaginosa na ave jovem (sendo esta a parte usada para extração do SC). Esta extremidade ossifica-se mais tarde; sua flexibilidade, portanto, é um indicador da idade (Dyce *et al.*, 1996). A idade ideal dos frangos para uma extração mais eficiente do SC é até os 42 dias (Arcanjo *et al.*, 1994).

Esta cartilagem do esterno das aves é tirada por ocasião da desossa, quando se prepara o filé de peito. Esta é considerada pela indústria farmacêutica como a melhor matéria-prima para extração do SC, talvez devido à idade de abate preconizada pela indústria avícola. Outro ponto a favor desta fonte é o grande volume gerado no abate e desossa de frangos de corte no

Brasil. A Figura 5 mostra a porção cartilaginosa do esterno das aves que é usada na extração do SC.



Figura 5: Extremidade caudal do esterno de frangos de corte.

### 3 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DO SULFATO DE CONDROITINA

Existem diversos métodos para isolar o SC a partir de tecidos animais. Esses métodos sempre incluem a digestão proteolítica para extração das proteoglicanas e a purificação do SC, que podem ser feitas de diversas formas. Vários autores e laboratórios particulares que comercializam enzimas têm publicado novos métodos, variando principalmente fatores como temperatura, pH, concentração das enzimas e tempo necessário para cada reação de acordo com o tipo e origem do tecido. Na sequência serão exemplificados protocolos resumidos para o isolamento do SC a partir das principais fontes animais abordadas neste trabalho. É importante deixar claro que os protocolos aqui exemplificados são realizados em laboratórios experimentais de universidades e instituições de pesquisa, que os disponibilizam para reprodução dos processos em escala industrial.

As cartilagens, em especial, devem ser previamente limpas para o processo de extração, sendo utilizado o cozimento prévio em água a 90-95° C por 10 minutos, para ajudar na retirada da carne e tecido conjuntivo aderidos. No Brasil existem entrepostos especializados no recolhimento e preparação dessas matérias-primas para a indústria farmacêutica.

Os tecidos utilizados na extração do SC estão geralmente associados a outros, principalmente musculares no caso das cartilagens, além disso, as GAGs ficam complexadas à proteína, formando as proteoglicanas, portanto, os procedimentos para extração envolvem primeiramente a digestão proteolítica com proteases inespecíficas. Alguns protocolos ainda sugerem uma diálise do sobrenadante resultante da centrifugação da solução após a proteólise, que pode ser vantajoso para remover moléculas de baixo peso molecular. Esta digestão resultará em uma solução de GAGs, já que estes tecidos não possuem apenas SC (Silva, 2006).

Há então a necessidade de se fazer a separação do SC, para isso é necessário separar a mistura de GAGs do meio líquido. Esta separação pode ser feita por diversas formas, sendo as mais comuns: precipitação iônica em etanol ou amônia quaternária e adsorção em resinas de troca iônica.

A precipitação com etanol é um meio simples utilizado para separar GAGs a partir de soluções. Sendo necessária uma concentração suficiente de sal para precipitação completa. Concentração esta, facilmente atingida, já que a solução proteolítica geralmente contém sais tamponantes. Numa concentração adequada de sais, todas as GAGs são totalmente precipitadas em etanol 4 a 5 volumes (Silva, 2006).

Poliânions formam sais insolúveis em água com cátions de detergentes, como o cetilpiridínio e o cetiltrimetilamônio. Estes complexos são dissociados e dissolvidos por sais inorgânicos em altas concentrações. Compostos de quaternário de amônio são utilizados para separação das GAGs da massa resultante da digestão proteolítica dos tecidos. A baixa solubilidade dos complexos torna possível a precipitação de GAGs a partir de soluções com concentrações 0,01% ou até menores (Rodén *et al.*, 1972).

A cromatografia de troca iônica também pode ser utilizada para a separação das GAGs devido à alta carga negativa das mesmas. Existem inúmeros produtos comerciais que podem ser usados para tal fim. Um típico protocolo utiliza a aplicação da solução digerida na coluna de troca iônica equilibrada por solução tampão. A coluna é lavada com a mesma solução tampão e depois eluída com a mesma solução tampão adicionada de 1 M de cloreto de sódio (NaCl). As GAGs são eluídas da coluna por repetidas diálises com água destilada, liofilizadas e novamente dissolvidas em água destilada para purificação (Silva, 2006).

O passo seguinte é a purificação do SC, para isso também há diferentes técnicas, como a precipitação sequencial em solventes orgânicos (como etanol e acetona), cromatografia de troca iônica e cromatografia de permeação em gel, sendo as duas últimas seguidas da degradação por enzimas altamente específicas.

A purificação também pode ser feita por precipitação em etanol. Resumidamente, é adicionado NaCl à mistura até a concentração de 2% e as GAGs são fracionados por volumes crescentes de etanol. Para cada 0,1 volumes de etanol adicionados à mistura, é necessário o repouso a 4° C por 24 h. Posteriormente, a solução é centrifugada e o precipitado seco em estufa. Acrescenta-se novamente etanol e repete-se o procedimento até o máximo de 2,0 volumes de etanol, de acordo com a GAG que se deseje precipitar (Silva, 2006).

Também pode ser utilizado metanol ou propanol, obtendo-se resultados semelhantes. A primeira GAG a precipitar é a heparina, seguida do SD e por último o SC. Observa-se também que quanto maior o número de átomos de carbono na molécula dos alcoóis (metanol → etanol → propanol), maior a capacidade de precipitação das GAGs com menor uso do solvente (Volpi, 1996).

A purificação em acetona é um método rápido e útil para a purificação de um único tipo de GAG. Este método não necessita de cátions bivalentes e permite uma boa purificação posterior sem necessitar de resinas de troca iônica para remover íons contaminantes. A heparina é a primeira GAG a ser precipitada, seguida do SD em concentrações de 0,6 a 0,7 volumes. O SC é o mais solúvel em acetona, sendo o último a ser precipitado (Volpi, 1994).

A purificação por troca iônica, assim como a separação, é possível graças às diferentes forças de carga negativa das GAGs. A separação por troca iônica, descrita anteriormente, permite um elevado nível de purificação das GAGs de outros tipos de macromoléculas. Este segundo passo trata-se de uma troca com gradiente maior e contínuo de sal, conseguindo maior pureza e separando diferentes tipos de GAGs. A resina mais comumente utilizada é a dietilaminoetil (DEAE), e o NaCl é o sal usado para eluir as GAGs. Glicoproteínas residuais são completamente separadas das GAGs por este método, por isso são necessárias técnicas complementares para isolamento de determinada GAG, como a digestão enzimática específica (Werneck *et al.*, 2000).

A cromatografia de permeação em gel pode ser empregada para separar e purificar uma única GAG de uma mistura de GAGs. A escolha da matriz de suporte, da porosidade e do solvente eluente depende da GAG que se deseja extrair. A heparina, que tem a maior massa molecular entre as GAGs, é facilmente separada por este método. No entanto, as GAGs sulfatadas, como o SD e o SC, que têm tamanho semelhante, podem ser mais difíceis de separar, sendo necessário técnicas complementares de digestão enzimática (Martins *et al.*, 2003). Uma mistura de SD e SC pode ser tratada pela ação da condroitinase B, enzima que degrada especificamente o SC que pode ser posteriormente recuperada por cromatografia de filtração em gel (Theocharis *et al.*, 2001).

A Figura 6 resume os métodos de extração e isolamento do SC usados atualmente, inclusive em escala comercial. Há diversas possibilidades de combinações destes métodos que podem ser utilizadas. A Figura 7 ilustra o produto final SC pronto para ser revestido.

### **3.1 Histórico dos Métodos**

O SC foi isolado de tecido cartilaginoso pela primeira vez em 1884, mas a natureza dos seus monossacarídeos e estrutura foram descritas pela primeira vez em 1925 por Levene (Roseman, 2001).

No início das pesquisas para extração do SC, eram usados tratamentos alcalinos, como o hidróxido de sódio, para degradação da proteína dos tecidos, porém foi observado que tais tratamentos causavam também a degradação do SC, como descreveram Jorpes (1929) e Meyer (1948). Começou-se então a pesquisar novos métodos: Meyer e Smyth (1937) e Blix e Snellman (1945) usaram cloreto de cálcio (CaCl), este método evita a degradação alcalina do SC, mas também dissolve o colágeno e é demorado demais.

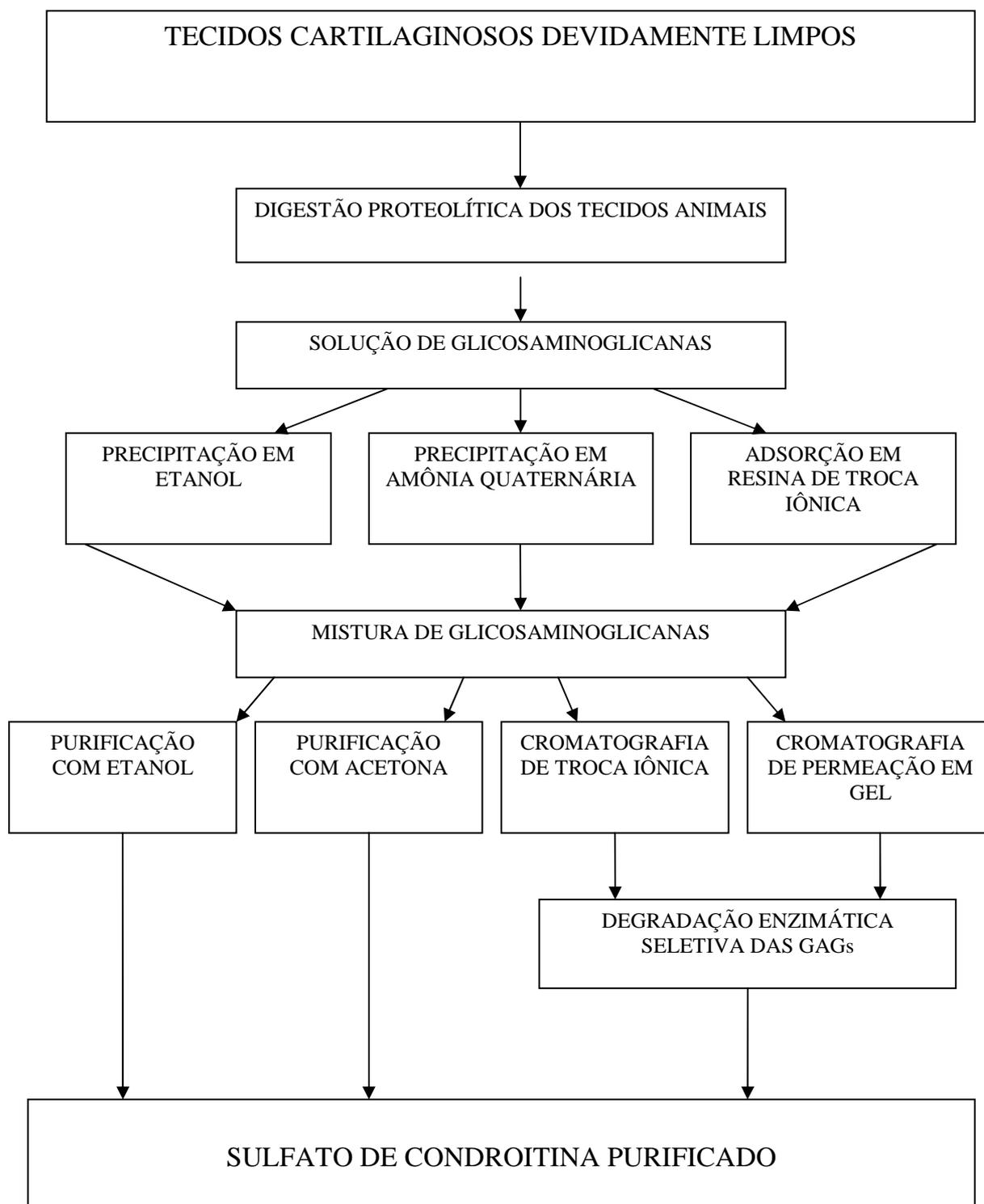


Figura 6: Procedimentos gerais para extração e purificação do SC



Figura 7: Produto final sulfato de condroitina.  
Fonte: Nunes *et al.*, 2008

Einbinder e Schubert (1950) extraíram SC de traquéias bovinas utilizando cloreto de potássio (KCl) e testaram a eficiência de quatro diferentes métodos, através da avaliação das hexosaminas (N-acetilglicosamina e N-acetilgalactosamina). No primeiro método colocaram 50 g de cartilagem de traquéia bovina seca em acetona em uma solução de 30% de KCl e agitaram durante dois dias. O líquido foi drenado e a parte sólida foi novamente misturada com 1 L de solução de KCl durante mais dois dias. Após a drenagem do líquido, este foi juntado ao anterior e adicionado 20 ml de ácido acético, 20 g de acetato de potássio, e 20 g de caulim, sendo a solução agitada por 30 min., filtrada e dialisada com água. Ao líquido dialisado foi adicionado 20 ml de ácido acético, 20 g de acetato de potássio e 20 g de caulim. A mistura foi agitada por 30 min., filtrada, e o líquido evaporado a vácuo até sobrar 200 ml. Foi adicionado 10 g de acetato de potássio e a solução misturada a 1 L de álcool absoluto, produzindo um precipitado floculado branco. Após algumas horas de repouso, o líquido foi centrifugado, o precipitado lavado em álcool e éter absolutos e seco a vácuo. O segundo método incluía 1% de carbonato de potássio na solução de KCl. O terceiro e o quarto métodos foram idênticos ao primeiro, porém estes utilizaram 150 g de cartilagem fresca e 150 g de cartilagem armazenada refrigerada, respectivamente. O resultado das análises da quantidade de SC extraída foi comparado com a quantidade estimada pela análise das hexosaminas. O primeiro tratamento extraiu 2,1% do total do SC presente na cartilagem, o segundo 60,0%, o

terceiro 11,1% e o quarto 73,1%. Os resultados mostraram que a adição de 1% de carbonato de potássio foi suficiente para permitir a extração de mais de metade do SC e que as cartilagens refrigeradas permitiram uma extração ainda mais completa, o que poderia ser explicado pela possível degradação enzimática das ligações entre o SC e o colágeno.

Muir e Jacobs (1967) ainda descreveram um método para extração do SC em 10% de cloreto de céσιο (CsCl). Posteriormente Tsiganos e Muir (1969) desenvolveram um método de extração em 0,15 M de acetato de sódio e compararam a eficiência com a extração em CaCl, ambos em pH 6,8. Para isto utilizaram cartilagem da laringe de suínos abatidos entre os seis e oito meses. No primeiro procedimento, 250 g de cartilagem foram cortados em pequenos pedaços e imersos em 600 ml de solução 1,5 M acetato de sódio. Cada porção de 200 ml desta mistura foi homogeneizada em um liquidificador em velocidade máxima por 5 vezes em 1 min., sendo que durante estes intervalos o recipiente foi refrigerado em uma mistura de acetona e CO<sub>2</sub>, para que a temperatura não ultrapassasse os 4°C. A mistura homogeneizada foi rapidamente filtrada duas vezes em filtro de algodão. Após foi adicionada ao líquido filtrado uma solução de 9-aminoacridina, saturada a 60°C, formando um precipitado floculado, até não precipitar mais nada. Todas as operações citadas foram feitas em intervalo de tempo menor que 30 min. Após 2 h, o precipitado foi coletado por filtração através de papel-filtro e lavado com uma solução diluída de 9-aminoacridina. Preparou-se uma solução de 30 g de acetato de sódio anidro e 15 ml de ácido acético, completando a solução até 100 ml. Misturou-se o precipitado, com auxílio de rolos mecânicos, em 10 ml desta solução, 290 ml de água e 300 ml de resina polianiônica pelo período de uma noite a temperatura ambiente. A resina foi removida no dia seguinte por filtro de papel e lavada quatro vezes com 50 ml de água. O filtrado combinado com a água teve o pH ajustado para 3-5 com ácido acético, foi novamente precipitado em 9-aminoacridina e concentrado por evaporação até chegar aos 200 ml. Foram adicionados 4 volumes de etanol e posteriormente a solução acima citada de acetato de sódio e ácido acético até ocorrer a floculação do precipitado, sendo então levado a 4 ° C por 15 h. Passado este tempo foi precipitado e feita ressuspensão em meio de 80% de etanol e centrifugado por duas vezes, seguido da ressuspensão em acetona e centrifugação por uma vez. O precipitado foi seco por pentóxido de fósforo (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) a vácuo, resultando em 2 a 7 g de GAGs. No segundo procedimento, a homogeneização foi feita de forma intermitente durante 20 minutos a 4°C. Após 48 h a 4°C o homogeneizado foi filtrado e dialisado em água a 4° C. As GAGs foram isoladas da mesma forma que no primeiro procedimento. Após separaram-se as GAGs em porções de 1 g, dissolvendo 1 g em 100 ml de solução 0,4 M NaCl, e misturando após, 11 ml de solução cloreto de cetilpiridínio a 10 % (Scott, 1960). Depois de

um período de incubação a 37° C, a amostra foi centrifugada a 3500 rotações por minuto (rpm) por 45 min. a 20° C, o precipitado foi retirado e o conteúdo ressuspenso em 20 ml de solução 1% de cloreto de cetilpiridínio (sem NaCl), centrifugando a seguir e repetindo o procedimento. Após ressuspendiam em solução de 0,4 M de NaCl e 0,1% de cloreto de cetilpiridínio e centrifugavam. O precipitado era então redissolvido em 50 ml de solução 2,6 M NaCl, precipitado em 4 volumes de etanol, centrifugado, dissolvido em 50 ml de solução 0,1 M NaCl, reprecipitado em etanol, lavado e seco da mesma forma que no primeiro procedimento. O rendimento foi em média o dobro do obtido no primeiro método.

Ainda nessa mesma época descobriu-se que a parede arterial contém células musculares lisas e fibroblastos dispersos em uma matriz composta por fibras elásticas e colágenas, incorporadas na substância fundamental amorfa, rica em glicosaminoglicanas (proteoglicanos) e que a maioria das glicosaminoglicanas conhecidas está presente na parede arterial de mamíferos (Kaplan e Meyer, 1960; Sirek *et al.*, 1964; Muir, 1965; Kumar *et al.*, 1967; Madhavan e Chandra, 1971; Eisenstein *et al.*, 1975; Picard *et al.*, 1975).

As primeiras tentativas de isolamento do SC do tecido arterial aórtico foram feitas com extração em água (Buddecke *et al.*, 1963), com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Kresse *et al.*, 1971), com 3 M cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) (Ehrlich *et al.*, 1975) e após o tratamento com colagenase (Radhakrishnamurthy *et al.*, 1977). Oegema *et al.* (1979) isolaram SC de aorta bovina utilizando 4 M cloreto de guanidine e Kapoor *et al.* (1981) desenvolveram um método, que também utiliza o 4 M cloreto de guanidine, obtendo excelentes resultados – 90% de extração do SC presente no tecido.

