JOYCE MARTINS COELHO

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE GLUCOSAMINA E CONDRITIM
SULFATO ASSOCIADOS AO ÁCIDO HIALURÔNICO EM CAVALOS COM
OSTEOARTRITE**

São Paulo
2009

JOYCE MARTINS COELHO

**Efeitos da administração oral de glucosamina e condroitim sulfato associados
ao ácido hialurônico em cavalos com osteoartrite**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Clínica Veterinária da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo
para obtenção de título de Mestre em
Medicina Veterinária

Departamento:

Clínica Médica

Área de Concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Raquel Yvonne Arantes Baccarin

São Paulo
2009

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2149
FMVZ

Coelho, Joyce Martins

Efeitos da administração oral de glucosamina e condroitim sulfato associados ao ácido hialurônico em cavalos com osteoartrite / Joyce Martins Coelho. – São Paulo : J. M. Coelho, 2009.
121 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin.

1. Osteoartrite. 2. Glicosaminoglicanos. 3. Agentes ondroprotetores.
4. Equinos. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito de condroitim sulfato e sulfato de glucosamina no tratamento de osteoartrite em eqüinos", protocolado sob o nº949/2006, utilizando 12 (doze) eqüinos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 16/08/06".

(We certify that the Research "Effects of chondroitin sulfate and glucosamine sulfate on osteoarthritis treatment in horses", protocol number 949/2006, utilizing 12 (twelve) equines, under the responsibility of Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 08/16/2006).

São Paulo, 17 de agosto de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Coelho, Joyce Martins

Título: Efeitos da administração oral de glucosamina e condroitim sulfato associados ao ácido hialurônico em cavalos com osteoartrite

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai José Carlos, por ter me dado a oportunidade de estudar, o amor incondicional, e estar sempre presente em todos os momentos de minha vida. Me ensinando, me ouvindo, às vezes ouvindo “meus berros” nos momentos de descontrole, mas sempre me apoiando. E falando para todos com muito orgulho “essa é minha filhota” “meu tesouro”! TE AMO PARA SEMPRE, E SAIBA QUE SOU EU QUE TENHO O MAIOR ORGULHO DO MUNDO DE SER SUA FILHA.

À minha mãe Mílts, por todas as preces, elas têm sempre me acompanhado, por me mostrar que vale a pena lutar pelos meus objetivos, que sempre é melhor ter um pensamento positivo mesmo diante das dificuldades, e que tudo dará certo no final! Por todas as preocupações se eu almocei, se eu dormi,... TE AMO! MUITO OBRIGADA POR SER MINHA MÃE.

À minha irmãzinha Kelly (In memoriam), que apesar de já ter “partido” há tanto tempo, nunca vou me esquecer de tudo que você me ensinou, nossas conversas até de madrugada, todo seu carinho e amor por mim. Você foi maior exemplo de força diante das dificuldades, fé, luta e serenidade, que poderei ter toda a minha vida. Você foi uma guerreira!

Saiba que sinto tua presença sempre comigo, parece que às vezes posso sentir seu cheiro, sei o quanto você me ajudou “aí de cima”! Obrigada viu? TE AMO MUITO MANINHA!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin, por ter me aceito e acreditado na realização deste trabalho.

Pelas suas palavras sábias, questionamentos e ensinamentos, os quais levarei pelo resto da minha vida. Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Prof^a e Dra. Yara Maria Corrêa da Silva Michelacci que me acolheu em seu laboratório. E que me ensinou e me ajudou tanto na realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Gui, o que eu posso falar de você? Tudo! Por estar sempre ao meu lado, me escutar, me ajudar, me entender, TER TODA ESSA PACIÊNCIA que é necessária no convívio comigo, principalmente naqueles dias que viro uma “oncínha”! Agradeço por todas as tabelas, os gráficos, as formatações,... Nossa sem você não teria conseguido! Sempre me lembrarei de sua frase máxima: “Não procure problemas ache soluções!” Obrigada por tudo, e principalmente por ter entrado na minha vida. TE AMO MUITÃO! E PARA SEMPRE!

AGRADECIMENTOS

A todos meus amigos, sem vocês não sou nada!

A minha “irmãzinha” de alma Aline por tudo que você representa na minha vida, minha melhor amiga, minha parceira de todas as horas, minha confidente, obrigada por suas palavras e seu colo de sempre! Te Amo.

Ao meu melhor amigo Jorge, que sempre me escuta com atenção, mesmo quando repito as mesmas coisas. Por toda sua ajuda no início da minha vida profissional. Parceirão SEMPRE!