As aortas são dissecadas para retirar-se a túnica externa, lavadas com água fria a 0,15 M NaCl e desengorduradas com éter etílico frio. Após são trituradas e imersas durante cinco dias a 4°C, na proporção de 10 L por kg, em uma mistura de solventes: 4 M cloreto de guanidine, 10 mM EDTA dissódico, 10 mM de cloreto de benzamidine, 10 mM ácido 6-amino hexanóico e 50 mM de tampão acetato de sódio, (pH 5,8). A suspensão era filtrada e o resíduo lavado com 5 L de solução 0,3 M NaCl. O filtrado e o lavado misturados e centrifugados a 20000 x g por 30 min. a 4°C e no sobrenadante era analisada a quantidade de ácido urônico para estimar a quantidade de GAGs. Após a suspensão era filtrada e o resíduo lavado com 5 L de solução 0,3 M NaCl, o líquido filtrado e o lavado combinados eram centrifugado a 20000 x g por 1 h a 4°C. O sobrenadante era concentrado cinco a sete vezes por ultrafiltração; dialisado por 6 M uréia, 50 mM de Tris hidrocloreto (Tris-HCl), pH 6,5; e passado em coluna de 50 x 400 mm de dietilaminoetil-celulose (DEAE-celulose) equilibrada com o mesmo tampão Tris-HCl. A coluna era eluída três vezes: primeiramente com 6 M

uréia, posteriormente com 6 M uréia e 0,15 M NaCl e finalmente com 2 M NaCl e 6 M uréia, todos em 50 mM do tampão Tris-HCl e pH 6,5. Resultando numa mistura de proteoglicanas sem colágeno.

As proteoglicanas foram submetidas à cromatografia de troca iônica em coluna de 15 x 400 mm de DEAE-celulose e eluída por 6 M uréia, 0,1 a 2 M de tampão acetato de sódio e pH 5,8 a 16 ml/h. Foi preparada uma solução de 5% (p/v) de acetato de cálcio e 0,5 M de ácido acético com pH 5,0 e dissolveu-se as proteoglicanas na proporção de 1 a 5 mg/ml nessa solução, deixando pelo período de uma noite a 4°C. O material não dissolvido era removido por centrifugação a 20000 x g por 30 min. a 4°C e ao sobrenadante era adicionado etanol gota a gota até a concentração de 25% (v/v). O precipitado formado após 12 h a 4°C foi coletado por centrifugação, lavado com solução de etanol, dissolvido em água, dialisado e seco.

A degradação protéica foi realizada com papaína em 5 mM EDTA dissódico, 5 mM hidrocloreto de cisteína e 100 mM de tampão fosfato de sódio e pH 6,5 durante 12-16 h em temperatura 65° C, com adição de 0,5 – 1,0 mg de enzima a cada 6 h. Os peptídeos foram retirados por cromatografia de troca iônica em coluna de 7 x 140 mm de DEAE-celulose com 20 mM de ácido clorídrico (HCl), depois 0,3 M NaCl e finalmente 2 M NaCl. Para purificação dos resíduos de iduronato das GAGs foi feita oxidação pelo periodato em pH 3,0, 4°C por 24 h. Após dialisado o produto foi clivado por meio alcalino (pH 12), a 20° C durante 30 min.

A purificação foi realizada pelas condroitinases ABC e AC, utilizando 0,01 U de cada enzima por mg de substrato. Os produtos da degradação foram extraídos em Sephadex G-50, com 0,2 M de acetato de piridina e pH 5. As GAGs foram então cromatografadas em coluna de 7 x 140 mm de DEAE-celulose e eluídas por um gradiente linear de 0,1 a 2,5 M de acetato de sódio, pH 5 a 4 ml/h.

Atualmente os principais métodos de extração e purificação do SC são publicados por Nakano *et al.*, como a extração da cartilagem do esterno das aves em 1996. A extração das GAGs segue os seguintes passos: tritura-se 10 g de cartilagem em um liquidificador; adiciona-se papaína na proporção de 4 mg / g de cartilagem em 100 ml de solução de 0,1 M de tampão fosfato de sódio, utilizado para manter o pH neutro, 0,005 M de ácido acético-tetraetilenodiamina, 0,005 M de cloridrato de cisteína e 0,02% de azida sódica; as cartilagens devem ficar embebidas nessa solução aquecida a 65° C por um período 48 h; em seguida é acrescentado ácido tricloroacético até obter a concentração de 7% e se mantém esta mistura a 4°C durante 12 h; após, é centrifugada a 132.000 x g por 30 min ainda a 4°C para remover o

precipitado de proteínas; o sobrenadante deve ser dialisado em água destilada refrigerada por 24 h e o resultado desta diálise é a solução contendo GAGs pronta para ser purificada.

A purificação é feita da seguinte forma: nessa solução é adicionado 1,5 g cloreto de cetilpiridínio; centrifuga-se a 6320 x g durante 30 min., descartando o sobrenadante; adiciona-se 40 ml de solução de cloreto de sódio a 0,4 M; centrifuga-se novamente a 6320 x g durante 30 min., descartando o sobrenadante; mistura-se o sobrenadante em 100 ml de cloreto de sódio 2,1 M; adiciona-se 1 M de tiocianato de potássio; resultando numa solução com cetilpiridínio e tiocianato precipitados; passa-se a solução em papel-filtro nº 4; o filtrado é dialisado em água destilada refrigerada, evaporado a vácuo e seco em estufa a 60°C durante 5 h.

Nakano *et al.* (2000) também publicaram um experimento onde mostram o potencial da cartilagem do septo nasal de bovinos de dois a três anos para extração de SC e o efeito do pH no processo, através da medição do ácido urônico, já que grande parte (98%) do conteúdo de ácido urônico presente na cartilagem nasal bovina reflete o conteúdo de SC da cartilagem (Nakano *et al.*, 1998).

As cartilagens foram cortadas em cubos de 1 mm<sup>3</sup>, divididas porções de 1 g e incubadas em três meios diferentes: 10 volumes de água com pH ajustado para 4,5 com ácido acético, 0,1 M acetato de sódio com pH ajustado para 4,5 com ácido acético e água deionizada sem ajuste de pH (pH 7,5). As misturas foram incubadas a 37°C durante 7 h, após foram centrifugadas e o nível de ácido urônico no sobrenadante medido pela reação de carbazole (Kosakai e Yoshizawa, 1979). O restante do ácido urônico presente no tecido foi medido após proteólise com papaína, seguido de desproteinização com ácido tricloroacético (Nakano *et al.*, 1998).

A medição de ácido urônico da cartilagem tratada com água e pH ajustado a 4,5 resultou 73,2 ± 3,0% do ácido urônico recuperado, valor aproximadamente oito vezes maior que o encontrado na cartilagem tratada com água deionizada e pH inicial neutro, que foi de 8,8 ± 1,5%. Já quando tratada com 0,1 M de acetato de sódio e pH 4,5 o valor achado foi 78,8 ± 3,4%, valor semelhante ao achado anteriormente em experimento semelhante (Nakano *et al.*, 1998) que foi 79,6 ± 8,3%. Esse experimento mostrou a importância do fator pH na extração do SC e que a maior parte do SC da cartilagem do septo nasal bovino pode ser liberada sem o uso do acetato de sódio, utilizando apenas água e ácido acético. O acetato de sódio melhora ligeiramente a extratibilidade do SC (cerca de 6%), porém não é economicamente vantajoso. Aproximadamente 1 ml de ácido acético é suficiente para manter o pH da mistura de 100 g de cartilagem nasal bovina e 1 L de água em 4,5 durante as 7 h, enquanto que cerca de 8 ml de

ácido acético e 4,1 g de acetato de sódio são necessários para fazer 1 L da solução 0,1 M de acetato de sódio necessária para manter as mesmas 100 g de cartilagem no pH 4,5.

Em 2002 Luo *et al.* testaram a eficiência do tratamento prévio das cartilagens do esterno de frangos de 42 dias com  $MgCl_2$ , utilizando como controle o tratamento com guanidina-HCl, já reconhecido como meio de aumentar a eficiência do processo.

Prepararam 80 ml de uma solução não tamponada de 3 M de  $MgCl_2$  e 80 ml de uma solução de 3 M guanidina-HCl, 10 mM de EDTA disódico e 50 mM de tampão acetato de sódio para manter o pH 5,8 - ambas soluções descritas por Arcanjo *et al.* (1994). Cada solução foi dividida em duas partes iguais, adicionados 1,6 g de cartilagem liofilizada em cada uma e mantidas a 4° C, após 24 h uma de cada amostra foi retirada para análise, e as outras duas restantes após 48 h, resultando em quatro tratamentos diferentes:  $MgCl_2/24$  h,  $MgCl_2/48$  h, guanidina-HCl/24 h e guanidina-HCl/48 h. Os extratos foram dialisados em água deionizada por um período de 48 h, também a 4°C, sendo posteriormente liofilizados e pesados. Para remoção da parte protéica das proteoglicanas, foi utilizado papaína na proporção de 40 mg/g de matéria seca em solução de 5 mM de EDTA, 5 mM de cisteína-HCl e 100 mM de tampão fosfato de potássio, mantendo o pH em 6,5, sendo esta solução mantida a 60°C por 3 h (Karamanos et al, 1992), após foi feita uma digestão adicional com mais 4 mg/g de papaína por mais 3 h. A solução foi centrifugada a 4° C, 10.274 x g durante 30 min., para remover resíduos insolúveis. A solução digerida foi gotejada com 2 volumes de etanol para a precipitação dos polissacarídeos restantes; após 48 h a 4° C, o precipitado foi então extraído por centrifugação também a 4°C, 10.274 x g durante 30 min., lavado duas vezes em etanol 80% e liofilizado. Após tratou-se o precipitado liofilizado com uma solução de 1 M boroidreto de sódio ( $NaBH_4$ ) e 0,05 M hidróxido de sódio (NaOH) por 48 h a 45°C para remoção dos aminoácidos residuais, utilizando 4 ml da solução para cada 20 mg de matéria seca (Michelacci e Horton, 1989). Em seguida fez-se a neutralização com solução 10 M ácido acético e repetidas diálises em água destilada. Então 4 mg da mistura de GAGs em 2 ml de solução tamponada foram aplicados numa coluna de 2,6 x 31 cm de Sepharose CL-6B e eluída com solução neutra de 3 M guanidina-HCl, 0,05 M acetato de sódio e 0,02% de azida sódica (Hunter e Schraer, 1981; Liu *et al.*, 1994) em temperatura ambiente por 28,1 ml/h, coletando-se frações de 4 ml.

Para purificação do SC preparou-se uma solução-mãe de 3 g de tampão Tris-HCl, 2,4 g de acetato de sódio, 1,4 g de NaCl e 0,05 g de albumina sérica bovina, e separou-se porções de 4 mg do produto em 0,8 ml de água deionizada. Para utilização diluiu-se a solução-mãe na proporção de 1:4, dividiu-se em porções de 0,15 ml e acrescentou-se 0,4 U de condroitinase

ABC, misturando esta solução à água com o produto, deixando por 4 h a 37°C (Hunter e Schraer, 1981), sendo que após duas horas acrescentou-se mais 0,1 U de enzimas (Sato *et al.*, 1985).

A eficiência dos métodos foi estimada pela quantidade do SC extraído e pela análise da quantidade nos resíduos. Os resultados confirmaram a melhor eficiência do Guanidine-HCl e ainda mostraram que a extração é mais completa após 48 h em solução:  $85,2 \pm 1,5$  após as 24 h e  $88,1 \pm 4,0$  após as 48 h. A extração em  $MgCl_2$  também se mostrou eficiente, porém sem diferenças significativas entre os tratamentos por 24 ou 48 h:  $76,6 \pm 3,4$  após 24 h e  $73,2 \pm 4,4$  após 48 h. Após esta comparação, os pesquisadores ainda repetiram a extração com o tratamento por  $MgCl_2$  em diversas amostras para quantificar a eficiência do processo; obtendo  $32,9 \pm 4,5$  mg de GAGs por g de cartilagem, e a porcentagem do SC obtida variou entre 69,3 e 81,1%.

## 4 PRINCIPAIS APLICAÇÕES DO SULFATO DE CONDROITINA

### 4.1 Osteoartrose

Doença articular degenerativa (DAD), osteoartrose e osteoartrite são sinônimos usados para classificar a alteração não-infecciosa e progressiva que acontece na cartilagem das articulações sinoviais (Caldeira *et al.*, 2002). Os problemas articulares como osteoartrites acometem tanto animais como seres humanos, sendo situações recorrentes na prática veterinária e médica. Geralmente a lesão causa dor e limitação de movimento, trazendo sofrimento ao seu portador (Hulse, 1998).

A OA é uma doença crônica, multifatorial, que leva à incapacidade funcional progressiva (Coimbra *et al.*, 2002) e constitui-se na mais importante doença reumatológica (Moreira e Carvalho, 2001). Estima-se que aproximadamente 50% das pessoas com idade acima de 60 anos mostram algum sinal clínico de OA e, frequentemente, apenas algumas articulações são afetadas (Bachmeier e Brooks, 1996).

Um estudo realizado em Curitiba-PR, com pessoas acima de 50 anos, demonstrou que 18,61% das mulheres e 7,75% dos homens apresentavam OA de mãos (Rey *et al.*, 2000). Alguns autores já não consideram a OA como um processo inevitável associado ao envelhecimento, visto que um tratamento adequado pode efetivamente controlar ou até reverter a progressão da doença (Kelly, 1998).

Em cães, considerando o peso corporal dos cães grandes e gigantes e as pressões mecânicas sofridas pelos tendões, ossos e articulações, as doenças osteo-articulares são frequentes. Segundo a raça e a idade do cão, a partir dos 7 anos de idade, quase 40% dos cães de porte gigante apresentam lesões osteo-articulares (Borges *et al.*, 2003).

Os objetivos da terapia para OA são diminuir a dor e manter ou melhorar a função articular. Nesses últimos anos numerosos estudos têm investigado o potencial da função dos condroprotetores no reparo da cartilagem articular e na desaceleração do processo degenerativo (BRIEF *et al.*, 2001).

Entre os medicamentos disponíveis para o tratamento da OA há os que são essencialmente analgésicos e que não interferem no curso da doença; bem como os anti-inflamatórios, controversos por seus efeitos colaterais e pelo seu papel na OA, porém, com propriedades analgésicas e anti-inflamatórias indiscutíveis; e, por fim, as drogas modificadoras de estrutura, que retardam a evolução da OA. As medicações ainda podem ser

de uso tópico, intra-articular, oral e injetável (Rezende e Gobbi, 2009). As GAGs sulfatadas, como o SC, possuem efeito anti-inflamatório nestes casos.

As condroitinas 4 e 6-sulfato despertam grande interesse em medicina, por serem estruturas hidrolisáveis e fornecedoras dos monômeros para a síntese dos demais mucopolissacarídeos, todos de grande importância para os tecidos de sustentação, nas doenças articulares e do tecido ósseo. O tratamento com condroitina visa estimular a regeneração da cartilagem articular, diminuir a velocidade de degeneração da cartilagem e, portanto, prevenir ou diminuir a velocidade de desenvolvimento da OA (Borges *et al.*, 2003).

Para facilitar o estudo das opções medicamentosas utilizadas na artrose, costuma-se dividir as drogas em dois grandes grupos: drogas sintomáticas de ação rápida e lenta; dentre as últimas, estão as drogas modificadoras de estrutura e as drogas analgésicas de ação rápida e prolongada. Deve ser sempre lembrado que a terapia farmacológica tem que ser vista como um complemento, nunca uma substituição à terapia não medicamentosa. O objetivo primário do tratamento conservador da OA é o autocuidado (emagrecimento e controle motor) (American College of Rheumatology, 2000).

Drogas sintomáticas de ação lenta devem ser usadas como terapia base para OA; estes compostos não têm ação rápida como as drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINEs) e sua eficácia clínica só pode ser demonstrada em sintomas funcionais após algumas semanas de ingestão regular. Uma vez que administração é descontinuada, elas mostram efeito contínuo por um longo período de tempo. A principal razão por trás do uso desta classe terapêutica é a redução do uso dos AINEs no controle medicamentoso global da OA, e então, conseqüentemente, limitar os riscos muito significativos de erosões do trato gastrintestinal superior, úlceras com sangramento e/ou efeitos renais danosos (Uebelhart, 2008), considerando, principalmente, que os mais acometidos pela OA sejam os idosos.

O SC possui um modo de ação retardado em OA, o que significa que os primeiros efeitos na dor e na mobilidade podem ser avaliados apenas após algumas semanas de terapia (duas a três semanas em humanos), em contraste com analgésicos e AINEs que agem mais rapidamente (um a três dias). O ponto positivo é que quando interrompida a administração diária o SC apresenta um efeito remanescente que pode durar vários meses (aproximadamente três meses com as formulações orais e seis a nove meses com as formulações intra-articulares em humanos) em alguns casos. Esta característica nunca é observada com analgésicos e AINEs, que precisam ser administrados continuamente para fornecer alívio da dor e aumentar a mobilidade em pacientes com OA (Uebelhart, 2008).

O SC, portanto, se enquadra no grupo drogas sintomáticas de ação lenta para o tratamento de OA. Estes são compostos prescritos como medicamentos em países europeus desde muitos anos, porém são vendidas como nutracêuticos nos Estados Unidos. Na Europa, a publicação das recomendações do *EULAR Recommendations for the Treatment of Knee OA* em 2003 listou o SC oral como evidência 1A e força de recomendação A, representando o nível mais alto para uma estratégia terapêutica. No Brasil o SC também é registrado como medicamento.

Uma consequência importante da diferença de registro do SC nos EUA e na Europa é que vendido como medicamento nos países europeus, teve que cumprir os severos critérios de qualidade e segurança e foi completamente analisado considerando suas características fármaco-toxicológicas e processo industrial. Já da forma como é comercializado nos EUA, sem prescrição médica, não é necessário o cumprimento destas exigências. Não há dúvida de que o conteúdo da substância ativa e a qualidade do SC vendido no mercado dos EUA são inferiores a do mercado europeu, o que também poderia explicar por que os resultados dos trabalhos clínicos poderiam diferir tão significativamente entre o EUA e Europa (Uebelhart, 2008).

#### 4.1.1 Cartilagem Articular, Envelhecimento e Fisiopatogenia da Osteoartrose

A cartilagem é constituída por células imersas em uma substância amorfa e gelatinosa. As células da cartilagem (condrócitos) secretam várias substâncias, ficando imersas em seus próprios produtos de secreção, que formam uma matriz firme e elástica. As células mesenquimatosas (condroblastos), das quais surgem os condrócitos, estão localizadas na periferia da cartilagem, em uma membrana chamada pericôndrio (cápsula da cartilagem). A linha de diferenciação do pericôndrio é o meio pelo qual novos condrócitos são adicionados à cartilagem, estes seguem adicionando matriz sobre a cartilagem preexistente, num crescimento chamado aposicional e também dividem-se por atividade mitótica, num crescimento chamado intersticial. A cartilagem é um tecido avascular. Embora vasos sanguíneos passem através da cartilagem, não há capilares intracartilaginosos que supram as necessidades nutricionais deste tecido. A ausência de irrigação no interior vascular no interior dos tecidos cartilaginosos os torna totalmente dependentes da difusão dos metabólitos dos leitos capilares situados no pericôndrio. Os metabólitos devem se difundir da periferia para as células mais profundas do tecido, movimentação que se torna mais difícil com a idade, já que o destino natural da cartilagem é tornar-se mineralizada. A manutenção da matriz

cartilaginosa é responsabilidade do condrócito, estas células têm a capacidade de adicionar GAGs à matriz e devem remover e substituir os componentes amorfos e fibrosos (Banks, 1998).

A cartilagem articular (CA) é, na verdade, produto de secreção do condrócito, formada por uma matriz de colágeno tipo II altamente hidratada conjuntamente com agregados de proteoglicanos. Os proteoglicanos têm rápido ritmo metabólico, ao contrário da quase fixidez do colágeno. O colágeno tipo II é a mais abundante proteína fibrilar presente na CA, perfazendo cerca de 85% do conteúdo de colágeno existente. O principal tipo de proteoglicano presente na CA é o agregano, constituído por um núcleo protéico no qual se aderem muitas cadeias de sulfato de condroitina, com predomínio daquelas 4- ou 6-sulfatadas. A composição e a organização estrutural entre colágeno e proteoglicanos (macromoléculas organizadas numa complexa estrutura aniônica que lhes permitem atuar como uma verdadeira mola biológica) é que possibilita as características de resistência, elasticidade e compressibilidade da CA, tecido que amortece e dissipa forças recebidas, além de reduzir a fricção. As Figuras 8 e 9 mostram um modelo esquemático da estrutura do agregado de proteoglicanas e as relações entre estes e as fibras colágenas na cartilagem articular respectivamente (Rossi, 2008).

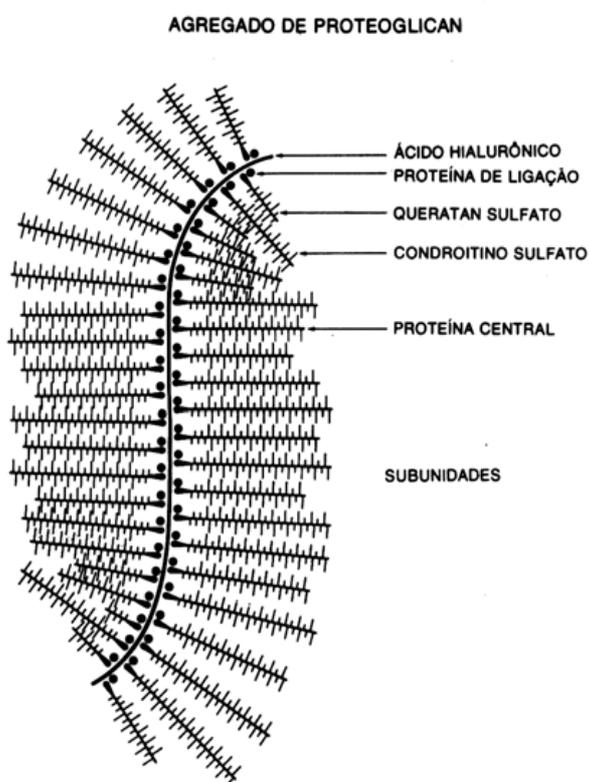


Figura 8: Modelo esquemático da estrutura do agregado de proteoglicanas.  
Fonte: Felice *et al.* (2005)

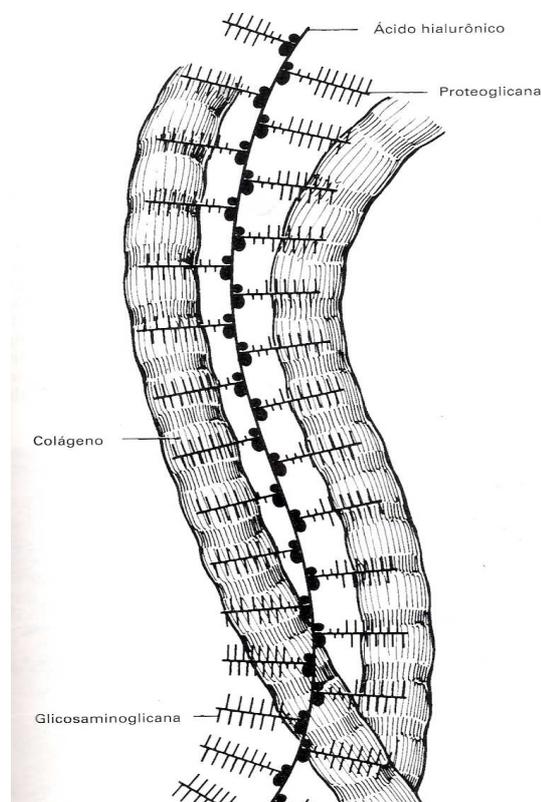


Figura 9: Relações entre agregados de proteoglicanas e as fibras colágenas na cartilagem articular.  
Fonte: Banks (1998)

O condrócito sofre a ação reguladora de mediadores pré-catabólicos, metaloproteases (MMP) e citocinas que promovem a degradação cartilaginosa; e pró-anabólicos, fatores de crescimento que ativam mecanismos de regeneração. Os principais agentes da degradação cartilaginosa são as MMP e enzimas zinco-dependentes, que são distribuídas em três grupos: collagenases, gelatinases e estromelinas; para bloquear suas ações, há os inibidores das MMP. Das citocinas, destaca-se a ação catabólica da interleucina-1 (IL-1), a mais importante, da interleucina-6 (IL-6) e do fator-alfa de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). Dos fatores anabólicos, destacam-se as ações do *insulina-like-growth factor-I* (IGF-I) e do *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) na formação de cartilagem articular e na síntese de proteoglicanos (Kraan *et al.*, 2002; Velosa *et al.*, 2003).

O envelhecimento cartilaginoso traz consigo um menor poder de agregação dos proteoglicanos, aliado à menor resistência mecânica da cartilagem. O colágeno adquire menor hidratação, maior resistência à collagenase e maior afinidade pelo cálcio. A CA tem uma capacidade reparadora limitada, que mais ainda se estreita com o envelhecimento e/ou quando da eclosão de condições degenerativas. Evidências mostram que a síntese e a degradação do colágeno tipo II se associam com a matriz pericelular e se mantém em um estado de equilíbrio dinâmico ao longo dos anos, não apresentando as alterações moleculares comumente associadas à OA. Enquanto os condrócitos de idosos têm menor capacidade para manter e reparar a CA. Demonstrou-se também que estresses oxidativos contribuem para a senescência dos condrócitos, fato que explica, em parte, o maior risco de OA com a idade avançada (Yudoh, 2005).

Muitas das características físico-químicas da matriz extracelular da CA se devem às proteoglicanas, seu principal constituinte. Estas, além de capacitarem a cartilagem a suportar cargas compressivas variáveis, influenciam diretamente a atividade dos condrócitos. Muitas das interações biológicas decorrem das cadeias de GAGs (principalmente cadeias de SC), unidas por ligação covalente a núcleos protéicos. Com o envelhecimento da CA, reconhecem-se muitas alterações na estrutura do agregado e dos agregados multimoleculares que ele forma com o hialuronato, fruto de processos anabólicos e catabólicos, geridos por eventos celulares e extracelulares, numa extensão que varia segundo o tipo, articulação, local e profundidade. Assim, a síntese e o *turn over* de agregados sofrem influência da idade e do local de origem. A função reparadora dos condrócitos diminui progressivamente com a idade, o que é demonstrado por uma síntese decrescente de agregados, e por menor capacidade para a formação de agregados moleculares de grande tamanho. A idade do indivíduo é a principal responsável pela composição da cartilagem. Compreendem-se assim o motivo de serem as

doenças articulares mais frequentes na velhice. Estudos em cartilagem humana femoral mostram que alterações em sua composição química são mais pronunciadas do nascimento até os 20 anos de idade, período em que diminui o conteúdo dos dissacarídeos 4-sulfatos. Com o progredir da idade, diminui-se a espessura da cartilagem e a composição predominante passa a ser de 6-sulfatos (Rossi, 2008).

A modificação não enzimática de proteínas tissulares por açúcares redutores é uma característica marcante do envelhecimento. No envelhecimento cartilaginoso, a rede colágena se torna cada vez mais rígida, paralelamente ao fato de apresentar níveis elevados de pentosidina, cujos produtos finais de glicação se acumulam com a idade. Tanto na cartilagem velha quanto naquela experimentalmente enriquecida com produtos finais de glicação, a taxa da síntese dos proteoglicanos é inversamente proporcional ao grau de glicação. Assim, o aumento idade-relacionada dos produtos de glicação na cartilagem pode ser responsável, em parte, pelo declínio na capacidade de síntese cartilaginosa (Rossi, 2008).

A estimulação mecânica de condrócitos articulares humanos *in vitro* aumenta a produção de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) de agrecanos, enquanto diminui a de RNAm de metaloproteinase-3, essa resposta condroprotetora ao estímulo mecânico não ocorre em condrócitos provenientes de cartilagens osteoartíticas (Rossi, 2008).

A estabilidade da CA depende das atividades biossintéticas dos condrócitos, que se contrapõem à degradação normal das macromoléculas da matriz. Embora estresses mecânicos e químicos possam ter efeitos desastrosos sobre a integridade estrutural da cartilagem, eles parecem ser determinantes apenas para alguns indivíduos, não explicando o declínio irreversível idade-dependente das respostas aos fatores de crescimento dos condrócitos e à síntese da matriz intersticial. Essas alterações, também observadas em cultura de células, refletem mais um processo intrínseco de envelhecimento do condrócito. Sabe-se que os condrócitos de idosos têm menor capacidade de proliferação e capacidade reduzida de formar tecido novo. A hipótese de que o envelhecimento celular está regulado por um relógio biológico intrínseco associado a alterações nos telômeros (sequências de DNA localiza das nas extremidades dos cromossomos necessárias para a replicação dos mesmos) motivou estudos semelhantes nos condrócitos. Observou-se que, com o aumento da idade, ocorre um decréscimo tanto da atividade mitótica quanto do comprimento médio do telômero, ao lado de maior atividade da  $\beta$ -galactosidase, um marcador de senescência (Martin e Buckwalter, 2001; Pluijm *et al.*, 2004). Esses achados comprovam o efeito da senescência na replicação dos condrócitos *in vivo*, o que explica, em parte, a associação entre idade e OA. Envelhecimento e degeneração da CA na OA são processos distintos, todavia, há uma forte associação entre a

idade e a incidência e prevalência da OA. Ao contrário da impressão inicial, a apoptose de condrócitos não é um fenômeno generalizado que ocorre com o envelhecimento da cartilagem humana, tampouco na osteoartrite (Aigner *et al.*, 2001).

Apesar de OA ser uma doença de toda a articulação (cartilagem, ligamentos, sinóvia e osso), a lesão inicial costuma ser na cartilagem articular. A OA tem um forte componente genético e, na maioria das vezes, tem a sobrecarga mecânica como um iniciador do processo de lesão da cartilagem, que acaba evoluindo para um ciclo vicioso inflamatório, perpetuando a degradação articular. Essa via inflamatória tem como agentes primários a IL-1 e o TNF- $\alpha$ , que induzem maior expressão de MMP e óxido nítrico, os principais agentes catabólicos produzidos pelos condrócitos em resposta à lesão, além de mais IL-1. O tratamento da artrose pode ter como alvo tanto a sobrecarga mecânica que leva à lesão articular quanto o ciclo inflamatório que perpetua essa lesão, em um ou vários pontos dessa cascata (American College of Rheumatology, 2000).

Os eventos patológicos da OA ocorrem como resultado de diversas interações entre a cartilagem articular e tecidos adjacentes, em resposta à lesão dos condrócitos ou da matriz (Johnston, 1998). Uma vez ocorrida a lesão, inicia-se a degradação da matriz por enzimas e mediadores da inflamação. Ao mesmo tempo, os componentes da cartilagem tentam impedir a progressão da degeneração (Lipowitz, 1993). Ocorrem quebra dos proteoglicanos e da rede de colágeno, aumento da quantidade de água com conseqüente incremento do espaço entre as fibrilas colágenas, da espessura da cartilagem, necrose dos condrócitos superficiais e redução de sua densidade. O edema e a fibrilação da camada superficial resultam em irregularidade da superfície articular. O aumento da hidratação da cartilagem e a diluição das proteoglicanas produzem alterações nas propriedades mecânicas da cartilagem, com perda da integridade da superfície e presença de fissuras verticais que progridem para erosões profundas e exposição do osso subcondral (Vignon *et al.*, 1983; Lipowitz, 1993; Vaughan-Scott e Taylor, 1997). Há diminuição do conteúdo de proteoglicanas, diretamente proporcional à gravidade da doença (Lipowitz, 1993). A cartilagem reage com mecanismo compensatório, tentando impedir a progressão ou reparar o processo degenerativo (Vignon *et al.*, 1983; Schiavinato *et al.*, 1989; Johnston, 1997). Os condrócitos viáveis tornam-se volumosos, dispostos em grupos; ocorrem hiperatividade e aumento da divisão nas camadas média e profunda; e hipertrofia da cartilagem. Portanto, coexistindo com a redução da densidade celular na camada superficial, há aumento da espessura da cartilagem (Vignon *et al.*, 1983; Schiavinato *et al.*, 1989). A hipertrofia da cartilagem está também associada ao aumento da síntese e da secreção dos componentes da matriz pelos

condrócitos (Vignon *et al.* 1983; Schiavinato *et al.* 1989). Essas alterações podem ser acompanhadas de esclerose do osso subcondral e formação de osteófitos pericondrais (Mellwraith, 1996).

A membrana sinovial desempenha importante papel na evolução da OA. As alterações da membrana associadas à doença articular degenerativa variam de inflamação média à moderada e incluem hipertrofia e hiperplasia das células sinoviais, infiltração linfoplasmocitária, aumento da vascularização nos tecidos sinoviais e fibrose subsinovial (Lipowitz, 1993). A membrana libera enzimas proteolíticas no espaço articular que virão a agir na degradação da cartilagem (Vaughan-Scott e Taylor, 1997).

#### 4.1.2 Mecanismo de Ação do Sulfato de Condroitina na Osteoartrose

Agentes condroprotetores acumulam-se no fluido sinovial e cartilagem e supostamente estimulam a saúde da cartilagem fornecendo os precursores necessários para manutenção e reparo cartilágneo (McLaughlin e Roush, 2002b). São utilizados glicosamina, diacereína, ácido hialurônico, glicosaminoglicanos polissulfatados, pentosana polissulfatada e o SC.

Pela conformação de sua estrutura, as GAGs comportam muita água, o que permite a eles a atuação no suporte dos componentes celulares e fibrosos do tecido (Davidson, 2000). Além disto, o SC aparentemente tem efeitos antiinflamatórios e reguladores dos condrócitos, sinoviócitos e leucócitos. Há evidências de que as GAGs reduzem a perda de proteoglicanas e de colágeno, ao inibirem enzimas degradativas da cartilagem (hialuronidase, catepsina, elastase, collagenase e metaloproteinases neutras); além de estimular a síntese de proteoglicanas e colágeno, sendo capazes de aumentar a proliferação dos condrócitos e a biossíntese da matriz (Altman *et al.*, 1989 e 1990; Francis *et al.*, 1989; Clark, 1991). Esses efeitos suportam a hipótese de que as alterações da cartilagem articular na OA podem ser manejadas e que o uso das GAGs pode complementar o tratamento (Altman *et al.*, 1989; Clark, 1991; Biasi *et al.*, 2005).

Em alguns estudos, o SC exógeno tem demonstrado além da estimulação direta da cartilagem, inibição da IL-1 e MMP (Karzel e Lee, 1982; Mathieu, 2002), e bloqueio da ativação do sistema complemento, retardando a degradação da cartilagem e outros tecidos das articulações (Davidson, 2000).

A condroitina é uma molécula grande, que é quebrada ao ser absorvida pelo intestino. Na sua formação, há glicosamina que além de funcionar como substrato, age diretamente no condrócito, estimulando a síntese de proteoglicanas e inibindo a de MMP, além de inibir os efeitos da IL-1 e a produção de óxido nítrico e: *transforming growth factor* (TGF). Tem ação

também sobre o osteoclasto e sobre a sinóvia (Jimenez e Dodge, 1997), aumentando a produção de ácido hialurônico pelos sinoviócitos (Toffoletto *et al.*, 2005). A glucosamina também é utilizada isoladamente no tratamento da OA, análises recentes mostraram que a glucosamina tem, além da melhora sintomática, um efeito de diminuir o estreitamento articular (McAlindon *et al.*; 2000 Towheed *et al.*, 2005).

#### 4.1.3 Osteoartrose em cães

A lesão inicial da cartilagem pode ser idiopática ou resultar de ações mecânicas anormais sobre a cartilagem, podendo variar desde deformidades congênitas, conformação anormal, ou traumatismos (Nelson e Couto, 1998).

O colapso da estrutura de sustentação da cartilagem inicia-se com a condromalácia, seguida de fibrilação e fissuras verticais, localizadas, respectivamente, nas camadas superficial e profunda da cartilagem articular. Com a progressão da fibrilação na superfície, as alterações tornam-se mais profundas no tecido, a cartilagem é perdida e o osso subcondral torna-se espessado. Nódulos de osso ou osteófitos frequentemente formam-se na região lateral da interface cartilagem osso, refletindo uma reparação inadequada da cartilagem (Caldeira *et al.*, 2002).

Rigidez após repouso e claudicação são os sinais cardeais da OA que os proprietários frequentemente detectam a princípio. Infelizmente quando estes sinais são detectáveis, o processo de degeneração articular já se encontra em estágio avançado. Logo, percebe-se como o diagnóstico precoce é imprescindível (Budsberg e Fox, 1999; Piermattei e Flo, 1999; Roush *et al.*, 2002; McLaughlin e Roush, 2002a; Pedersen *et al.*, 2004). A claudicação é geralmente causada pela dor, que emana do periósteo, dos osteófitos, das microfraturas trabeculares, do osso subcondral exposto por eburnação, da distensão da cápsula e dos ligamentos e da sinovite (Piermattei e Flo, 1999; Lust, 2002).

No diagnóstico, o exame radiográfico convencional, associado aos sinais clínicos, é a base para o diagnóstico, devendo ser feitas duas projeções padronizadas em ângulos retos entre si (Dunn, 2001). As principais alterações a serem avaliadas nas radiografias convencionais são: diminuição do espaço articular, aumento da densidade do osso subcondral (esclerose óssea subcondral), neoformações ósseas nas margens articulares (osteofitose) e remodelação óssea (Carrig, 1997). O osso subcondral pode tornar-se fino, espessado, denso ou irregular. Densidades ósseas intra ou periarticular podem ser vistas devido a fraturas por avulsão, calcificação da cápsula ou do tendão, ou calcificação de fragmentos articulares livres. A

proliferação do periósteo periarticular ocorre nos locais onde a cápsula articular e os ligamentos se inserem e nas margens da cartilagem articular. Esta proliferação é usualmente macia e uniformemente mineralizada com margens bem definidas. A progressão das mudanças durante as radiografias comparativas irá mostrar as alterações progressivas ao longo dos meses (Burk, 1996). Porém, a avaliação radiográfica convencional não é suficiente para o diagnóstico específico, necessitando de outros procedimentos auxiliares (Carrig, 1997). O grau de OA definida radiograficamente, às vezes, não tem relação com o grau de claudicação ou alterações observadas clínica, macroscópica ou histologicamente (May, 1996; McIlwraith, 1996; Rendano e Shoup, 1998). Alguns animais com achados radiográficos mínimos apresentam claudicação acentuada, enquanto outros, com alterações degenerativas graves, claudicam de forma discreta (Rendano e Shoup, 1998).