Ao meu amigo Maurício por todas nossas conversas e palavras sábias, por cuidar tão bem, sempre que necessário, do meu filhote BIBI!

A minha amiga Natália por toda paciência e apoio, mesmo não entendendo absolutamente nada do que eu estava falando

As irmãs Donatí Carine e Pri pela amizade e carinho.

À minha cunhadinha Tati pelas discussões técnicas e ajuda nos meus gráficos.

À Ana Paula por toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho

Ao Leandro pelo auxílio nas colheitas de materiais, trato com os cavalos e processamento de dados.

À Camila por me ajudar com meus pacientes para assim eu poder ter tempo de me dedicar na elaboração desta obra.

As minhas amigas “uspianas” Andréia, Patrícia, Ana e Carolina, que me acolheram tão bem e que estão sempre dispostas a me ajudar no que for preciso. ADORO VOCÊS!

À Cílene, pela ajuda, esclarecimentos e amizade.

Aos amigos do HOVET, pelo companheirismo e pelos cafezinhos sempre com muitas risadas.

Aos funcionários da Biblioteca, em especial a Elza, por serem sempre tão atenciosos e prestativos.

À Adelaide, por toda a paciência e ajuda, muito obrigada!

À faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela oportunidade na elaboração deste estudo.

A todos meus pacientes que me deram a oportunidade de exercer esta profissão que eu AMO TANTO. Aos proprietários e sempre novos amigos, pelo carinho, e apoio nesta etapa de minha vida mesmo nos momentos onde não pude atendê-los.

E a todos meus animais os que estão hoje comigo, Toy, Cherry, Cuca, Billy, Mina, Condroitim e Sulfato. E também a todos que já se foram, mas me deixaram lições sobre fidelidade de uma vida toda e de amor eterno. VOCÊS SEMPRE ESTARÃO NO MEU CORAÇÃO E UM DIA NOS ENCONTRAREMOS!

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho!

“Ninguém vai bater mais forte do que a vida. Não importa como você bate e sim o quanto aguenta apanhar e continuar lutando; o quanto pode suportar e seguir em frente. É assim que se ganha.”

R. Balboa

RESUMO

COELHO, J. M. **Efeitos da administração oral de glucosamina e condroitim sulfato associados ao ácido hialurônico em cavalos com osteoartrite.** [Effects of oral administration of glucosamine sulfate and chondroitin sulfate associated with hyaluronic acid in horses with osteoarthritis]. 2009. 121 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A osteoartrite é a causa mais comum de claudicação em cavalos e, frequentemente está associada com a queda de desempenho e abandono precoce das atividades esportivas. Numerosos estudos têm investigado o potencial da função dos condroprotetores na desaceleração do processo degenerativo e no reparo da cartilagem articular. A finalidade deste estudo foi investigar o efeito da administração oral de glucosamina, condroitim sulfato e ácido hialurônico associados sobre a evolução clínica, radiológica, e glicosaminoglicanos (GAGs) da urina, do líquido sinovial e sérico de cavalos acometidos por osteoartrite. Foram utilizados seis equinos, com idades entre seis e doze anos, machos ou fêmeas, submetidos ao mesmo manejo nutricional. Estes animais receberam doses diárias de condroitim sulfato (CS) (2,8 g), ácido hialurônico (AH) (0,1g), glucosamina (3,1 g), via oral, por 25 dias. Exames clínicos e radiográficos foram realizados anteriormente e após o tratamento. Amostras de urina, líquido sinovial, e sangue foram coletados antes da primeira administração do suplemento; a cada 5 dias durante o tratamento e a cada 7 dias após o tratamento, durante 55 dias. Os glicosaminoglicanos urinários foram identificados por eletroforese em gel de agarose após cromatografia de troca iônica e quantificados por densitometria. A determinação de AH sérico foi realizada por ELISA. Após proteólise do líquido sinovial o CS e a AH foram igualmente identificados por eletroforese e quantificados por densitometria. No início do experimento, as concentrações médias urinárias de CS, DS, HS e GAGs totais (2,96 mg/l, 0,66 mg/l, 0,42 mg/l, 4,05 mg/l respectivamente) foram inferiores as médias urinárias, logo após o tratamento (5,38 mg/l, 1,30 mg/l, 0,96 mg/l, 7,64 mg/l respectivamente) ($p < 0,05$) e similares após 30 dias (4,24 mg/l, 1,09 mg/l, 0,36 mg/l, 5,69 mg/l). A concentração sérica de AH aumentou após o tratamento e ao final do experimento em relação do início dos mesmos (10,61 ng/ml, 12,58 ng/ml, 21,08 ng/ml respectivamente) ($p < 0,05$). O CS do líquido sinovial apresentou