Além do exame radiográfico, podem ser utilizados artrografia, ressonância magnética, artroscopia e artrocentese. Artrografia e ressonância magnética são mais usadas na articulação escápulo-umeral, na articulação fêmoro-tíbio-patelar podem ser utilizadas para detectar a presença de corpos livres no espaço articular. A ressonância magnética possibilita obter imagens em múltiplos planos, com ótimo contraste entre tecidos moles e cartilagenosos. A imagem da ressonância pode revelar alterações agudas e crônicas da cartilagem e do osso subcondral, tais como fraturas condrais e cistos subcondrais (Piermattei e Flo, 1999; Caldeira *et al.*, 2002). Artroscopia é um método que consiste em introduzir uma cânula de maneira asséptica na cavidade articular, dando a capacidade de visualizar diferentes posições oferecendo uma avaliação minuciosa do interior da cavidade. Fibrilações e ulcerações da cartilagem, ruptura de ligamentos, fragmentação dos meniscos e formação de osteófitos, podem ser rapidamente detectados pelo exame artroscópico. Além disso, as afecções da membrana sinovial são diagnosticadas pelo espessamento, hiperemia e formação de vilosidades anormais (Caldeira *et al.*, 2002). Artrocentese é a retirada e a avaliação do líquido sinovial. Pedersen *et al.* (1978) declaram que o maior valor deste exame consiste em determinar se a causa da lesão é inflamatória ou não. Nas condições inflamatórias, o padrão eletroforético do líquido sinovial está alterado, os açúcares estão diminuídos, as populações de células estão aumentadas e as proporções entre os tipos celulares estão alteradas (Piermattei e Flo, 1999).

O programa de tratamento inclui redução de peso, exercícios físicos controlados, alteração de ambientes, agentes modificadores de ação lenta como o SC e medicação antiinflamatória. O manejo da OA é um compromisso para o resto da vida e envolve trabalho intenso, sendo fundamental o comprometimento dos proprietários (Millis, 2001).

Práticas alimentares apropriadas (não superalimentar filhotes) e dietas corretamente balanceadas podem ajudar a reduzir a incidência e desenvolvimento da OA. Mas o mais importante é associar um programa de exercícios para assegurar um emagrecimento constante e a manutenção do peso ideal. Animais com OA melhoram o quadro clínico após a perda de peso (Martinez, 2000; Millis, 2001; McLaughlin e Roush, 2002b).

A atividade física melhora a força, a resistência muscular e a coordenação, também proporciona uma carga frequente na cartilagem articular, o que aumenta o metabolismo da cartilagem e síntese dos proteoglicanos (Piermattei e Flo, 1999; McLaughlin e Roush, 2002b; Martinez, 2000). Natação e hidroterapia permitem às articulações realizarem movimentos de longo alcance enquanto que o peso do animal é minimizado por estar flutuando na água. O peso sobre o ponto de apoio pode ser ajustado de acordo com a profundidade da água. O ideal é começar gradativamente aumentando a duração das sessões conforme o paciente for ganhando resistência (McLaughlin e Roush, 2002b).

O ultra-som terapêutico é um método útil para a aplicação de calor nos animais, e tem sido utilizado nos tratamentos de luxações, OA, artrite reumática, bursite, tendinite entre outras condições, sendo capaz de aquecer os tecidos entre 40 a 45°C na profundidade de 5cm, sem elevar consideravelmente a temperatura dos tecidos superficiais (Piermattei e Flo, 1999; Caldeira *et al.*, 2002).

O método mais utilizado experimentalmente para estudos da OA em veterinária é a secção do ligamento cruzado cranial. A ruptura do ligamento cruzado cranial é uma lesão frequente nos cães, e a restauração da função normal do joelho é difícil de ser obtida, mesmo após tratamento (Järvinen *et al.*, 1995). O procedimento cirúrgico, com o objetivo de estabilizar a articulação e reduzir a progressão da OA (Rooster *et al.*, 2001; Sandman e Harari, 2001) é amplamente recomendado, porém em 85 a 90% dos casos operados a OA progride, independentemente da técnica cirúrgica adotada. Pearson (1971), Heffron e Campbell (1979) e Vasseur e Berry (1992) relataram progressão da OA em joelho de cães mesmo após a reconstrução do ligamento cruzado cranial.

Arias *et al.* (2003) avaliaram a associação de hialuronato de sódio (HS) e SC no tratamento da OA em cães. Dez cães sem raça definida foram submetidos à secção artroscópica do ligamento cruzado cranial visando o desenvolvimento da OA. Após 21 dias, foi substituído cirurgicamente o ligamento cruzado cranial pela fásia-lata em todos os animais e iniciado o tratamento com associação de HS e SC em cinco cães, sendo os remanescentes utilizados como grupo-controle. Histologicamente, o efeito da associação de

HS e SC foi mais evidente na membrana sinovial, observando-se regeneração da camada íntima e diminuição da infiltração linfoplasmocitária na sub-íntima.

Biase *et al.* (2005) avaliaram o efeito do SC na evolução da OA induzida experimentalmente em cães, após a reconstrução do ligamento cruzado cranial. Vinte cães hígdos, sem raça definida, com peso corpóreo entre 19 e 25kg, foram submetidos à desmotomia do ligamento cruzado cranial. Trinta dias após, foram separados em dois grupos de 10 animais. Um grupo foi submetido à reconstrução do ligamento cruzado com uso de aloenxerto de ligamento patelar congelado, o outro não. Trinta e um dias após a desmotomia, cada grupo foi dividido em dois subgrupos de cinco animais. Um recebeu sulfato de condroitina, o outro não. Os cães foram avaliados clínica e radiograficamente antes da desmotomia e aos 30, 60 e 90 dias após a desmotomia. No último momento foram realizados exames macro e microscópico.

Ao exame radiográfico, observaram-se osteófitos, entesiófitos e erosão do osso subcondral no joelho dos cães. Houve progressão das alterações ósseas no período pós-operatório em todos os subgrupos, o que está de acordo com Pearson (1971), Heffron e Campbell (1979) e Vasseur e Berry (1992), que relataram progressão da OA mesmo nos cães submetidos à cirurgia para estabilização articular. Ela foi mais acentuada no subgrupo sem cirurgia e sem SC, quando comparada à do subgrupo sem cirurgia e com SC, ao final do período de observação. Esse fato pode demonstrar o efeito protetor do SC, como citado por Diaz *et al.* (1996), Hannan *et al.* (1987), Beale *et al.* (1990), Pipitone (1991) e Lees (1999), mesmo com a instabilidade articular.

Ao exame macroscópico, os joelhos dos cães sem cirurgia e com tratamento com SC mostraram pigmentação alaranjada na membrana sinovial com menor intensidade do que a dos cães do subgrupo sem cirurgia e sem tratamento com SC, o que pode indicar menor grau de sinovite.

Concluiu-se que condroitina reduz a velocidade das alterações ósseas radiográficas compatíveis com OA em joelho de cães, dentro de 30 a 60 dias de tratamento e que a reconstrução ligamentar associada ao SC promove melhora mais rápida na função do membro quando comparada com a reconstrução isoladamente.

Melo *et al.* (2008) estudaram o efeito do SC para o tratamento da OA em cães, comparando com o HS e com ênfase na análise histológica. Submeteram 15 cães, sem raça definida, de ambos os sexos, de peso entre 18 e 25 kg, à secção artroscópica do ligamento cruzado cranial para indução da OA. Após três semanas de instabilidade articular, o ligamento cruzado cranial foi substituído pela fásia lata segundo a técnica de Schwalder

(1989) e os animais foram distribuídos em três grupos de cinco. Os animais do grupo I, controle, não receberam tratamento medicamentoso; os do grupo II, 24 mg/animal de SC, por via intra-muscular (IM), de cinco em cinco dias, totalizando seis aplicações; e os do grupo III foram tratados com HS na dose de 20 mg/animal, por via intra-venosa (IV), de cinco em cinco dias num total de três administrações. Ao final de 90 dias, os animais foram eutanasiados e procedeu-se a colheita e o processamento histológico da membrana sinovial e da cartilagem articular para avaliações morfológica e morfométrica.

As alterações mais marcantes foram observadas na cartilagem articular e eram de natureza degenerativa. A camada superficial mostrava-se irregular, com sinais de fibrilação, edema e lise da matriz em todas as secções de cartilagem avaliadas, independentemente do grupo, alterações características da OA. Com a instabilidade articular, há desequilíbrio na distribuição das forças sobre a superfície articular, levando à ruptura dos arranjos de proteoglicanas e consequente aumento da hidratação da cartilagem (edemaciação) com exposição das fibrilas de colágeno (fibrilação). Apesar disso, os condrócitos ainda guardavam a capacidade de proliferação e, com o aparecimento de clones celulares, tentavam a reparação da superfície articular lesada. Essa associação de lesões degenerativas e regenerativas foi observada por Vignon *et al.* (1983), que mencionaram ser a hipertrofia da cartilagem um evento inicial da OA induzida pela instabilidade articular. Isso demonstra a capacidade de remodelação do tecido em resposta ao estresse mecânico anormal.

Nos animais tratados com SC e HS, a cartilagem apresentou acentuada hipocelularidade ou até ausência da camada superficial. Isso foi observado por Vignon *et al.* (1983), Schiavinato *et al.* (1989), e Marshall e Chan (1996), que consideraram a redução da densidade de condrócitos na camada superficial da cartilagem como lesão precocemente detectada pela análise histológica em animais submetidos à instabilidade articular. Dessa forma, pode-se supor que as drogas utilizadas retardem o processo degenerativo. Entretanto, perda de basofilia da matriz, vacuolização, picnose ou necrose de condrócitos, fissuras e erosões da superfície da cartilagem foram alterações marcantes no grupo controle, bem como no tratado com HS.

Nos animais tratados com SC, os condrócitos apresentavam-se dispostos de forma colunar com aumento da basofilia da matriz extracelular. Esses achados refletem hiperatividade dos condrócitos e divisão celular, mimetizando o retorno da cartilagem ao crescimento. A superfície articular estava mais regular, com poucas áreas de fibrilação e edema. O tratamento, portanto, com SC pareceu minimizar ou retardar a evolução de lesões

degenerativas da cartilagem. Esses resultados são coincidentes com os de Altman *et al.* (1989) e Francis *et al.* (1989), os quais sugeriram que as GAGs alteram a evolução da OA.

O número de condrócitos da cartilagem articular dos grupos II ( $47,24 \pm 9,94$ ) e III ( $45,32 \pm 11,53$ ) foi semelhante entre si e significativamente maior em relação ao grupo I ( $33,77 \pm 11,02$ ). O aumento do número de células, mesmo com redução da densidade celular na superfície articular é determinado pela divisão dos condrócitos nas zonas média e profunda em resposta ao estresse anormal causado pela instabilidade articular (Vignon *et al.*, 1983), porém nos grupos II e III, a proliferação de condrócitos foi significativa. No caso do HS, apesar do número elevado de condrócitos, muitos pareciam inviáveis, apresentando citoplasma vacuolizado, núcleos picnóticos e outros necróticos. Já no grupo tratado com SC, a elevada densidade celular foi acompanhada de aumento da altura da cartilagem e os condrócitos mostravam-se ativos e responsivos à lesão da OA. Achados similares foram observados por Francis *et al.* (1989), os quais sugeriram que as GAGs aumentam a mitose celular da cartilagem.

A Figura 10 mostra a análise histológica da patela de animal tratado com SC (107,1x). É possível visualizar o aumento da celularidade nas camadas média e profunda com fibrilação da camada superficial (seta), proliferação celular e condrócitos dispostos de forma colunar.

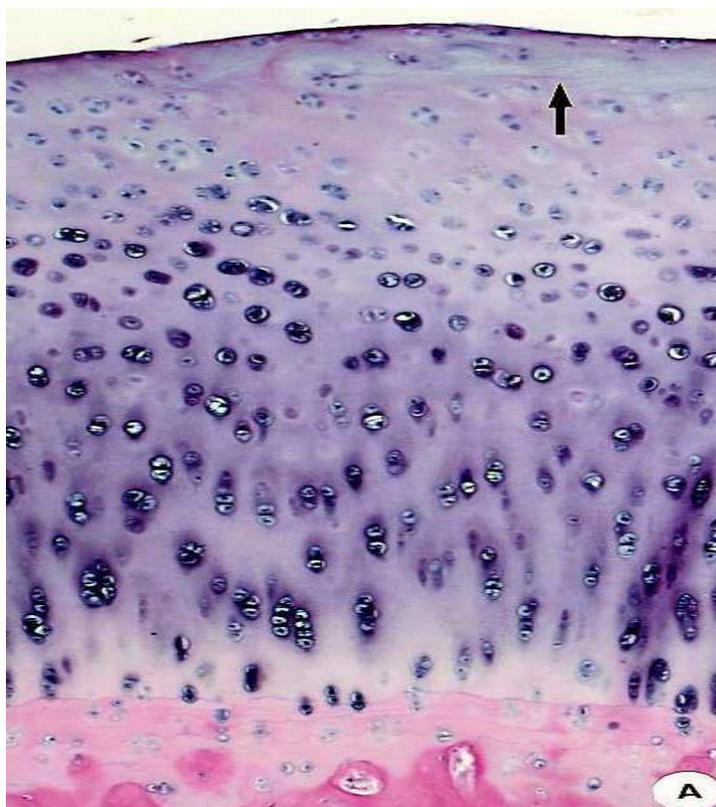


Figura 10: Análise histológica da patela de animal tratado com SC. Aumento 107,1 X. Fonte: Melo *et al.*, 2008

O aumento do número de condrócitos permite concluir que o SC estimulou os condrócitos a se proliferarem e a produzirem matriz extracelular, o que determinou o aumento do número de células e conseqüentemente da altura da cartilagem. As células demonstraram-se responsivas ao tratamento, aumentando a atividade sintética e secretora de GAGs. Altman *et al.* (1989) e Francis *et al.* (1989) também afirmaram que as GAGs aumentam a capacidade biossintética da cartilagem articular. Schiavinato *et al.* (1989), no entanto, consideram tal fato aceitável somente em articulações com OA avançada e que os condrócitos viáveis tornam-se volumosos e com grande número de organelas, sugerindo aumento das atividades de síntese e secreção.

Apesar do aumento significativo do número de condrócitos, o HS não determinou elevação expressiva da altura da cartilagem total ou corada pela safranina-O. Isso poderia ser explicado pela inviabilidade da maioria dos condrócitos, já mencionada, que determinou baixa atividade de síntese da matriz extracelular. O aumento do número de condrócitos, neste grupo, foi tipicamente zonal e, principalmente, nos locais com extensas lesões da camada superficial, características semelhantes às do grupo-controle. Já com o SC, o aumento do número de células foi distribuído de forma homogênea por toda a cartilagem articular.

Este estudo teve resultados mais satisfatórios, comparado a um estudo semelhante também realizado por Melo *et al.* em 2003, onde avaliaram clínica e radiograficamente os efeitos do SC e do HS no tratamento da articulação femorotibiopatelar de cães com OA induzida experimentalmente.

Da mesma forma que o experimento citado anteriormente, foram utilizados 15 cães, sem raça definida, de ambos os sexos, pesando entre 18 e 25 kg, submetidos à secção artroscópica do ligamento cruzado cranial para desestabilização articular e indução da OA. Após três semanas de instabilidade articular, o ligamento cruzado cranial foi substituído pela fásia lata. Os animais foram divididos em três grupos de cinco. Nos do grupo I fez-se somente a substituição do ligamento cruzado cranial (controle). Os do grupo II receberam 24 mg/animal de SC, via IM, de cinco em cinco dias, totalizando seis aplicações. Os do grupo III foram tratados com HS na dose de 20 mg/animal, via IV, de cinco em cinco dias, num total de três aplicações. Os animais foram observados por 90 dias, e avaliados clinicamente quanto à claudicação, à capacidade de suportar peso no membro afetado, à mensuração da atrofia muscular e à amplitude de movimento articular. Ao final, foram encaminhados para exame radiográfico.

Estatisticamente não se observou diferença significativa entre os graus de claudicação dos animais que receberam SC e HS quando comparados entre si e com os do grupo-controle.

Também não se observaram diferenças significativas quanto às características amplitude de movimento, circunferência da coxa e pressão de apoio do membro. O resultado clínico encontrado neste trabalho pode ser explicado pela ausência de resposta aos tratamentos ou por resposta discreta, não detectável pelos exames físicos. Radiograficamente, aos 90 dias de estudo, o grupo tratado com SC não apresentava sinais evidentes de uma cartilagem osteoartrótica, enquanto os outros dois grupos apresentavam osteofitose, mostrando que o SC estava agindo satisfatoriamente na cartilagem. Os resultados não foram tão satisfatórios devido a fatores já mencionados por Innes *et al.* (2000) como a ação lenta desses fármacos e a necessidade de avaliação dos efeitos medicamentosos por tempo prolongado no tratamento da OA.

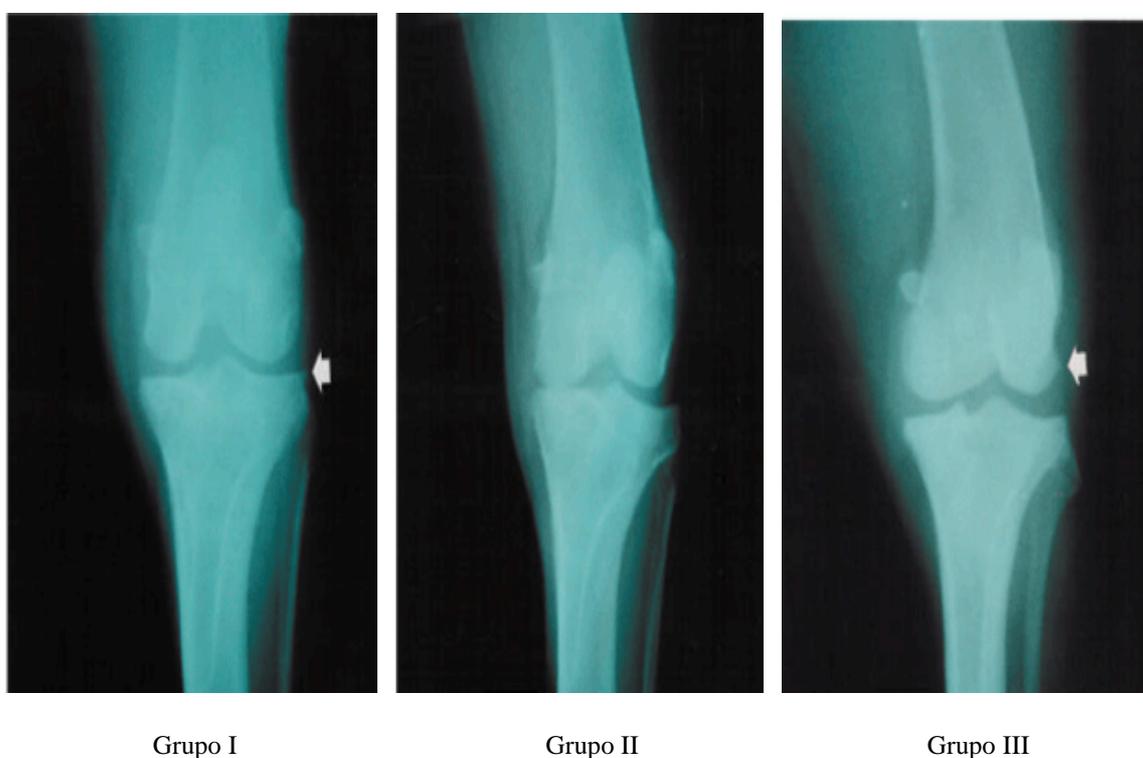


Figura 11: Radiografias do joelho de cão - sem tratamento medicamentoso (Grupo I), tratado com SC (Grupo II) e tratado com HS (Grupo III). As setas mostram a osteofitose nos animais não-tratado e tratado com HS. Fonte: Melo *et al.* (2003)

#### 4.1.4 Sulfato de Condroitina na Osteoartrose em Humanos

Uebelhart (2006) revisou e avaliou os efeitos do SC oral em casos de OA do joelho. Foram estudados casos de 1.443 pacientes da França, Suíça, Bélgica, Hungria e República Tcheca. Foram utilizados SC de várias origens (bovino, tubarão e ave). Além da origem o

tratamento diferia na dose, 500-1200 mg/dia; tempo de tratamento, 3-24 meses; e modo de administração, diário e contínuo (3-24 meses) ou intermitente (2 x 3 meses). Os resultados desta pesquisa foram muito positivos para o uso do SC como tratamento da OA do joelho, provando que a administração a longo prazo de SC oral é segura, bem tolerada e completamente indicada para controlar os sintomas da dor e aumentar a mobilidade global do joelho nos pacientes com OA. Estimou-se também que o SC poderia não apenas atuar positivamente nos sintomas e mobilidade dos pacientes como também modificar o curso da lesão, parando sua progressão.

Outros três estudos foram analisados, um com pacientes da Suíça e dois com pacientes da França, Itália e Bélgica. Um informou um esquema de tratamento intermitente com SC oral 800 mg por dois períodos de três meses diariamente durante um ano (Uebelhart, 2004), enquanto os outros dois usaram um esquema de tratamento com CS oral 800 mg contínua e diariamente administrado por um total de 12 (Uebelhart, 1998) e 24 (Michel *et al.*, 2005) meses. A progressão radiológica foi avaliada em todos os três estudos usando o estreitamento espacial mediano na articulação femorotibial, medido com uma análise digitalizada de alta qualidade de raios-X do joelho. Os resultados das análises digitalizadas foram idênticos nestes estudos, mostrando a eficiência do SC mesmo com uso intermitente.

Há também trabalhos do Departamento de Reumatologia da Universidade de Ghent, Bélgica sobre a OA dos dedos de 284 pacientes. Sendo administrado SC oral 1200 mg/dia durante um período de três anos, sendo os resultados avaliados por raios-X das articulações interfalangianas. Os resultados deste estudo mostraram que houve uma diminuição significativa no número de pacientes com OA erosiva em novas articulações no grupo de pacientes tratados com SC (Verbruggen, 1998).

Bourgeois (1998) testou a diferença da administração da dose diária recomendada em uma ou três frações, comparando ainda com um grupo placebo. Foram usados no experimento 127 pacientes: 40 foram tratados com dose única diária de 1200 mg, 43 com três doses diárias de 400 mg e 44 com cápsulas placebo. O período de tratamento foi de três meses. Nos dois grupos de tratamento com SC houve redução significativa dos sintomas, sem diferença entre os grupos e sem nenhum efeito colateral, no grupo placebo houve uma leve redução dos sintomas.

Todos estes trabalhos provaram a eficácia do SC na OA sintomática do joelho e dos dedos. Além disso, a tolerabilidade e o perfil de segurança da substância mostraram ser muito favoráveis.

## 4.2 Usos em Oftalmologia

A condroitina não sulfatada e a condroitina-6-sulfato são encontradas na córnea de mamíferos (Tabela 1). Além disto, o SC possui diversas características que o tornam recomendado para o tratamento sintomático de todas as formas de insuficiência lacrimal, alterações corneanas por déficit de mucopolissacarídeos, ceratoconjuntivites secas e como auxiliar da reepitelização corneana. Atualmente existem diversas soluções oftálmicas comerciais que utilizam o SC como princípio ativo, sendo usadas tanto na medicina humana como na veterinária.

### 4.2.1 Ceratoconjuntivite Seca

Devido a sua alta viscosidade e tempo de permanência na superfície ocular, esta substância reduz os sintomas da ceratoconjuntivite seca. Desde 1987, o sulfato de condroitina é amplamente usado como lubrificante ocular para o tratamento sintomático de todas as formas de insuficiência lacrimal (Gehlen, 2005).

Cansi *et al.* (2006) realizaram tratamento de ceratoconjuntivite seca em um cão com colírio a base de ciprofloxacina associado ao SC em intervalos de 12 horas e colírio lubrificante a base de dextrano 70 e hipromelose, que funciona como lágrima artificial, três vezes ao dia durante 30 dias. Após uma semana foi feita nova avaliação do quadro clínico, onde foi constatado a ausência de pus, podendo ser vista a córnea e a conjuntiva que estavam brilhantes e com lubrificação. A membrana nictante ainda estava edemaciada. O animal não demonstrava mais sinais de desorientação.

Outro tratamento relatado utilizando sulfato de condroitina foi realizado em um cão que apresentava ceratoconjuntivite seca bilateral secundária a cinomose. Foi inicialmente tratada com ciclosporina 0,2%, porém sem melhora. Foi utilizado então sulfato de condroitina, observando-se melhora no prazo de cinco dias, com o desaparecimento dos sinais clínicos (Defante Jr. 2006).

### 4.2.2 Úlcera de Córnea

Outra utilização do SC é o tratamento para úlceras de córnea. O SC estimula a síntese de proteoglicanos por mecanismos intra e extracelulares. Em adição a este efeito restaurativo, a incorporação do SC diminui o processo inflamatório agindo diretamente sobre as enzimas,

inibindo o sistema complemento e a atividade anti-prostaglandina (Brandão *et al.*, 2003). Além disso, as GAGs possuem ação inibidora da plasmina, uma enzima fibrinolítica encontrada em altas concentrações em córneas lesadas (Wouk *et al.*, 2006).

Foi realizado um estudo para avaliar a eficácia do SC a 20% no tratamento de úlcera de córnea experimental em coelhos. Utilizaram-se 15 coelhos, divididos em tratado e não tratado, subdivididos em três grupos de cinco animais cada. Em todos os animais foram realizados os procedimentos de ceratectomia do tipo lamelar, feita em ambos os olhos, sendo um deles tratado com colírio de SC e ciprofloxacina e o outro olho como controle, utilizando-se somente um colírio de ciprofloxacina. Instituiu-se tratamento duas vezes ao dia no 1º dia e uma vez ao dia nos subsequentes. Os olhos foram avaliados, diariamente, quanto aos sinais clínicos, bem como suas córneas, em exame histopatológico, no período de sete, 14 e 30 dias. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratado e não tratado quanto aos sinais clínicos. Foi observada a eficácia no uso tópico do sulfato de condroitina, quanto à organização cicatricial do tecido estromal, caracterizando sua ação sobre o tecido composto por colágeno (Cremonini *et al.*, 2004).

Wouk *et al.* (2006) realizaram uma pesquisa para estudar os efeitos clínicos da instilação tópica de uma associação de ciprofloxacina e SC sobre a cicatrização de úlceras corneanas experimentais produzidas em cavalos. Para isto, foram utilizados 10 olhos de cinco cavalos, nos quais a córnea foi submetida à trefinação central e observação durante 24 horas para início dos tratamentos. Considerando-se cada animal como seu próprio controle, os olhos do lado direito compuseram o grupo controle, nos quais se instilou colírio de tobramicina quatro vezes ao dia e os olhos do lado esquerdo o grupo tratamento, submetidos à instilação de uma associação de SC com ciprofloxacina duas vezes ao dia. Os cavalos foram examinados a cada dois dias, durante 30 dias, para avaliação dos sinais clínicos. A cicatrização das úlceras foi confirmada por prova de retenção de fluoresceína negativa. Os olhos tratados com SC e ciprofloxacina apresentaram redução precoce dos sinais clínicos e preenchimento do leito da úlcera com tecido cicatricial de melhor qualidade, obtendo cicatrização sem leucoma em 80% dos olhos em 14 dias. Os olhos controle apresentaram edema corneano e neovascularização mais importantes e a redução dos sinais clínicos, bem como a cicatrização iniciaram-se tardiamente, resultando em discreto leucoma.

#### 4.2.3 Uso Intra-Ocular Cirúrgico

Na cirurgia da catarata é necessário o uso intra-ocular de substâncias viscoelásticas. Estas substâncias passaram a ser utilizadas em torno da década de 80, com a função de manter a câmara anterior formada, facilitando a abertura da cápsula anterior, e promover a expansão do saco capsular para o implante da lente intra-ocular (Duke-elder e Stewart, 1969). Além disso, elas protegem as células endoteliais da córnea e todas as estruturas intra-oculares durante o ato cirúrgico.

Acompanhando o aperfeiçoamento das técnicas operatórias, principalmente com o surgimento da facoemulsificação, do implante da lente intra-ocular, tornou-se necessária a utilização de substâncias mais viscosas e elásticas que melhor mantivessem o volume da câmara anterior e preservassem as estruturas intra-oculares (Kara Junior, 2002). O desenvolvimento de substâncias mais viscosas para o uso intra-ocular foi fundamental no aprimoramento da cirurgia ocular, permitindo aos cirurgiões a manipulação de instrumentos na câmara anterior e dissecação de tecidos (Lima e Chalita, 2000).

Entre as substâncias viscoelásticas mais usadas e estudadas encontram-se o HS e o SC, os mais biocompatíveis, ambos presentes em tecidos conjuntivos (Kara Junior e milani, 2003). Geralmente a apresentação para uso intra-ocular cirúrgico é SC 40 mg/ml e HS 20 mg/ml (Sobrinho, 1999).

#### 4.2.4 Conservação de Córneas

Outra importante utilização do SC em oftalmologia é a preservação de córneas para transplantes. O objetivo do transplante de córnea e dos bancos de olhos é fornecer córneas fisiologicamente funcionais a indivíduos cujas córneas possam estar descompensadas ou opacas. Antes do transplante, no entanto, as córneas explantadas devem ser armazenadas. Conservantes à base de SC e dextrana são atualmente o meio de armazenamento de escolha. Estudos mostraram que esta formulação mantém a barreira endotelial funcional (Kim *et al.*, 1994) e a viabilidade do endotélio das células (Means *et al.*, 1995) até 21 dias. Porém a viabilidade do epitélio é significativamente reduzida pelo décimo dia de armazenamento (Means, 1996).

Bourne (1986) analisou os transplantes de 37 córneas conservadas em 2,5% de sulfato de condroitina a 4°C por um a 13 dias (média 6,8 dias). A média de perda endotelial observada dois meses após o transplante foi de 6%. Notou uma significativa correlação

positiva entre o tempo de preservação e o tempo de epiteliação e da espessura da córnea três semanas após o transplante. Notou também uma correlação positiva entre o tempo de preservação e perda de células endoteliais, sendo que as maiores perdas ocorreram após dez dias de armazenamento. Os resultados achados por Bourne parecem justificar o uso de meios de SC na preservação das córneas, com o objetivo de estender o tempo de armazenamento dos órgãos doados, mas também indicaram que as córneas devem ser utilizadas o mais cedo possível.

Stein *et al.* (1986) testaram três meios de preservação da córnea a base de SC: 1,5%, 2,0% e 5,0%. Utilizaram 36 pares de córnea, uma córnea de cada par foi colocada em meio de McCarey-Kaufman (MK) e a outra foi colocada em um dos meios de SC. A preservação endotelial foi avaliada por microscopia eletrônica após o armazenamento a 4°C por um, três, cinco, sete, 10 e 14 dias. A preservação a 1,5% de solução de SC foi semelhante à média do MK, mas a 5,0% de solução houve melhor preservação endotelial, sendo perdas apenas 3% das células endoteliais após os 14 dias de armazenamento a 4°C.

### **4.3 Outras Aplicações em Medicina Veterinária**

#### **4.3.1 Tendinites em Equinos**

As tendinites são causas frequentes de claudicação em equinos atletas, e essas podem ser consideradas as mais frustrantes dentre várias enfermidades do aparelho locomotor com relação à resolução clínica, uma vez que é caracterizada por longos períodos de recuperação e grande tendência à recidiva após o retorno à atividade atlética (Gibson *et al.*, 1997). O processo de reparação tendínea é semelhante ao de outros tecidos do organismo (Henninger, 1994; Goodship e Birch, 1996) e os eventos envolvidos nesse processo, bem como protocolos de tratamentos foram estudados por meio de pesquisas controladas utilizando-se a indução experimental da tendinite com colagenase em equinos (Gift *et al.*, 1992; Alves, 1998). No que concerne o tratamento medicamentoso, existem vários relatos na literatura de fármacos que têm influência nestas etapas da reparação tendínea. Dentre estes, os mais citados ultimamente estão as GAGs.

Alves *et al.* (2004) avaliaram a eficácia do SC oral e intramuscular no tratamento de lesões tendíneas agudas induzidas experimentalmente em equinos. Foram utilizados 12 equinos, divididos aleatoriamente em três grupos que receberam a administração de colagenase nos tendões flexores digitais superficiais, no terço médio da região metacarpiana,

com a finalidade de se induzir a tendinite aguda. Após sete dias desta administração iniciou-se o tratamento com SC pelas vias IM (grupo 1) e oral (grupo 2), e sem tratamento (grupo 3 – controle). Estes animais foram avaliados através de exames clínicos e ultra-sonográficos em diferentes momentos pelo período de 150 dias.

Após análise dos dados concluíram que o SC administrado pelas vias intramuscular e oral reduziu o tempo de cicatrização da lesão tendínea, observado aos 30 e 60 dias do experimento, porém não interferiu de forma significativa na qualidade do paralelismo das fibras colágenas tendíneas, observado aos 120 e 150 dias do experimento. Conclui-se que a grande contribuição da utilização do SC tratamento de tendinites em equinos seja na fase inicial da reparação tendínea. Nesta fase ocorreu uma visível diminuição da área da lesão até o 30º dia do experimento tanto no grupo 1 (IM) quanto no grupo 2 (via oral), acelerando o processo de reparação tendínea. Este achado reforça os estudos de Gaughan (1994) e Bertone (1996), pelos quais relatam uma ação anti-inflamatória importante do glicosaminoglicano polissulfatado, fármaco esse com efeitos similares ao SC, por inibir as enzimas lisossomais e promover o aumento de matriz extracelular pelos tenócitos. Dessa forma, considerou-se indicada a utilização do SC no tratamento da tendinite equina aguda pelas vias intramuscular e oral.

#### 4.3.2 Colapso Traqueal em Cães

Colapso traqueal é uma forma de obstrução traqueal muito frequente em cães de meia-idade ou idosos, de raças pequenas, com histórico de tosse crônica do tipo "grasnar de ganso" (Hedlund, 1991). Os sinais clínicos são característicos, com tosse não produtiva por exercício, sons anormais na região torácica, cianose e intolerância ao exercício (Spodnick e Nwadike, 1997; Johnson, 2000). Exame radiográfico (Radlinsky e Fossum, 2000), ultrassonografia, fluoroscopia e traqueoscopia são utilizados no diagnóstico definitivo (Hedlund, 1991; Rudolf *et al.*, 1997). O tratamento é feito com o objetivo de melhorar a qualidade de vida do paciente. Supressores de tosse têm sido usados para controlar os sinais e reduzir a injúria crônica das vias aéreas (Johnson, 2000). Métodos cirúrgicos, como a aplicação de próteses nos anéis traqueais, podem ser utilizados na terapia (Radlinsky e Fossum, 2000; Ayres e Holmberg, 1999).

Na fisiopatologia do colapso traqueal é possível identificar deficiências de condroitina na matriz cartilaginosa, resultando em uma redução na ligação de água e perda da turgescência da cartilagem, levando a redução dinâmica do diâmetro luminal da traquéia, ou colapso traqueal (Hedlund, 1991). A redução da excitação do animal é parte importante da terapia do colapso traqueal, porém não resolve o quadro de tosse crônica. Uma tentativa de

melhorar o aporte de água para o interior das células, permitindo uma melhor atividade cartilaginosa da traquéia durante as trocas de pressão de ar nos pulmões, pode ser conseguida pelo uso do SC exógeno.

Saito *et al.* (2003) descreveu um caso clínico em que tratou colapso traqueal de um cão Poodle miniatura, nove anos de idade, macho, com crises de tosse quando se agitava e quando acordava, com SC, obtendo resultados positivos. O uso do SC comprovou clinicamente que o fármaco é uma opção de alta eficácia no tratamento a longo prazo dos distúrbios cartilagosos traqueais, permitindo uma melhora significativa na qualidade de vida dos pacientes, melhorando a função nos ciclos respiratórios.

#### **4.4 Perspectivas Futuras**

##### **4.4.1 Reparação Óssea e Cartilagínea**

A consolidação óssea é um processo complexo que envolve múltiplas fases que se superpõem (Einhorn, 1998). As respostas celulares próximas ao local da fratura levam primeiramente à produção de um tecido cartilaginoso, que posteriormente se calcifica. Esse molde cartilaginoso inicial é fundamental no reparo ósseo da maioria das fraturas e depende da proliferação e produção de matriz cartilaginosa não mineralizada pelos condrócitos (McKibbin, 1978).

Sendo o SC empregado na terapia da OA devido a seus efeitos biológicos sobre a cartilagem articular, promovendo aumento da síntese de matriz cartilaginosa, têm sido estudados possíveis efeitos benéficos desta substância também na consolidação de fraturas, porém os resultados têm sido bastante controversos.

Moreira (2006) testou os efeitos do SC e sulfato de glicosamina na reparação óssea de 48 coelhos, onde estes foram anestesiados e submetidos à ostectomia do côndilo femoral medial direito e osteossíntese, sendo eutanasiados após 2 e 6 semanas de pós-operatório. Os achados mostraram que com duas semanas o SC associado ao sulfato de glicosamina promoveu um aumento do calo ósseo estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle. Já com seis semanas este calo apresentou-se num tamanho semelhante ao do grupo controle, sugerindo que este aumento seja mais evidente no período mais precoce do reparo ósseo.

Oliveira (2006) avaliou microscopicamente a influência do laser a diodo de Arseniato de Gálio associado ao SC e quitosana no processo de reparação da superfície articular da

cabeça do úmero de cães após defeito osteocondral experimental. Foram utilizados 16 cães adultos, distribuídos aleatoriamente em quatro subgrupos de quatro animais de acordo com a data da eutanásia para realização das análises microscópicas. Em todos os animais foi induzido um defeito cirúrgico na articulação escápulo-umeral esquerda sendo, posteriormente, submetidos à aplicação do laser e a administração oral do SC e quitosana. Foi evidenciado aumento da vascularização da área de reparação, potencialização da reparação e da osteogênese local, aumento da atividade de síntese e manutenção da matriz cartilaginosa e reparação do defeito por tecido fibrocartilaginoso.

#### 4.4.2 Revestimento de formas farmacêuticas

O revestimento de formas farmacêuticas tem inúmeras funções: mascarar sabores e/ou odores desagradáveis, melhoria da aparência, proteção das formas frente aos fluidos gástricos, prevenção das interações entre constituintes da formulação e aumento da estabilidade (Bashaiwoldu *et al.*, 2004). Entretanto, aquela que mais merece destaque é, indubitavelmente, o desenvolvimento de formas revestidas para liberação de fármacos em sítios específicos (Bashaiwoldu *et al.*, 2004; Beck *et al.*, 2005) dotados de elevado grau de sítio-especificidade.

A aplicação da tecnologia de revestimento usando materiais poliméricos tem sido frequentemente utilizada para se obter efetivo controle na liberação de fármacos das formas farmacêuticas, uma vez que essa alternativa tem proporcionado liberação controlada e precisa do fármaco, com excelente reprodutibilidade (Tarvainen *et al.*, 2004).

Os polímeros naturais (inulina, galactomanana, goma arábica, quitosana, dextrana, sulfato de condroitina, etc.) apresentam baixa toxicidade, alta estabilidade, flexibilidade para modificação química, baixo custo e biodegradabilidade específica, justificando sua aplicação atrativa e ampla como carreadores de fármacos, na pesquisa e desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para liberação modificada, destinados à administração oral (Reis *et al.*, 2003). Segundo Liu *et al.* (2003) estes sistemas apresentam a vantagem de serem utilizados, em larga escala, pela indústria farmacêutica sem necessidade de recorrer a equipamentos muito sofisticados.