comportamento similar ao CS urinário (início: 76,13 µg/ml, final do tratamento: 93,05 µg/ml, final do experimento: 61,61µg/ml). Já o AH no líquido sinovial não sofreu alterações significativas (início: 440,07 µg/ml, final do tratamento: 351,15 µg/ml, final do experimento: 375,99 µg/ml) apesar da tendência a diminuição. Concluiu-se que a administração oral de glucosamina, CS e AH associados apresenta uma tendência ao aumento dos GAGs urinários e do CS do líquido sinovial imediatamente após o tratamento, com diminuição até 30 dias; aumento sérico do AH e manutenção da concentração de AH no líquido sinovial, com tendência a diminuição.

Palavras-chave: Osteoartrite. Glicosaminoglicanos. Agentes Condroprotetores.
Equinos.

ABSTRACT

COELHO, J. M. **Effects of oral administration of glucosamine sulfate and chondroitin sulfate associated with hyaluronic acid in horses with osteoarthritis** [Efeitos da administração oral de glucosamina e condroitim sulfato associados ao ácido hialurônico em cavalos com osteoartrite]. 2009. 121 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Osteoarthritis is the most common cause of lameness in horses, and often is frequently associated with poor performance and early end of sports activities. Numerous studies have investigated the potential function of chondroprotective drugs in slow down the degenerative process and helping to repair the joint cartilages. The purpose of this study was to investigate the effect of oral administration of glucosamine, chondroitin sulfate and hyaluronic acid associated with the clinical, radiological, and urinary glycosaminoglycans (GAGs), in the serum and synovial fluid of horses affected by osteoarthritis. We used six horses, aged between six and twelve years old, male or female, undergoing the same nutritional management. These animals received daily doses of condroitim sulfate (CS) (2.8 g), hyaluronic acid (HA) (0.1 g), glucosamine (3.1 g), oral route, for 25 days. Clinical and radiographic examinations were performed before and at the end of treatment. Samples of urine, synovial fluid and serum were collected before the first administration of the supplement, and every 5 days during the treatment and every 7 days after the end of the treatment, for a total of 55 days. The urinary glycosaminoglycans have been identified for agarose gel electrophoresis after ion-exchange chromatography on Q-Sepharose and quantified by densitometry. The determination of serum HA was performed by ELISA. After the sinovial liquid proteolysis the CS and the HA have been equally identified for eletrophoresis and quantified by densitometry. In the beginning of this study the avarage of urinary concentrations of CS, DS, HS and total GAGs (2.96 mg/l, 0.66 mg/l, 0.42 mg/l, 4.05 mg/l respectively) have been inferior the urinary averages, right after the treatment (5.38 mg/l, 1.30 mg/l, 0.96 mg/l, 7.64 mg/l respectively)($p < 0,05$) and similar after 30 days (4.24 mg/l, 1.09 mg/l, 0.36 mg/l, 5.69 mg/l respectively). The HA serum concentration increased after treatment and the end of the experiment regarding the inicial values (10.61 ng/ml, 12.58 ng/ml, 21.08 ng/ml respectively) ($p < 0.05$). The synovial fluid CS showed a similar behavior to the

urinary CS (beginning: 76.13 µg/ml, end of treatment: 93.05 µg/ml, end of the experiment: 61.61 µg/ml). But the synovial fluid HA did not change significantly (beginning: 440.07 µg/ml, end of treatment: 351.15 µg/ml, end of the experiment: 375.99 µg/ml) despite the tendency to decrease. It was concluded that oral administration of glucosamine, CS and HA associated shows a tendency to increase the urinary GAGs and CS in the synovial fluid immediately after treatment, with reduction in 30 days; increase of serum HA and maintenance of the concentration of HA in synovial fluid, with a tendency to decrease.

Keywords: Osteoarthritis. Glycosaminoglycans. Chondroprotective Agents. Equine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Estrutura de articulação saudável. São Paulo, 2009.....	32
Figura 2-	Alterações articulares ocorridas na osteoartrite. São Paulo, 2009.....	33
Figura 3-	Alterações articulares ocorridas na osteoartrite. São Paulo, 2009.....	33
Figura 4-	Principais unidades dissacarídicas dos glicosaminoglicanos. São Paulo, 2009.....	38
Figura 5-	Estrutura do proteoglicano. São Paulo, 2009.....	39
Figura 6-	Moléculas de agregam e de proteína de ligação formando agregados com ácido hialurônico. São Paulo, 2009.....	40
Figura 7-	Estrutura do Agregam. LP - ligação protéica, G1, G2, G3 - domínios, KS - queratam sulfato, IGD - interglobular domínio, CS1, CS2 - domínios ricos em condroitim sulfato. São Paulo, 2009.....	41
Figura 8-	Estrutura da glucosamina sulfato e da glucosamina cloro-hidrato. São Paulo, 2009.....	46
Figura 9-	Foto demonstrando a colheita de urina de égua por cateterismo uretral. São Paulo, 2009.....	59
Figura 10-	Colunas de cromatografia de troca iônica em Q-Sepharose. São Paulo, 2009.....	61
Figura 11-	Precipitação dos glicosaminoglicanos com metanol, após cromatografia. São Paulo, 2009.....	61
Figura 12-	Eletroforese em gel de agarose de glicosaminoglicanos de urina de cavalo eluídos da coluna de troca iônica em Q-Sepharose. M - mistura padrão, CS - condroitim sulfato, DS - dermatam sulfato, HS - heparam sulfato, 1 a 11 - número de amostras. São Paulo, 2009.....	63
Figura 13-	Foto demonstrando o local da punção da articulação tibiotársica e a aquisição da amostra de líquido sinovial. São Paulo, 2009.....	65

Figura 14-	Foto demonstrando amostra de líquido sinovial. São Paulo, 2009.....	65
Figura 15-	Eletroforese em gel de agarose de glicosaminoglicanos do líquido sinovial de cavalo. M - mistura padrão, CS - condroitim sulfato, DS - dermatam sulfato, HS - heparam sulfato, P - padrão de AH - ácido hialurônico. São Paulo, 2009.....	66
Figura 16-	Eletroforese em gel de agarose tratada com hyaluronidase de glicosaminoglicanos do líquido sinovial de cavalo. M - mistura padrão, CS - condroitim sulfato, DS - dermatam sulfato, HS - heparam sulfato, P - padrão de AH - ácido hialurônico, 1 a 10 - número de amostras. São Paulo, 2009.....	67
Figura 17-	Imagem radiográfica da articulação tibiotársica direita do cavalo 3, antes do início do tratamento. São Paulo, 2009.....	76
Figura 18-	Imagem radiográfica da articulação tibiotársica direita do cavalo 3, após 60 dias do início do tratamento. São Paulo, 2009.....	76
Figura 19-	Eletroforese em gel de agarose de glicosaminoglicanos da urina do cavalo 5 eluídos da coluna de troca iônica em Q-Sepharose. M - mistura padrão, CS - condroitim sulfato, DS -dermatam sulfato, HS - heparam sulfato, 1 a 11 - amostras de urina. São Paulo, 2009.....	80
Figura 20-	Eletroforese em gel de agarose de glicosaminoglicanos da urina do cavalo 5 eluídos da coluna de troca iônica em Q-Sepharose. M - mistura padrão, CS - condroitim sulfato, DS - dermatam sulfato, HS - heparam sulfato, 1 a 11 - amostras de urina. São Paulo, 2009.....	80
Figura 21-	Eletroforese em gel de agarose tratada com hyaluronidase de glicosaminoglicanos do líquido sinovial do cavalo 3. M - mistura padrão, CS - condroitim sulfato, DS - dermatam sulfato, HS - heparam sulfato, P - padrão de AH - ácido hialurônico, 1 a 10 - número de amostras. São Paulo, 2009.....	85
Figura 22-	Eletroforese em gel de agarose de glicosaminoglicanos do líquido sinovial do cavalo 3. M - mistura padrão, CS - condroitim sulfato, DS - dermatam sulfato, HS - heparam sulfato, P - padrão de AH - ácido hialurônico, 1 a 10 - número de amostras. São Paulo, 2009.....	87