A liberação específica de fármacos no cólon depende de diversos fatores, como: pH, trânsito gastrointestinal, microflora intestinal, patologias e capacidade do cólon para absorver fármacos. A liberação específica de fármacos no cólon não é fácil uma vez que estes devem evitar as condições adversas do trato gastrointestinal superior (pH ácido do estômago e atividade enzimática intensa no intestino delgado) e atingir regiões específicas do cólon,

sendo o ceco e a região do cólon ascendente as zonas mais adequadas para a liberação (Peeters e Kinget, 1993; Ashford *et al.*, 1994).

Bactérias anaeróbicas do cólon, tais como *Bacteroides thetaiotaomicron* e *B. ovatus*, degradam o SC, justificando sua aplicação como candidato promissor ao transporte de fármaco para liberação específica no intestino grosso, onde se encontram bacteróides em abundância (Sinha e Kumria, 2001). O SC foi inicialmente introduzido na perspectiva de liberação cólon-específica por Rubinstein *et al.* (1992). Entretanto, a elevada hidrossolubilidade do SC constitui forte argumento de limitação da sua aplicação, podendo acarretar uma liberação prematura do fármaco quando o polissacarídeo estiver inserido como excipiente farmacotécnico. As modificações químicas destes polímeros naturais têm sido motivo de muitas investigações, na expectativa de se reduzir a solubilidade (Reis *et al.*, 2006).

#### 4.4.3 Combate ao Câncer

O SC também pode ser usado diretamente como agente anticancerígeno ou como alvo no tumor para outros quimioterápicos. Estudos mostraram que o SC exposto a carbodiimida induziu apoptose em células de mieloma e células cancerosas de glândula mamária *in vitro*. O SC modificado, quando injetado diretamente em tumores mamários de ratas, reduziu e até cessou o crescimento do tumor, aparentemente sem causar toxicidade nos tecidos normais adjacentes. O SC demonstra potencial para ser utilizado como droga anti-câncer e pode desenvolver-se como uma nova classe de agentes terapêuticos (Pumphrey *et al.*, 2002).

Glioma são a forma mais comum e maligna de tumores primários cerebrais em adultos, contabilizando cerca de 78% de todos os tumores malignos do SNC, e ainda, apresentam uma alta taxa de mortalidade (Sathornsumetee *et al.*, 2007). Durante o desenvolvimento neoplásico, ocorre um contínuo remodelamento da matriz extracelular sob o controle das células neoplásicas e alterações do conteúdo de proteoglicanas, afetando a progressão, invasão e o crescimento do tumor (Aguiar *et al.*, 2002). Componentes da matriz extracelular têm sido propostos como possíveis moléculas chaves para o fenótipo invasivo dos gliomas, incluindo o SC (Tysnes *et al.*, 1999).

Cappellari (2008) avaliou os efeitos de glicoproteínas e glicosaminoglicanas, sozinhas ou em associação, em culturas de células de glioma humano linhagem U138-MG e observou uma diminuição da proliferação celular de 37% na presença de dextran, 28% na presença de colágeno tipo I e dextran, 29% na presença de laminina e dextran sulfato e 40% na presença de colágeno tipo I e SC. Estes resultados estão de acordo com outros apresentados por Aguiar

*et al.* (2005) que demonstraram o efeito de GAGs e glicoproteínas sobre a proliferação da linhagem de células de glioma de rato C6, onde nos tratamentos fibronectina associada a heparina ou SC houve uma redução do potencial proliferativo destas células.

Além disso, no desenvolvimento de tumores, várias proteoglicanas (incluindo o SC) são expressas e depositadas na matriz extracelular durante o crescimento do tumor. Estas participam da estrutura da matriz extracelular e modulam o comportamento das células (Wegrowski e Maquart, 2006). Com base nisto, desenvolveu a idéia de usar o SC como um alvo para a entrega seletiva de drogas de polietilenoglicol revestidas por lipossomas. Estes lipossomas catiônicos devem conter o lipídio catiônico 3,5 cloridrato de dipentadecicloxibenzamidina (TRX-20) que é internalizado pelas células do tumor. Lipossomas com TRX-20 carregados com cisplatina matam efetivamente as células tumorais que expressam o SC, fato já comprovado *in vitro* e *in vivo*. Sugere-se que o SC como alvo para entrega de drogas anti-câncer em lipossomas catiônicos representa uma estratégia potencialmente útil para evitar o crescimento local e metástases de células tumorais que expressem o SC (Lee *et al.*, 2002).

#### 4.4.4 Atividade Antioxidante

As moléculas em sistemas biológicos muitas vezes executam mais de uma função e muitas moléculas têm a capacidade de “limpar” os organismos dos radicais livres, mesmo não sendo esta sua principal função. Durante o estresse oxidativo, o aumento da concentração destas moléculas parece ser uma resposta biológica que, em sinergismo com outros sistemas de defesa antioxidante podem proteger as células da oxidação. Entre estas, está o SC, que têm sido alvo de estudos como agente redutor de danos causados pelos radicais livres. A condroitina-4-sulfato exerce atividade antioxidante maior do que a condroitina-6-sulfato. O padrão de sulfatação específica parece desempenhar um papel central na atividade inibitória das moléculas de radicais livres, uma vez que o mecanismo sugerido é a quelação dos cátions metálicos, como  $Fe^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ . A proteção oferecida pelo SC está presente em várias células de diferentes órgãos. Vários estudos *in vitro* mostraram que a condroitina-4-sulfato é capaz de reduzir os danos biológicos e a geração de radicais livres em vários casos de estresse oxidativo induzido por danos em culturas celulares. O SC poderá ser utilizado no futuro como agente terapêutico em patologias onde os radicais livres estão envolvidos (Campo *et al.*, 2006).

## 5 EFEITOS ADVERSOS

Poucos efeitos adversos do SC são citados, mesmo em esquemas terapêuticos prolongados (Hulse, 1998). Moreira (2006), que pesquisou os efeitos do SC na reparação óssea de coelhos, fez análise hematológica dos animais e não encontrou nenhuma alteração no parâmetros no tempo estudado. McNamara *et al.* (1996), após estudos dos efeitos hematológicos e hemostáticos do SC e da glicosamina administrados via oral, por 30 dias em cães, sugeriram que esses compostos não causam anormalidades clinicamente importantes. Ensaio clínico em humanos mostraram que o SC não determinou efeitos tóxicos nem teratogênicos na espécie (Pipitone, 1991).

Melo *et al.* (2003) em um de seus experimentos com SC relataram que os animais que receberam SC demonstraram sinais de dor à administração IM, mas não foi verificada reação local. Quanto ao efeito sistêmico, observou quadro de anorexia que se iniciou após a terceira aplicação do medicamento. Relatou também que quatro animais (80%) apresentaram diarreia sanguinolenta uma semana após o término do tratamento, tornando necessário medicação de suporte. Encontrou-se resultado negativo na pesquisa de hemoparasitas e de parasitas fecais. Essas manifestações clínicas sugerem efeito heparinóide do SC, semelhante ao dos glicosaminoglicanos polissulfatos já citados na literatura (Huber e Bill, 1994; Todhunter, 1994; McNamara, 1997).

Estudos toxicológicos com o SC não são comuns, especialmente no que se refere à toxicidade reprodutiva. Segundo recomendações da *Food and Drug Administration* (FDA), qualquer fármaco ou suplemento alimentar usado por período prolongado, que pode incluir a gestação, deve ser testado sob o aspecto de toxicidade reprodutiva (Neubert *et al.*, 1996).

Camus (1972) alimentou ratas e coelhas com 0,1 a 1 g/kg de sulfato de condroitina e não observou malformações nos fetos e filhotes. Krein *et al.* (2003) desenvolveram um trabalho com o objetivo de avaliar a segurança de sua utilização, administrado durante o período de organogênese em ratas prenhes (modelo internacionalmente recomendado para estudos dessa natureza). Os resultados obtidos mostraram que o SC, administrado a ratas Wistar durante o período de organogênese, do sexto ao décimo quinto dia de gestação, nas doses de 200, 400 e 600 mg/kg, por via oral, não determinou aumento na percentagem de alterações ósseas nos fetos. Krein *et al.* (2003) também analisaram sinais de toxicidade sistêmica como: redução na massa corporal dos animais experimentais (Black e Marks, 1992), redução nos consumos de água e ração, alterações comportamentais como prostração e apatia,

má condição da pelagem (Mello *et al.*, 1997) e alteração da massa relativa dos órgãos (Dallegrave, 2003); não encontrando nenhuma alteração destas variáveis de toxicidade.

## 6 MERCADO

Os abatedouros fornecedores da matéria-prima enviam seus subprodutos diretamente para unidades processadoras ou para entrepostos especializados na preparação dos tecidos para extração. O mercado nacional possui três unidades processadoras da matéria prima, que enviam toda sua produção para países europeus, em especial para França, onde existem os maiores laboratórios formuladores de medicamentos. Existem também no continente europeu, importadores de matéria prima in natura, na forma congelada, que abastecem as unidades de processamento localizadas principalmente na Dinamarca, Holanda e Espanha. Na América do sul existe uma unidade processadora na Argentina, especializada na produção de SC a partir da cartilagem do esterno de frangos de corte. Destaca-se também como importador de matéria-prima in natura o mercado da China, que produz um SC de baixa qualidade, entretanto sabe-se que estes produtos são utilizados mais no segmento ligado à produção de cosméticos. Essas unidades processadoras de matérias primas possuem métodos de extração diferenciados, constituindo, quase sempre, segredos industriais. Algumas ainda realizam um processo de semi-processamento, ou seja, não concluem a cadeia produtiva e exportam o produto semi-acabado.

O Brasil contempla hoje lugar de destaque como exportador de proteína animal para fins de consumo humano, é também um dos países que mais rapidamente responde as restrições e imposições técnico-sanitárias do mercado importador, isto o torna cada vez mais competitivo no cenário mundial. O que é preocupante é que o espaço ocupado pelo país poderia ser enormemente superior, não fosse a falta de incentivo, por parte do poder público, às pequenas e médias empresas que abatem espécies de açougue. Todos estabelecimentos de abate sob inspeção municipal e estadual poderiam estar destinando seus subprodutos para unidades processadoras de SC, não fossem tão grandes os empecilhos impostos pela legislação.

As indústrias processadoras nacionais apresentam no momento uma cenário de absoluta competitividade, vivendo eventualmente algumas situações semelhantes à um “leilão de matéria prima”, o que as torna altamente vulneráveis do ponto de vista comercial. Os tecidos cartilagosos extraídos das espécies de açougue ainda encontram outros fatores que geram grande turbulência no mercado, como por exemplo, o mercado destinado ao consumo humano em alguns países asiáticos, onde todos estes tecidos são muito apreciados fritos.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O SC parece ser uma excelente opção para o tratamento das doenças articulares degenerativas. O uso do SC para este fim já é consagrado pela maior parte dos médicos e veterinários no mundo todo, ocupando grande espaço na literatura médica internacional. Cabe salientar que o presente trabalho procurou mostrar os pontos positivos do SC, existindo ainda algumas publicações que atribuem a melhora clínica dos pacientes humanos ao efeito placebo. O uso oftalmológico do SC também já é consagrado, não restando dúvidas a respeito de suas propriedades benéficas nas diversas aplicações apresentadas neste trabalho. Um uso muito comum do SC é como constituinte de cremes faciais, porém o presente trabalho procurou mostrar as aplicações terapêuticas do produto em processos patológicos, não em medicina estética.

O acesso aos métodos de extração e purificação utilizados pela indústria farmacêutica é muito restrito, porém se assemelham muito aos descritos neste trabalho. Por tratar-se de um medicamento, pelo menos no Brasil, o SC deve ter padronizados os métodos de extração, isolamento e purificação utilizados pela indústria farmacêutica, cabendo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o controle destes processos. Durante a realização deste trabalho foi observado que, no Brasil, todos os métodos de extração do SC encontrados estavam protegidos por patentes ou incubadoras de universidades há muitos anos e sem divulgação. É importante que universidades e instituições governamentais de pesquisa continuem aprimorando e principalmente divulgando os métodos de extração do SC, melhorando cada vez mais o rendimento dos processos. Os laboratórios fabricantes de enzimas e soluções utilizadas nos processos de extração é que têm desenvolvido pesquisas nesta área, aperfeiçoando cada vez mais as técnicas e obtendo rendimentos cada vez maiores.

Por ser uma molécula abundante na matriz do tecido conjuntivo, o SC está envolvido em diversos processos fisiológicos e patológicos. A finalidade biológica do SC no tecido cartilaginoso já é conhecida, porém ainda há muito a ser esclarecido sobre sua função em outros tecidos. Recentemente descobriu-se que o SC é expresso em vários tipos de neoplasias, o que pode ajudar na elucidação de seus mecanismos. Também foi descoberto que inúmeros microorganismos utilizam as GAGs como receptores, como o *Plasmodium falciparum*, causador da malária, que infecta os eritrócitos e estes aderem-se à placenta de mulheres grávidas através do SC presente na placenta. Observou-se também que o SC aumenta acentuadamente no início de lesões ateroscleróticas e desempenham um papel importante na

retenção e acumulação de lipídios. Todos estes envolvimento fazem do SC alvo constante de pesquisadores das diversas áreas da biologia, química e medicina.

Avanços no conhecimento do uso do SC são importantes também para a economia do Brasil, devido ao enorme potencial de fornecimento de tecido cartilaginoso do país; e para o meio-ambiente, já que sem esta finalidade, todos tecidos atualmente utilizados para extração do SC seriam destinados à graxarias, como ainda fazem muitos abatedouros, não sendo este o melhor destino para produtos tão nobres. Além do fornecimento de matéria-prima o Brasil tem enorme potencial para extração do fármaco. O país deveria aproveitar a farta disponibilidade de matéria-prima e investir mais na extração do produto final, exportando um produto com valor enormemente superior, reduzindo custos com logística e com a importação dos fármaco para abastecer o mercado interno.

É importante salientar a importância do Médico Veterinário em toda cadeia de produção do SC: na produção animal, na inspeção e qualidade dos tecidos utilizados, nos testes e pesquisas experimentais, e finalmente, como clínico. Trata-se, portanto, de um assunto de interesse geral dos Médicos Veterinários atuantes nas mais diversas áreas. Cabe aos clínicos, tanto médicos quanto veterinários, tanto ortopedistas quanto oftalmologistas, procurarem conhecer melhor as aplicações e benefícios do SC, para poderem fazer uso adequado do fármaco, tendo como foco, senão a cura, a melhora na qualidade de vida dos pacientes.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. B. M.; GARCEZ, R. C.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A. G. Undersulfation of proteoglycans and proteins alter C6 glioma cells proliferation, adhesion and extracellular matrix organization. **Int J Develop Neuroci.** v. 20, p. 563-571, 2002.
- AGUIAR, C. B. M.; LOBÃO-SOARES, B.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A. G. Glycosaminoglycans modulate C6 glioma cell adhesion to extracellular matrix components and alter cell proliferation and cell migration. **BMC Cell Biol.** v.6, p.31, 2005.
- AIGNER, T.; HEMMEL, M.; NEUREITER, D.; GEBHARD, P. M.; ZEILER, G.; KIRCHNER, T., et al. Apoptotic cell death is not a widespread phenomenon in normal aging and osteoarthritis human articular knee cartilage: a study of proliferation, programmed cell death (apoptosis), and viability of chondrocytes in normal and osteoarthritic human knee cartilage. **Arthritis Rheum.** v. 44, p. 1304-1312, 2001.
- ALTMAN, R. D.; DAVID, D. D.; MUNIZ, O. E. Therapeutic treatment of canine osteoarthritis with glycosaminoglycan polyssulfuric acid ester. **Arth. Rhem.,** v. 32, p. 759-765, 1989.
- ALTMAN, R. D.; DAVID, D. D.; MUNIZ, O. E. Prophylactic treatment of canine osteoarthritis with glycosaminoglycan polyssulfuric acid ester. **Arth. Rhem.,** v. 32, p. 759-765, 1990.
- ALVES, A. L. G. **Influência da beta-aminopropionitrila associada à atividade física na reparação tendínea de equinos após agressão pela colagenase. Análise ultra-sonográfica e morfológica.** Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina – Universidade Estadual Paulista, 1998.
- ALVES, A. L. G.; THOMASSIAN, A.; HUSSNI, C. A.; NICOLETTI, J. L. M.; WATANABE, M. J.; LETTRY, V. Efeitos do sulfato de condroitina intramuscular e oral no tratamento de tendinite aguda experimental de equinos. **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp,** Botucatu, v. 11, n. 3, p. 143-146, set./dez. 2004.
- AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY. **Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee: 200 up date.** Guidelines. **Arthritis Rheum,** v. 43, p. 1905-1915, 2000.
- ARCANJO, K. D. S.; GOMES, L.; PIMENTEL, E. R. Effect of magnesium chloride and guanidinium chloride on the extraction of components of extracellular matrix from chicken cartilage. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v. 89, p. 93-97, 1994.
- ARIAS, S. A.; REZENDE, C. M. F.; MELO, E. G.; NUNES, V. A.; CORREA, J. C. Avaliação radiológica e artroscópica e histologia da membrana sinovial do joelho de cães tratados com associação de sulfato de condroitina e hialuronato de sódio, após doença articular degenerativa induzida experimentalmente. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** Belo Horizonte, v. 55, n. 4, ago. 2003.
- ASHFORD, M.; FELL, J. T. Targeting drugs to the colon: delivery systems for oral administration. **J. Drug Target.,** London, v. 2, p. 241-258, 1994.

- AYRES, S. A.; HOLMBER, G. D. L. Surgical treatment of tracheal collapse using pliable total ring prostheses: results in one experimental and 4 clinical cases. **Can. Vet. J.** v. 40, n. 11. p. 787-791, 1999.
- BACHMEIER, C.J.M.; BROOKS, P.M. Osteoarthritis: epidemiological aspects, assessment and treatment. **Rev Bras Reumatol**, v.36, p.379-390, 1996.
- BANKS, W. J. **Histologia aplicada a veterinária**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1998, 658 p.
- BARROS, F. D.; LICCO, E. A. A reciclagem de resíduos de origem animal: uma questão ambiental. **Revista Nacional da Carne, 17º Catálogo Brasileiro de Produtos e Serviços**. São Paulo, p. 166-171, jul. 2007.
- BASHAIWOLDU, A. B.; PODCZECK, F.; NEWTON, J. M.; **Int. J. Pharm** v. 53, p. 274, 2004.
- BEALE, B. S.; GORING, R. L.; CLEMMONS, R. M. Effect of semi-synthetic polysulfated glycosaminoglycan on the hemostatic mechanism in the dog. **Vet. Surg.**, v. 19, p. 57, 1990.
- BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; BENVENUTTI, E. V.; DALLA, C. T.; GUTERRES S. S. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 16 p. 1233, 2005.
- BERTONE, A. L. Equine tendinitis. **J. Equine Vet. Sci.**, v. 16, n.1, p. 16-17, 1996.
- BIASI, F.; RAHAL, S. C.; VOLPI, J. L. Reconstrução do ligamento cruzado em cães, associado ou não ao sulfato de condroitina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 442-447, 2005.
- BLACK, D. L., MARKS, T.A. **Role of maternal toxicity in assessing developmental toxicity in animals**: a discussion. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Deluth. v.16, p. 189-202, 1992.
- BLIX, G.; SNELLMAN, O. **Ark. kemi, mineral. o. geol**, 19 A, N° 32. 1945.
- BORGES, F. M. O.; SALGARELLO, R M ; GURIAN, T M. **Recentes avanços na nutrição de cães e gatos** (palestra - texto em anais). In: II Simpósio sobre Nutrição de animais de Estimação, 2003, Campinas. Anais do II Simpósio sobre Nutrição de animais de Estimação, 2003.
- BOURGEOIS, P.; CHALES, G.; DEHAIS, J.; DELCARNBRE, B.; DREYFUS, P.; KUNTZ, J.; ROSENBERG, S. Osteoarthritis Cartilage In: **Glucosamine and chondroitin sulfates in the treatment of osteoarthritis**: a survey. De los REYES, G. C., 1998.
- BOURNE, W. M. Endothelial cell survival on transplanted human corneas preserved at 4 C in 2.5% chondroitin sulfate for one to 13 days. **Am. J. ophthalmol**, v. 15, p. 102-382, sep. 1986.
- BRANDÃO, C. V. S.; CREMONINI, D. N.; RANZANI, J. J. T.; RODRIGUES, G. N. Avaliação e tratamento de úlceras de córnea em cães. **Revista Nosso Clínico**. São Paulo. ano 6, n. 34, p. 24-26, jul/ago, 2003.