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Efeito da administração de condroitim sulfato, glucosamina e ácido hialurônico na excreção de glicosaminoglicanos urinários (condroitim sulfato - CS, dermatam sulfato-DS, heparam sulfato-HS e GAGs totais) de seis cavalos com osteoartrite. São Paulo, 2009.....	79
Gráfico 2-	Efeito da administração de condroitim sulfato, glucosamina e ácido hialurônico na excreção de glicosaminoglicanos urinários (condroitim sulfato-CS, dermatam sulfato-DS, heparam sulfato-HS), GAG/creatinina X 10 ⁻³ , em seis cavalos com osteoartrite. São Paulo, 2009.....	79
Gráfico 3-	Efeito da administração de condroitim sulfato, glucosamina e ácido hialurônico no ácido hialurônico sanguíneo (ng/ml) de seis cavalos com osteoartrite no decorrer do experimento. São Paulo, 2009.....	81
Gráfico 4-	Efeito da administração de condroitim sulfato, glucosamina e ácido hialurônico na concentração de condroitim sulfato (µg/ml) do líquido sinovial de articulações com osteoartrite (OA). São Paulo, 2009.....	84
Gráfico 5-	Efeito da administração de condroitim sulfato, glucosamina e ácido hialurônico no ácido hialurônico em µg/ml do líquido sinovial de articulações com osteoartrite (OA). São Paulo, 2009.....	87

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Composição dos dissacarídeos dos glicosaminoglicanos de mamíferos. São Paulo, 2009.....	37
Quadro 2-	Aumento de volume nas articulações tibiotársica direita e esquerda, dos animais 1 a 6, antes do tratamento e ao final do experimento. São Paulo, 2009.....	68
Quadro 3-	Presença(+) ou ausência(-) de postura antiálgica nas articulações tibiotársica direita e esquerda, dos animais 1 a 6, antes do tratamento e ao final do experimento. São Paulo, 2009.....	69
Quadro 4-	Consistência do aumento de volume das articulações tibiotársica direita e esquerda, dos animais 1 a 6, antes do tratamento e ao final do experimento. São Paulo, 2009.....	69
Quadro 5-	Presença(+) ou ausência(-) de calor nas articulações tibiotársica direita e esquerda e dos animais 1 a 6, antes do tratamento e ao final do experimento. São Paulo, 2009.....	70
Quadro 6-	Presença(+) ou ausência(-) de dor nas articulações tibiotársica direita e esquerda, dos animais 1 a 6, antes do tratamento e ao final do experimento. São Paulo, 2009.....	70
Quadro 7-	Grau de claudicação dos membros posteriores (MP) direito e esquerdo, dos animais 1 a 6, antes do tratamento e ao final do experimento. São Paulo, 2009.....	71
Quadro 8-	Teste de flexão articular das articulações tibiotársica direita e esquerda, dos animais 1 a 6, antes do tratamento e ao final do tratamento. São Paulo, 2009.....	71
Quadro 9-	Valores em escore, para as características analisadas nas radiografias das articulações tibiotársica direita, tibiotársica esquerda, do animal número 1 antes do tratamento e ao final do experimento. São Paulo, 2009.....	72
Quadro 10-	Valores em escore, para as características analisadas nas radiografias das articulações tibiotársica direita, tibiotársica esquerda, do animal número 2 antes do tratamento e ao final do experimento. São Paulo, 2009.....	73
Quadro 11-	Valores em escore, para as características analisadas nas radiografias das articulações tibiotársica direita, tibiotársica esquerda, do animal número 3 antes do tratamento e ao final do experimento. São Paulo, 2009.....	73

Quadro 12-	Valores em escore, para as características analisadas nas radiografias das articulações tibiotársica direita, tibiotársica esquerda, do animal número 4 antes do tratamento e ao final do experimento. São Paulo, 2009.....	74
Quadro 13-	Valores em escore, para as características analisadas nas radiografias das articulações tibiotársica direita, tibiotársica esquerda, do animal número 5 antes do tratamento e ao final do experimento. São Paulo, 2009.....	74
Quadro 14-	Valores em escore, para as características analisadas nas radiografias das articulações tibiotársica direita, tibiotársica esquerda, do animal número 6 antes do tratamento e ao final do experimento. São Paulo, 2009.....	75
Quadro 15-	Mediana dos escores atribuídos às radiografias das articulações tibiotársica direita, tibiotársica esquerda, dos animais 1 a 6, antes do tratamento e ao final do experimento. São Paulo, 2009.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Valores médios e desvio padrão de condroitim sulfato(CS), dermatam sulfato(DS) e heparam sulfato(HS) e glicosaminoglicanos totais (GAGs) em mg/l da urina de seis cavalos com osteoartrite. São Paulo, 2009.....	77
Tabela 2-	Valores médios e desvio padrão de condroitim sulfato(CS), dermatam sulfato(DS) e heparam sulfato(HS) e glicosaminoglicanos totais (GAGs) por creatinina urinária (CREAT) de seis cavalos com osteoartrite. São Paulo, 2009.....	78
Tabela 3-	Valores médios e desvio padrão (ng/ml) de ácido hialurônico sanguíneo de seis cavalos com osteoartrite no decorrer do experimento. São Paulo, 2009.....	81
Tabela 4-	Valores médios e desvio padrão (µg/ml) de condroitim sulfato do líquido sinovial de articulações tibiotársicas acometidas por osteoartrite de seis cavalos e do grupo controle. São Paulo, 2009.....	83
Tabela 5-	Valores médios e desvio padrão (µg/ml) de ácido hialurônico do líquido sinovial de articulações com osteoartrite de seis cavalos e do grupo controle. São Paulo, 2009.....	86

LISTA DE APÊNDICE

Apêndice A -	Média de 2 determinações para cada animal da excreção urinária de glicosaminoglicanos (mg/l) e creatinina (g/l), e a razão GAG/creatinina das amostras de urina do animal 1, no decorrer do experimento. São Paulo, 2009.....	113
Apêndice B -	Média de 2 determinações para cada animal da excreção urinária de glicosaminoglicanos (mg/l) e creatinina (g/l), e a razão GAG/creatinina das amostras de urina do animal 2, no decorrer do experimento. São Paulo, 2009.....	114
Apêndice C -	Média de 2 determinações para cada animal da excreção urinária de glicosaminoglicanos (mg/l) e creatinina (g/l), e a razão GAG/creatinina das amostras de urina do animal 3, no decorrer do experimento. São Paulo, 2009.....	115
Apêndice D -	Média de 2 determinações para cada animal da excreção urinária de glicosaminoglicanos (mg/l) e creatinina (g/l), e a razão GAG/creatinina das amostras de urina do animal 4, no decorrer do experimento. São Paulo, 2009.....	116
Apêndice E -	Média de 2 determinações para cada animal da excreção urinária de glicosaminoglicanos (mg/l) e creatinina (g/l), e a razão GAG/creatinina das amostras de urina do animal 5, no decorrer do experimento. São Paulo, 2009.....	117
Apêndice F -	Média de 2 determinações para cada animal da excreção urinária de glicosaminoglicanos (mg/l) e creatinina (g/l), e a razão GAG/creatinina das amostras de urina do animal 6, no decorrer do experimento. São Paulo, 2009.....	118
Apêndice G -	Valores, média e desvio padrão de ácido hialurônico (AH) em ng/ml do soro dos animais 1 a 6 com osteoartrite. São Paulo, 2009.....	119
Apêndice H -	Valores, média e desvio padrão de condroitim sulfato (CS) em µg/ml do líquido sinovial dos animais 1 a 6 com osteoartrite. São Paulo, 2009.....	120
Apêndice I -	Valores, média e desvio padrão de ácido hialurônico (AH) em µg/ml do líquido sinovial dos animais 1 a 6 com osteoartrite. São Paulo, 2009.....	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	graus Celsius
µg	micrograma
µL	microlitro
AH	ácido hialurônico
AINEs	anti-inflamatórios não esteroidais
AMOA	agentes modificadores da doença osteoartrítica
CONC.	concentração
CREAT	creatinina
CS	condroitin sulfato
COX-2	ciclooxigenase 2
DAD	doença articular degenerativa
DI	decilitro
DS	dermatam sulfato
G	grama
GAGs	glicosaminoglicanos
Hep	heparina
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
HS	heparam sulfato
IL-1	interleucina -1
IL-6	interleucina -6
KDa	quilodáton
KS	queratam sulfato
LS	líquido sinovial
M	molar

mg	miligrama
ml	mililitro
μl	microlitro
mm	milimetros
MMPs	metaloproteinases
MPD	membro posterior direito
ng	nanograma
OA	osteoartrite
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PGs	proteoglicanos
pH	potencial hidrogeniônico
TIMPs	metaloproteinases teciduais
TNF-α	fator de necrose tumoral alpha