BRIEF, A. A.; MAURER, S. G.; DICESARE, P. E. Use of glucosamine and chondroitin sulfate in the management of osteoarthritis. **Journal of the American Academy of Orthopedic Surgeons**, v. 9, n. 2, p. 71-79, March/April, 2001.

BUDDECKE, E.; KRÖZ, W.; LANKA, E. **Hoppe seyler's z. physiol. Chem.** 331, p. 196-201. 1963.

BUDSBERG, S. C.; FOX, S. M. The science of articular cartilage and its deterioration during osteoarthritis. **Advances: Practical Information about the art, science ad research of veterinary medicine**, n. 2, 13 p, 1999.

BURK, R. L. The appendicular skeleton. **Small animal radiology and ultrasonography: a diagnostic atlas and text.** 2. ed., p. 492-494, 1996.

CALDEIRA, F. M. C.; MUZZI, L. A. L.; MUZZI, R. A. L. Artrose em cães. **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**, n. 37, p. 53-83, março 2002.

CAMPO, G. M.; AVENOSO A.; CAMPO S.; FERLAZZO A. M.; CALATRONI A. Antioxidant activity of chondroitin sulfate. **Advances in Pharmacology**, Messina, v. 53, p. 417-431, 2006.

CAMUS, J. Verificacion de l'action de l'acid chondroisine sulfurique chez des malades arthrosiques. **In: Reyes, G.C.**, 1972.

CANSI, C. P.; BENTO, L. S.; FUGIKI, K. D. P. ; PEREIRA, P. F. O. Oftalmologia canina. **Revista Cães do Sul.** ano 1, n. 2, 2006.

CAPPELLARI, A. R. **Efeito de diferentes componentes da matriz extracelular sobre a ecto- 5'-nucleotidase, proliferação, adesão e migração celular na linhagem de células de glioma humano U138-MG.** Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciências biológicas- Bioquímica da Universidade federal do Rio Grande do sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica. Porto Alegre, 2008.

CARAMANO, et al. Transformações no padrão etário da mortalidade brasileira em 1979-1994 e no impacto na força de trabalho. **Texto para discussão n. 512.** Rio de Janeiro: IPEA, setembro, 1997.

CARRIG, C. B. Diagnostic imaging of osteoarthritis. **Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.**, v.27, p. 777-814, 1997.

CASSARO, C. M. F.; DIETRICH, C. P. Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. **J. Biol. Chem.** v. 252, p. 2254-2261, 1977.

CASU, B.; PETITOU, M.; PROVASOLI, M.; SINAY, P. Conformational flexibility: a new concept for explaining binding and biological properties of iduronic acid-containing glycosaminoglycans. **Trends Biochem. Sci.**, v. 13, p. 221-225, 1998.

CLARK, D.M. Current concepts int the treatment of degenerative joint disease. **Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.**, v.13, p.1439-1446, 1991.

COIMBRA, M.A. *et al.* J. Agric. Fourier transform infrared spectroscopy and chemometric analysis of white wine polysaccharide extracts. **Food Chem**, v.50, p.3405-3411, 2002.

CREMONINI, D. N.; BRANDÃO, C. V. S.; CROCCI, A. J.; MANNARINO, R.; RANZANI, J. J. T.; RODRÍGUEZ, G. N.; ROCHA, N. S. Avaliação do uso tópico de sulfato de condroitina A (Ciprovet) no tratamento de úlcera de córnea experimental em coelhos. Medvep – **Revista de Medicina Veterinária** – Pequenos animais e animais de estimação. Curitiba. v. 2, n. 5, p. 51-56, 2004.

DALLEGRAVE, E. **Toxicidade reprodutiva do herbicida glifosato – Roundup em ratos Wistar**. 225f. Tese -Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

DAVIDSON, G. Glucosamine and chondroitin sulfate. **Compendium**, North Carolina State University, p. 454-458, may 2000.

DEFANTE, A. J. **Ceratoconjuntivite seca em cães**. Trabalho monográfico do curso de pós-graduação "Lato Sensu" em Cirurgia de Pequenos Animais apresentado à UCB como requisito parcial para a obtenção de título de Especialista em Clínica Médica e Cirúrgica em Pequenos animais, sob a orientação da Prof.a Dr.a Fabiana Bérghamo. Campo Grande, nov. 2006.

DIAZ, V. B.; FUENTS, E. P.; MARTINEZ, O. E. **Chondroitin sulfate (Overview)**. SALAMONE, J. C. (Ed.). *Polymeric materials encyclopedia*. Boca Raton: CRC, v. 2, p. 1262-1274, 1996.

DUKE-ELDER, S.; STEWART, E. **Enfermedade de los ojos**. 15 ed. México: Nueva Editorial, 1969.

DUNN, J. K. **Tratado de medicina interna de pequenos animais**. ed.1, São Paulo: Rocca, p. 208-210, 2001.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 663 p.

EHRlich, K. C., RADHAKRISHNAMURTHY, B.; BERENSON, G. S. **Arch.biochem. biophys.** 171, p. 361-369. 1975.

EINBINDER, J.; SCHUBERT, M. **Separation of chondroitin sulfate from cartilage**. 1950. Frm the Department of Chemistry and the Study Group on Rheumatic Diseases, New York University College of Medicine, New York, 1950.

EINHORN, T. A. The cell and molecular biology of fracture healing. **Clin Orthop Relat Res**. 1998.

EISENSTEIN, R.; LARSSON, S. E.; KUETTNER, K. E.; SORGENT N.; HASCALL, V. C. **Artherosclerosis** 22, p. 1-17. 1975.

FELICE, J.C., *et al.* **Osteoartrose**. Disponível em

<<http://cerir.org.br/revistas/setembro2002/osteartrose.htm>> Acesso em: 15 junho 2005.

FRANCIS, D. J.; FORREST, M. J.; BROOKS, P.M. Retardation of articular cartilage degradation by glycosaminoglycan polysulfate, pentosan polysulfate, and DH-40J in the rat air pouch model. **Arth. Rheum.**, v. 32, p. 608-616, 1989.

FRANSSON, L. A.; HAVSMARK, B.; SILVERBERG, I. A method for the sequence analysis of dermatan sulphate. **Biochem. J.** v. 269, p. 381-388, 1990.

GAUGHAN, E. M. Managing tendinitis in horses. **Vet. Med.**, v. 89, n. 8, p. 789-794, 1994.

GEHLEN, M. L. **Estudo da permeabilidade vascular aguda em coelhos submetidos à queimadura química e injeção subconjuntival de agentes pró e antiinflamatórios**. 2005. Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

GIBSON, K. T.; BURBIDGE, H. M.; PFEIFFER, D. U. Superficial digital flexor tendonitis in Thoroughbred race horses: outcome following non-surgical treatment and superior check desmotomy. **Aust. Vet. J.**, v. 75, n. 9, p. 631-635, 1997.

GIFT, L. J.; GAUGHAM, R. M.; DEBOWES, J. P. *et al.* The influence of intratendinous sodium hyaluronate on tendon healing in horses. **Vet. Comp. Orthop. Traumatol.**, v. 5, n. 4, p. 151-157, 1992.

GOODSHIP, <sup>a</sup> E.; BIRCH, H. L.; The pathophysiology of the flexor tendons in the equine athlete. In: **Dubai International Equine Symposium**, Dubai, p. 83-107, 1996.

HANNAN, N.; GHOSH, P.; BELLENGER, C. Systemic administration of glycosaminoglycan polysulphate (Arteparon) provides partial protection of articular cartilage from damage produced by meniscectomy in the canine. **J. Orthop. Res.**, v. 5, p. 47-59, 1987.

HEDLUND, C. S. Tracheal collapse. **Probl. Vet. Med.** v. 3, n. 2, p. 229-238. 1991.

HEFFRON, L. E.; CAMPBELL, J. R. Osteophyte formation in the canine stifle joint following treatment for rupture of the cranial cruciate ligament. **J. Small Anim. Pract.**, v. 20, p. 603-611, 1979.

HENNINGER, R. treatment of superficial digital flexor tendinitis. **Vet. Clin. North Am. Equine Practice**, v. 10, n. 2, p. 409-424, 1994.

HUBER, M. L.; BILL, R. L. The use of polysulfated glycosaminoglycan in dogs. **Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.**, v. 16, p. 501-506, 1994.

HULSE, D. Treatment methods for pain in the osteoarthritic patient. **Vet. Clin. North Am.** v. 28, p. 361-374, 1998.

HUNTER, S. J.; SCHRAER H. In vitro synthesis of the glycosaminoglycans in estrogen-induced medullary bone in japanese quail. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 210, p.647-652,1981.

INNES, J. F.; BARR, A. R. S.; SHARIF, M. Efficacy of oral calcium pentosan polysulphate for the treatment of osteoarthritis of the canine stifle joint secondary to cranial cruciate ligament deficiency. **Vet. Rec.**, v. 146, p. 433-437, 2000.

JÄRVINEN, M.; JOZSA, L.; JOHNSON, R. J. Effect of anterior cruciate ligament reconstruction with patellar tendon or prosthetic ligament on the morphology of the other ligaments of the knee joint. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 311, p. 176-182, 1995.

JIMENEZ, S.; DODGE, G. The effects of glucosamine sulfate on human chondrocyte gene expression. **Osteoarthritis Cartilage**. 1997.

JOHNSON, L. Tracheal collapse. Diagnosis and medical and surgical treatment. **Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.** v. 30, n. 6, p. 1253-1266. 2000.

JOHNSTON, S.A. Osteoarthritis: Articular anatomy, physiology and pathology. In: **JOHNSTON, S.A. (Ed). osteoarthritis**. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v.27,p.699-723, 1997.

JOHNSTON, S. A.; BUDSBERG, S. C. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and corticosteroids for the management of canine osteoarthritis. **Vet. Clin. North AM.: Small Anim. Pract.**, v. 27, p. 841-861, 1998.

JORPES, E.; BIOCHEM, Z., 204, 354. 1929.

KAPLAN, D.; MEYER, K. **Proc. soc. exp. biol. med.** 105, p. 78-81. 1960.

KAPOOR, R.; PHELPS C. F.; CÖSTER L.; FRANSSON L. **Bovine aortic chondroitin sulphate – and dermatan sulphate – containing proteoglycans**: isolation, fractionation and chemical characterization. Department of Biological Sciences, University of Lancaster LA1 4YQ, U.K., and Department of Physiological Chemistry 2, University of Lund, S-200 07 Lund, Sweden. 1981.

KARA JÚNIOR, N. Substâncias viscoelásticas. Mantendo espaços e protegendo estruturas. In: SOUZA-DIAS, C.; ALMEIDA, G. V. (Coord.) **Cristalino e Catarata**. Col. Manuais Básicos CBO. Rio de Janeiro: Cultura Médica, p103, 2002.

KARA JÚNIOR, N.; MILANI, J. A. Substâncias viscoelásticas. In: **PADILHA, M. (Org.) Catarata**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, p. 281, 2003.

KARAMANOS, N. K.; ALETRAS, A. J.; TSEGENIDIS T.; TSIGANOS C. P.; ANTONOPOPOULOS C. A. Isolation, characterization and properties of the oversulphated chondroitin sulphate proteoglycan from squid skin with peculiar glycosaminoglycan sulphation pattern. **Eur. J. Biochem.** v. 204, p. 552-560,1992.

KARZEL, K.; LEE, K. J. Effect of hexosamine derivatives on mesenchymal metabolic processes of in vitro culture fetal bone explants. **J Z Rheumatol.** v. 41, p. 212-218, 1982.

KELLY, G. S. The role of glucosamine sulfate and chondroitin sulfates in the treatment of degenerative joint disease. **Altern. Med. Ver.**, v. 3, p. 27-39, 1998.

- KIM, K.; EDELHAUSER, H.F.; HOLLEY, G. P.; GEROSKI, D. H.; LYNN, M.; WALSH, G. E. Optisol stored corneal endothelial permeability. **Am. J. Ophthalmol.**; v. 117, p.385-393, 1994.
- KOSAKAI, M.; YOSHIKAWA, Z. A partial modification of the carbazole method of Bitter and Muir for quantitation of hexuronic acids. **Analytical Biochemistry**, v. 93, p. 295-298, 1979.
- KRAAN, P. M.; BUMA, P.; KUPPEVELT, T.; BERG, W. B. Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors: relevance for articular cartilage tissue engineering. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 10, p. 631-637, 2002.
- KRESSE, H.; HEIDEL, M; BUDDECKE, E. **Eur. j. biochem.** 22, p. 557-562. 1971.
- KUMAR, V.; BERENSON, G. S.; RUIZ, H.; DALFERES, E. R.; STRONG, J. P. **J. atheroscler. Res.** 7, p. 573-581. 1967.
- LAMARI, F. N.; KARAMANOS, N. K. Structure of chondroitin sulfate. **Advances in Pharmacology**, Patras, v. 53, 2006.
- LEE, C. M.; TANAKA, T.; MURAI, T.; KONDO, M.; KIMURA, J.; SU, W.; KITAGAWA, T.; ITO, T.; MATSUDA, H.; MIYASAKA, M. Novel chondroitin sulphate-binding cationic liposomes loaded with cisplatin efficiently suppress the local growth and liver metastasis of tumor cells in vivo. **Cancer Res.** v. 62, p. 4282-4288, 2002.
- LEES, P. Pharmacology and therapeutics of joint diseases. **CPD Vet. Med.**, v. 2, p. 18-26, 1999.
- LIMA, A. L. H.; CHALITA, M. R. C. Substâncias viscoelásticas. In: **REZENDE, F. (Org.) Cirurgia de Catarata.** Rio de Janeiro: Cultura Médica, p. 223, 2000.
- LIPOWITZ, A. J. Degenerative joints diseases. In: SLATTER, D. (Ed.) **Textbook of Small Animal. Surgery.** 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, p. 1921-1927, 1993.
- LIU, A. C.; HEINRICHS, B. S.; LEACH, R. M. Influence of manganese deficiency on the characteristics of proteoglycans of avian epiphyseal growth plate cartilage. **Poult. Sci.**, v. 73, p. 663-669, 1994.
- LIU, L.; FISHAMN, M. L.; KOST, J.; HICKS, K. B. Pectinebased systems for colon-specific drug delivery via oral route. **Biomaterials, Amsterdam**, v. 24, p. 3333-3343, 2003.
- LUO, X. M.; FOSMIRE, G. J.; LEACH, R. M. Chicken keel cartilage as a source of chondroitin sulfate. **Poult. Sci.** v. 81, p. 1086-1089, 2002.
- LUST, G. Restrição alimentar e osteoartrite em animais. Informativo Técnico. In: **The Purina Pet Institute Symposium**, Missouri, p. 14-18, 2002.
- MADHAVAN, M.; CHANDRA, K. **Indian heart j.** 23, p. 202-204. 1971.

- MARSHAL, K. W.; CHAN, A. D. M. Bilateral canine model of osteoarthritis. **J. Rheum.**, v. 23, p. 344-350, 1996.
- MARTIN, J. A.; BUCKWALTER, J. A. Telomere erosion and senescence in human articular cartilage chondrocytes. **J. Gerontol A Biol Sci Med Sci.** v. 56, p.172-179, 2001.
- MARTINEZ, S. A. Tratamiento médico de la artrosis em mascotas. **Actualización em Nutrición de Gatos e Perros de Edad Avanzada**, IAMS Company, OHIO, p. 13-17, 2000.
- MARTINS, R. C. L.; WERNECK, C. C.; ROCHA, L. A. G.; FERES-FILHO, E. J.; SILVA, L. C. F. Molecular size distribution analysis of human gingival glycosaminoglycans in ciclosporin and nifedipine-induced overgrowths. **J. Periodont. Res.**, v. 38 p. 182-189, 2003.
- MATHIEU, P. A new mechanism of action of chondroitin sulfates ACS4- ACS6 in osteoarthritic cartilage. **Presse Med.** 2002.
- MAY, S. A. Radiology refresher article. **Equine Vet.**, v. 8, p. 114-120, 1996.
- McALINDON, T. E.; LaVALLEY, M. P.; GULIN, J. P.; FELSON, D. T. **Glucosamine and chondroitin for treatment of osteoarthritis**: a systematic quality assessment and meta-analysis. *Jama.* 2000.
- McKIBBIN, B. The biology of fracture healing in long bones. **J Bone Joint Surg Br.**, 1978.
- McLAUGHLIN, R. M.; ROUSH, J. K. Diagnosing osteoarthritis. **Veterinary Medicine**, v. 97, n. 2, p. 120-133, February 2002 a.
- McLAUGHLIN, R. M.; ROUSH, J. K. Medical therapy for patients with osteoarthritis. **Veterinary Medicine**, v. 97, n. 2, p. 135-144, February 2002 b.
- McLLWRAITH, C. W. General pathobiology of the joint and response to injury. In: McLLWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W. (Eds.) **Joint disease in the horse**. Philadelphia: W. B. Saunders, p. 40-80, 1996.
- McNAMARA, P. S.; BARR, S. C.; Hematologic, hemostatic, and biochemical effects in dogs receiving na oral chondroprotective agent for thirty days. **Am. J. Vet. Res.**, v. 57, p. 1390-1394, 1996.
- McNAMARA, P. S.; JOHNSTON, S. <sup>a</sup>; TODHUNTER, R. J. Slowacting, disease modifying osteoarthritis agents osteoarthritis. **Vet. Clin. North Am.: Small Amin. Pract.**, v. 27, p. 863-881, 1997.
- MEANS, T.L.; GEROSKI, D.H.; HADLEY, A.; LYNN, M. J.; EDELHAUSER, H. F. Viability of human corneal endothelium following Optisol-GS storage. **Arch Ophthalmol.**; v. 113, p.805-809, 1995.
- MEANS, T.L.; GEROSKI, D.H.; HERNAULT, L. N.L; GROSSNIKLAUS, H.E.; KIM, T.; EDELHAUSER, H. F. The corneal epithelium after Optisol-GS storage. **Cornea.** v. 15, p. 599-605, 1996.

MELLO, J. R.B.; LANGELOH, A.; HABERMEHL, G.; KREBS, H. C.; BATATINHA, M. J.M.; ALMAEIDA, C. R.C.; BASTOS, F. C.; BASSANI, M.; BARUFFALD, C.; ALVARES, F.; FRANCISCO, D.; KUMMER, R. Avaliação do extracto aquoso dos frutos de *Crotalaria retusa* Leguminosae sobre a fertilidade de ratas. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 25, p. 34-42, 1997.

MELLO, E. G.; NUNES, V. A.; REZENDE, C. M. F.; GOMES, M. G.; MALM, C.; GHELLER, V. A Sulfato de condroitina e hialuronato de sódio no tratamento da doença articular degenerativa em cães. Estudo histológico da cartilagem articular e membrana sinovial. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 1, p. 83-92, 2008.

MELLO, E. G.; REZENDE, C. M. F.; GOMES, M. G.; FREITAS, P. M.; ARIAS S. A.Sulfato de condroitina e hialuronato de sódio no tratamento da doença articular degenerativa experimental em cães. Aspectos clínicos e radiológicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 1, fev. 2003.

MEYER, K. H.; ODIER, M. E.; SIEGRIST, A. E. **Helv. chim. acta**, 31, p. 1400. 1948.

MEYER, K.; SMYTH, E. M.; **J. Biol. chem.**, 119, p. 507. 1937.

MICHEL, B. A.; STUCKI, G.; FREY, D.; DE VATHAIRE, F.; VIGNON, E.; BRUEHLMANN, P., et al. Chondroitins 4 and 6 sulfate in osteoarthritis of the knee: a randomized controlled trial. **Arthritis Rheum**, 2005.

MICHELACCI, Y. M.; HORTON, D. S. P. Proteoglycans from the cartilage of young hammerhead shark *sphyrna lewini*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 92B, p. 651-658, 1989.

MILLIS, D. L. Manejo “completo” do paciente artrítico. **Nutrição e Saúde em Cães de Raças Grandes**, Veneza, p. 32-36, 2001.

MOREIRA,C.; CARVALHO, M.A.P. **Reumatologia - diagnóstico e tratamento**. 2.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

MOREIRA, M. B. **Efeitos da oxigenoterapia hiperbárica e do sulfato de condroitina-A associado ao sulfato de glucosamina na reparação óssea de coelhos**. Tese apresentada a Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Doutor em Ciências. São Paulo, 2006.

MUIR, H. **Structure and function of connective and skeletal tissue**. In: JACKSON, S. F.; HARKNESS, R. D.; PARTRIDGE, S. M.; TRISTAM, G. R. (eds.) p. 137-141, Butterworths, London. 1965.

MUIR, H.; JACOBS, S. **Biochem. J.** 103, 307. 1967

NAKANO, T.; SUNWOO, H. H.; LI, X.; PRICE, M. A.; JEONG, S. S. Study of sulfated glycosaminoglycans from porcine skeletal muscle epimysium including analysis of

iduronosyl and glucuronosyl residues in galactosaminoglycan fractions. **J. Agric. Food Chem.** v. 44, p. 1424-1434. 1996.

NAKANO T.; NAKANO K.; SIM, J. S.. Extraction of glycosaminoglycan peptide from bovine nasal cartilage with 0.1 M sodium acetate. **J. Agric. Food Chem.** v. 46, p. 772-778, 1998.

NAKANO, T.; IKAWA, N.; OZIMEK, L. Na economical method to extract chondroitin sulphate-peptide from bovine nasal cartilage. **Canadian Agricultural Engineering**, Edmonton, v. 42, n. 4, p. 205-208, may 2000.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 2. ed., p. 845-846. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

NÉRI, A. L.; CACHIONE, M. velhice bem sucedida e educação. In: **NÉRI, A. L. velhice e sociedade**, São Paulo, Papirus, p. 113-137, 2001.

NEUBERT, D.; KAVLOCK, R. J.; MERKER, H. J.; KLEIN, J. Risk assesment of prenatally – induced adverse health effects. Berlin: Springer – Verlag. 565p., 1996.

NUNES, M. L.; BATISTA, I.; RAMOS, C.; COUTINHO, J.; BANDARRA, N. M. **Protótipos desenvolvidos para a valorização de rejeições, retiradas e subprodutos**. Biblioteca virtual do IPIMAR Disponível em : [http://ipimar-iniap.ipimar.pt/servicos/biblioteca/Noticias/Noticias\\_1/PDF/BE-FAIR\\_Lisboa,%2030OUT2008\\_MLN.pdf](http://ipimar-iniap.ipimar.pt/servicos/biblioteca/Noticias/Noticias_1/PDF/BE-FAIR_Lisboa,%2030OUT2008_MLN.pdf) Acesso em: 03/10/2008

OEGEMA, T. R.; HASCALL, V. C.; EISENSTEIN, R. **J. biol. Chem.** 254, p. 1312-1318. 1979.

OLIVEIRA, C. R. L. **Terapia laser de baixa potência ( $\lambda = 904\text{nm}$ ) associada ao sulfato de condroitina e quitosana na reparação de defeito osteocondral experimental da cabeça do úmero de cães. Estudo histopatológico**. Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Medicina veterinária para obtenção do título de “Magister Scientia”. Viçosa Minas Gerais – Brasil, 2006.

PAVÃO, M. S. G.; VILELA-SILVA, A. C.; MOURÃO, P. A. S. Biosynthesis of chondroitin sulfate: from the early precursor discoveries to nowadays, genetics approaches. **Advances in Pharmacology**, Rio de Janeiro, v. 3, 2006.

PEARSON, P. T. Ligamentous and meniscal injuries of the stifle joint. **Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.**, v. 1, p. 489, 1971.

PEDERSEN, N.C.; MORGAN, J.P.; VASSEUR, P.B. **Tratado de medicina veterinária: doenças do cão e do gato**, 5. ed., vol.2, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p. 1962-1988.

PEDERSEN, N. C.; MORGAN, J. P.; VASSEUR, P. B. **Tratado de medicina veterinária: doenças do cão e do gato**. 5.ed., v. 2, p. 1962-1988. Rio de Janeiro: guanabara Koogan, 2004.

PEETERS, R.; KINGET, R. Film-forming polymers for colonic drug delivery: I. Synthesis and physical and chemical properties of methyl derivatives of Eudragit S. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.94, p. 125-134, 1993.

PETBR, A força dos nutrientes. Disponível em: <http://www.petbrasil.com.br>, Acesso em: 20/05/2003.

PLUIJM, S. M.; VanESSEN, H. W.; BRAVENBOER, N.; UITTERLINDEN, A.G.; SMIT, J. H.; POLS H. A., et al. Collagen type I alpha1 Sp1 polymorphism, osteoporosis, and intervertebral disc degeneration in older men and women. **Ann Rheum Dis.** v. 63, p. 71-77, 2004.

PICARD, J.; LEVY, P.; HERMELIN, B.; PAUL-HARDAIS, A.; DENDON, E. **Protides biol. Fluids proc. Colloq.** 22, p. 251-254. 1975.

PIERMATTEI, D. L.; FLO, G. L. **Manual de ortopedia e tratamento das fraturas dos pequenos animais.** 3. Ed., 694p. São Paulo: Manole, 1999.

PIPITONE, V. R. Chondroprotection with chondroitin sulfate. **Drugs Exp. Clin. Res.**, v. 17, p. 3-7, 1991.

PUMPHREY, C. Y.; THEUS, A. M.; LI, S.; PARRISH, R. S.; SANDERSON, R. D. Neoglycans, carbodiimide-modified glycosaminoglycans: a new class of anticancer agents that inhibit cancer cell proliferation and induce apoptosis. **Cancer Res.** v. 62, p. 3722-3728, 2002.

RADHAKRISHNAMURTHY, B.; RUIZ, H. A.; BERENSON, G. S. **J. biol. Chem.** 252, p. 4831-4841. 1977.

RADLINSKY, M. A.; FOSSUM, T. W. Tracheal collapse in a young boxer. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.** v. 36, n. 4, p. 313-316, 2000.

RAMOS, L. R.; ROSA, T. E.; OLIVEIRA, Z.; MEDINA, M.; SANTOS, F. Perfil do idoso em área metropolitana na região sudeste do Brasil: resultados de inquérito domiciliar. **Revista de Saúde Pública**, v. 27, n. 2, p. 87-94, 1993.

REIS, A. V.; CAVALCANTI, O. A.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. **Int. J. Pharm.** v. 13, p. 267, 2003.

REIS, A. V.; CAVALCANTI, O. A.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. **Polymer** v.47, p. 2023, 2006.

RENDANO, V. T.; SHOUP, C. L. Radiologic diagnosis of canine osteoarthritis. In: A Pfizer symposium held in conjunction with the congress of the world small animal veterinary association, 1998, Buenos Aires. **Management of canine osteoarthritis: current options**, p. 27-30, 1998.

REZENDE, M. U.; GOBBI, R. G. Tratamento medicamentoso da osteoartrose do joelho. **Rev. Bras. Ortop.** 2009;

REY, L.D. *et al.* Prevalência e padrão de envolvimento articular da osteoartrite de

mãos na população acima de 50 anos na cidade de Curitiba. **Rev Bras Reumatol**, v.40, p.217-220, 2000.

ROACH, S. **Introdução a enfermagem gerontológica.**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1. ed, p. 337, 2001.

RODÉN, L.; BAKER, J. R.; CIFONELLI A.; MATHEWS M. B. Isolation and characterization of connective tissue polysaccharides. **Methods in Enzymology** v. 53 A, p. 69-82, 1972.

ROMAY, C. C. Utilización de subprodutos de la industria cárnica. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA TECNOLOGIA DE CARNES**, 1., 2001, São Pedro. Anais... Campinas, SP: CTC/ITAL, 2001. P. 270-280.

ROOSTER, H.; VANGHELUVÉ, L.; VANBREE, H. Biomechanical properties of braided polyester tapes intended for use as intraarticular cranial cruciate ligament prostheses in dogs. **Am. J. Vet. Res.**, v. 62, p. 48-53, 2001.

ROSEMAN, S. Reflections on glycobiology. **J. Biol. Chem.** v. 276, p. 41527-41542, 2001.

ROSSI, E. **Envelhecimento do sistema osteoarticular.** Autor correspondente: Edison Rossi – Rua Coelho Neto, 447 – Vila Itapura – CEP 13023-020 – Campinas (SP), Brasil –2008.

ROUSH, J. K.; McLAUGHLIN, R. M.; RADLINSKY, M. G. Understanding the pathophysiology of osteoarthritis. **Veterinary Medicine**, v. 97, n. 2, p. 108-112, february, 2002.

RUBINSTEIN, A; SINTOV, A. Biodegradable polymeric matrices with potential specificity to the large intestine. In: FRIEND, D. R. (ed.) **Oral colon-specific drug delivery**, London, CRC Press, p. 233- 257, 1992.

RUDORF, H.; HERRTAGE, M. E.; WHITE, R. A. Use of ultrasonography in the diagnosis of tracheal collapse. **J. Small Anim. Pract.** v. 38, n. 11, p.513-518, 1997.

SAITO, T. B. ; NAGAI, M. Y. D. O. ; ITO, A. M.; HEADLEY, S. A. Utilização de Sulfato de condroitina em cães com colapso traqueal: um relato de caso. In: **XXIV Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais**, , Belo Horizonte, 2003.

SANDMAN, K. M.; HARARI, J. Canine cranial cruciate ligament repair techniques: is one best? **Vet. Med.**, v. 96, p. 850-856, 2001.

SATHORNSUMETEE, S.; REARDON, D.; DESJARDINS, A.; QUINN, J.; VREDENBURGH, J. J.; RICH, J. N. **Molecularly targeted therapy for malignant gliomas.** **Cancer.** v. 110, p. 13-24, 2007.

SATO, S.; RAHEMTULLA, F.; PRINCE, C. W.; TOMANA, M.; BUTLER, W. T. Proteoglycans of adult bovine compact bone. **Connect. Tissue Res.**, v. 14, p. 65-75, 1985.

SCOTT, J. E. **Meth. Biochem. Anal** 8, 145. 1960.

SCHIAVINATO, A.; LINI, E.; GUIDOLIN, D. *et al.* Intraarticular sodium hyaluronate injections in the Pond-Nuki experimental model of osteoarthritis in dogs: II- morphological findings. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 241, p. 286-299, 1989.

SCHWALDER, P. **Eigene methoden zur operativen rekonstruktion bei rupturen des voederen und hinteren krenzbandes.** Kleinterpraxis, v. 7, p. 323-330, 1989.

SILVA, F. L. C. Isolation and purification of chondroitin sulfate. **Advances in Pharmacology**, Rio de Janeiro, v. 53, p. 21-31.. 2006.

SINHA, V. R.; KUMRIA, R. **Int. J. Pharm.** v. 19, p. 224, 2001.

SIREK, O. V.; SCHILLER, S.; DORFMAN, A. **Biochim. Biophys. Acta** v. 83, p. 148-151. 1964.

SOBRINHO, J. B. V. **Viscoelásticos. Farmacologia & terapêutica ocular.** Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1999.

SPODNICK, G. J.; NWADIKE, B. S. Surgical management of extralhoracic tracheal collapse in two largebreed doas. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v. 211. n. 12. p. 1545-1548. 1997.

STEIN, R. M.; BOURNE, W. M.; CAMPBELL, R. J. Chondroitin sulfate for corneal preservation at 4°C. **Arch Ophthalmol**, v. 104, p. 1358-1361, 1986.

TARVAINEN, M.; PELTONEN, S.; MIKKONEN, H.; ELOVAARA, M.; TUUNAINEN, M.; PARONEN, P.; KETOLAINEN, J.; SUTINEN, R.; **J. Controlled Release** v. 96, p. 179, 2004.

TODHUNTER, R. J. Anatomy and physiology of synovial joints. In: McLLWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W. (Eds.) **Joint disease in the horse.** Philadelphia: W. B. Saunders, p. 1-28, 1994.

THEOCHARIS, D. A.; PAPAGEORGEKOPOULOU, N.; VYNIOS, D. H.; ANAGNOSTIDES, S. T.; TSIGANOS, C. P. Determination and structural characterisation of dermatan sulfate in the presence of other galactosaminoglycans. **J. Chromatogr.**, v. B 754, p. 297-309, 2001.

THEOCHARIS, A. D.; TSOLAKIS, I.; TZANAKAKIS, G. N.; KARAMANOS, N. K. Chondroitin sulfate as a key molecule in the development of atherosclerosis and cancer progression. **Advances in Pharmacology**, Crete, v. 53, 2006.

TOFFOLETTO, O.; TAVARES, A.; CASARINI, D. E.; REDUBLO, B. M.; RIBEIRO, A. B. Farmacocinética da associação de glucosamina e sulfato de condroitina em humanos sadios do sexo masculino. **Acta ortop. bras.**, v. 13, 2005.

TOWHEED, T. E.; MAXWELL, L.; ANASTASSIADES, T. P.; SHEA, B.; HOUPPT, J.; ROBINSON, V., et al. Glucosamine therapy for treating osteoarthritis. **Cochrane Database Syst Rev.** 2005.

- TSIGANOS, C. P.; MUIR, H. Studies on protein-polysaccharides from pig laryngeal cartilage: extraction and purification. **Kennedy Institute of Rheumatology, Bute Gardens, Hammersmith**, London W. 6. 1969.
- TYSNES, B. B.; MAHESPARAN, R.; THORSEN F.; HAUGLAND, H. K.; PORWOL, T.; ENGER, P. O.; LUND-JOHANSEN, M.; BJERKVIG, R. Laminin expression by glial fibrillary acidic protein positive cells in human gliomas. **Int J Develop Neurosci**, v. 17, p. 531-539, 1999.
- UEBELHART, D.; THONAR, E. J.; DELMAS, P. D., CHANTRAINE, A.; VINGNON, E. Effects of oral chondroitin sulfate on the progression of knee osteoarthritis: a pilot study. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 6, p. 39-46, 1998.
- UEBELHART, D.; MALAISE, M.; MARCOLONGO, R.; DeVATHAIRE, F.; PIPERNO, M; MAILLEUX, E.; FIORAVANT, A.; MATOSO, L.; VIGNON, E. Intermittent treatment of knee osteoarthritis with oral chondroitin sulfate: A one-year, randomized, double-blind, multicenter study versus placebo. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 12, p. 269-276, 2004.
- UEBELHART, D.; KNOLS, R.; BRUIN, E. D.; VERBRUGGEN, G. Treatment of knee osteoarthritis with oral chondroitin sulfate. In: **Chondroitin Sulfate: Structure, Role and Pharmacological Activity**. Amsterdam: Elsevier Inc, 2006.
- UEBELHART, D. Revisão clínica do sulfato de condroitina em osteoartrite. **Osteoarthritis and Cartilage**. Department of Rheumatology and Institute of Physical Medicine, University Hospital Zurich, Switzerland, 2008.
- VASSEUR, P. B.; BERRY, C. R. Progression of stifle osteoarthrosis following reconstruction of the cranial cruciate ligament in 21 dogs. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 28, p. 129-136, 1992.
- VAUGHAN-SCOTT, T.; TAYLOR, J. H. The pathophysiology na medical manegement of canine osteoarthritis. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, v. 68, p. 21-25, 1997.
- VEJA ON LINE, Um caso de amor animal. Edição 1 799 - 23 de abril de 2003  
Disponível em <http://veja.abril.com.br>, Acesso em: 20/05/2003.
- VELOSA A. P. P.; TEODORO, W. R.; YOSHINARI, N. H. Colágeno na cartilagem osteoartrótica. **Rev. Bras. Reumatol.** v. 43, p.160-166, 2003.
- VERAS, R. P. **País jovem com cabelos brancos: a saúde do idoso no Brasil**. Rio de Janeiro: Relume Dumará, 224 p., 1994.
- VERBRUGGEN, G.; GOEMAERE, S.; VEYS, E. M. Chondroitin sulfate: S/DMOAD (structure disease modifying anti-osteoarthritis drug) in the treatment of finger joint OA. **Osteoarth Cart** 1998.
- VIGNON, E.; ARLOT, M.; HARTMAN, D. et al. Hypertrophic repair of articular cartilage in experimental osteoarthrosis. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 42, p. 82-88, 1983.

VOLPI, N.; Fractionation of heparin, dermatan sulfate, and chondroitin sulfate by sequential precipitation: A method to purify a single glycosaminoglycan species from a mixture. **Anal. Biochem.**, v. 218, p. 382-391, 1994.

VOLPI, N. Purification of heparin, dermatan sulfate and chondroitin sulfate from mixtures by sequential precipitation with various organic solvents. **J. Chromatogr.**, v. B 685, p.27-34, 1996.

WEGROWSKI, Y.; MARQUAT, F. X. **Advances in pharmacology.** v. 53, p. 297-321, 2006.

WERNECK, C. C.; OLIVEIRA, S. A. J.; SILVA, L. C. F.; VILLA\_VERDE, D. M. S.; SAVINO, W.; MOURÃO, P. A. S. Is there a glycosaminoglycan-related heterogeneity of the thymic epithelium? **J. Cell. Physiol.**, v. 185, p. 68-79, 2000.

WOUK, A. F. P. F.; ZULIAN, I.; MULLER, G.; SOUZA, A. L. G. Ação do sulfato de condroitina "A" associado à ciprofloxacina em úlceras de córnea em cavalos. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 4 n. 4 out./dez. 2006.

YUDOH, K.; NGUYEN, T.; NAKAMURA, H.; HONGO-MASUKO, K.; KATO, T.; NISHIOKA, K. Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. **Arthritis Res Ther.** v. 7, p. 380-391, 2005.