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	26
2 REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1 OSTEOARTRITE (OA)	28
2.1.1 Etiopatogenia	29
2.1.2 Patofisiologia da Doença Articular	29
2.1.3 Tratamento	34
2.2 AGENTES MODIFICADORES DA DOENÇA OSTEOARTRÍTICA (AMOA)	35
2.2.1 Glicosaminoglicanos	36
2.2.1.1 <i>Proteoglicanos de Cartilagem</i>	39
2.2.1.2 <i>Ácido Hialurônico</i>	43
2.2.1.3 <i>Utilização de Condroitim Sulfato e Glucosamina no Tratamento da Osteoartrite</i>	43
2.2.1.4 <i>Utilização do Ácido Hialurônico no Tratamento da Osteoartrite</i>	49
2.2.1.5 <i>Degradação e Eliminação dos Proteoglicanos e Glicosaminoglicanos</i>	50
2.2.1.6 <i>Biomarcadores da Doença Articular</i>	52
3 OBJETIVOS	54
3.1 OBJETIVO GERAL	54
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
4 MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1 ANIMAIS	55
4.2 EXAME FÍSICO	55
4.3 EXAME RADIOGRÁFICO	56
4.4 COLHEITA E PREPARAÇÃO DE URINA	59
4.4.1 Análise das Urinas	60
4.4.1.1 <i>Extração dos Glicosaminoglicanos Urinários</i>	60
4.4.1.2 <i>Identificação e Quantificação</i>	62
4.5 COLHEITA E PREPARAÇÃO DE SANGUE	63
4.5.1 Quantificação de Ácido Hialurônico Sérico	63
4.6 COLHEITA DE LÍQUIDO SINOVIAL	64
4.6.1 Identificação e Quantificação de Glicosaminoglicanos	66
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	67
5 RESULTADOS	68
5.1 EXAME FÍSICO	68
5.2 EXAME RADIOGRÁFICO	72
5.3 ANÁLISE DA URINA	76
5.3.1 Quantificação dos Glicosaminoglicanos Urinários	76
5.4 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO SÉRICO	80
5.5 ANÁLISE DO LÍQUIDO SINOVIAL	82
5.5.1 Quantificação do Condroitim Sulfato	82
5.5.2 Quantificação de Ácido Hialurônico	85
6 DISCUSSÃO	88
7 CONCLUSÃO	97
REFERÊNCIAS	98
APÊNDICES	113

1 INTRODUÇÃO

Os programas de treinamento intensos frequentemente causam claudicação em equinos, normalmente, devido a doenças articulares que ocorrem no momento de melhor capacidade atlética do cavalo. Isto acontece justamente pelo fato das articulações serem expostas repetitivamente a fortes impactos durante um longo período (BROWN et al., 1998), iniciando-se assim o processo degenerativo da cartilagem articular pela produção e liberação de citocinas e consequentemente estimulação de metaloproteinases e de outros componentes inflamatórios. Caso a inflamação persista, a consequência final é o desenvolvimento da osteoartrite (ROSSDALE et al., 1985; MCILWRAITH, 1996).

A osteoartrite é a causa mais comum de claudicação em cavalos, sendo frequentemente associada com baixo desempenho e abandono precoce de atividades esportivas (LEES, 2003).

Na osteoartrite, ocorre aumento da degradação dos proteoglicanos da cartilagem articular. Com isso, mais fragmentos de proteoglicanos cartilagíneos são liberados no líquido sinovial, juntamente com fragmentos de colágeno tipo II. Esses fragmentos são excretados na urina, não na forma de proteoglicanos, mas de glicosaminoglicanos livres ou parcialmente degradados (WASTESON; WESSLER, 1971; PENNOCK et al., 1975).

Com o uso de novos testes bioquímicos e imunológicos, pesquisadores têm procurado identificar os produtos desta degradação cartilagínea no líquido sinovial, soro e urina, tanto nos estágios agudos como nos crônicos das doenças articulares, a fim de se oferecer novos marcadores, que possam refletir a destruição cartilagínea, bem como os efeitos dos tratamentos empregados, monitorando assim, a progressão da doença (ALWAN et al., 1991).

Numerosos estudos também têm investigado o potencial da função dos condroprotetores na desaceleração do processo degenerativo e no reparo da cartilagem articular (BRIEF et al., 2001).

Os condroprotetores são drogas compostas por agentes semelhantes aos componentes da matriz cartilagínea e são comumente empregados no tratamento da doença articular degenerativa. Eles agem tanto na membrana sinovial como na cartilagem articular aumentando a produção de ácido hialurônico (AH), inibindo a

ação de enzimas responsáveis pela degradação da cartilagem, fornecendo precursores necessários para manutenção e reparação cartilagínea e incentivando a normalização química e estrutural do líquido sinovial e da matriz da cartilagem, melhorando, portanto a função articular (BASSLEER et al., 1992; BUCCI, 1994).

Apesar de vários estudos *in vitro* comprovarem os efeitos benéficos destes agentes ditos condroprotetores, ainda faltam estudos adicionais, *in vivo* e a longo prazo, documentando sua plena eficácia clínica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OSTEOARTRITE (OA)

Doença articular degenerativa (DAD), osteoartrose, osteoartrite, são sinônimos utilizados para classificar as alterações não-infecciosas e progressivas que acontecem na cartilagem das articulações sinoviais ou diartroses (CALDEIRA et al., 2002). Estes termos são geralmente utilizados na medicina humana para descrever a deterioração idiopática das articulações, que é vista especialmente em pessoas idosas (RICHARDSON, 1990).

É uma doença crônica das articulações que, uma vez instalada, leva seus portadores a uma incapacidade funcional progressiva. Contudo, a doença não é sinônimo de envelhecimento, mas uma vez instalada progride com a idade (VANNUCCI et al., 2002).

Osteoartrite é um dos tipos mais comuns de artrite em seres humanos e animais, sendo a causa mais comum de claudicação em cavalos e cães. Em cavalos, a osteoartrite é frequentemente associada ao baixo desempenho e abandono precoce de atividades esportivas, tendo, portanto, importantes implicações financeiras para os proprietários destes animais (LEES, 2003).

A osteoartrite equina pode ser considerada como um grupo de distúrbios caracterizado por deterioração progressiva da cartilagem articular, acompanhada de alterações ósseas e de tecidos moles, incluindo esclerose do osso subcondral, formação de osteófitos marginais, fibroses dos tecidos peri-articulares e vários graus de inflamação sinovial (VIGNON et al., 1999; KIDD et al., 2001; MCILWRAITH, 2002; CARON, 2003; HARST et al., 2005).

A deterioração da cartilagem articular é caracterizada por divisões e fragmentação local, sendo que na maioria das vezes, há sinovite e efusão articular associada, apresentando-se clinicamente por dor e disfunção da articulação acometida (MCILWRAITH, 2002).

2.1.1 Etiopatogenia

A osteoartrite primária pode ser idiopática, ou seja, sem uma etiologia identificável, em contrapartida a osteoartrite secundária é extremamente comum e possui diversas etiologias, dentre elas: trauma articular, fraturas e injúrias ligamentares, inflamações, infecções, doenças imunomediadas, anormalidades congênitas ou de desenvolvimento: osteocondrite dissecante, displasia coxo-femural, e também causas metabólicas, endócrinas, neoplásicas e iatrogênicas (MAY, 1994).

Contudo, a etiopatogenia da osteoartrite não está totalmente esclarecida, mas três mecanismos são propostos. O primeiro fundamentalmente envolve uma cartilagem deficiente com propriedades biomecânicas anormais. A segunda hipótese baseia-se em uma alteração física no osso subcondral decorrente da cartilagem articular apresentar-se bastante delgada para absorver choques, sendo a carga de impacto atenuada somente pelos tecidos moles periarticulares, músculos, osso subcondral e osso trabecular fiseal (CARON, 2003).

A terceira, e mais aceita, baseia-se na atuação de forças mecânicas causando dano na cartilagem saudável. Acredita-se que a injúria matricial ou celular, resultante dessas forças, cause alterações metabólicas nos condrócitos, levando a liberação de enzimas proteolíticas que provocam fibrilação da cartilagem articular e a degradação dos proteoglicanos (CARON, 2003).

Microtraumas repetitivos são provavelmente os fatores etiológicos mais comuns na osteoartrite em equinos, e a relação com as lesões é definida em situações específicas do esporte (CHARLOTTE et al., 1999; MAGNUSSON; EKMAN, 2001; CARON, 2003; RIGGS, 2006). Kidd et al. (2001) sugerem inclusive que um único episódio traumático possa originar a osteoartrite.

2.1.2 Patofisiologia da Doença Articular

Inicialmente, a cápsula articular responde às inflamações tornando-se progressivamente vascularizada e diminuindo de espessura. À medida que os

sinoviócitos liberam citocinas e mediadores inflamatórios, acentua-se a inflamação na articulação. Com o trauma ou inflamação crônica, o revestimento sinovial articular torna-se hipertrofiado e vilos sinoviais tornam-se mais proeminentes, enquanto a subíntima torna-se fibrilada. A cápsula articular ou as estruturas de tecidos moles que envolvem a articulação danificam-se e o reparo é realizado pela granulação do tecido e frequentemente com algum grau de fibrose. O que confere dor e restrição de movimento nestas articulações (KIDD et al., 2001).

Numerosas citocinas estão envolvidas no metabolismo articular, sendo que as mais importantes na osteoartrite são as citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral alpha (TNF- α) (KIDD et al., 2001; CARON, 2003; RIGGS, 2006).

A IL-1 induz a liberação de metaloproteinases da matriz cartilágnea que destroem a cartilagem articular. Estimula fibroblastos a produzir colágeno tipo I e tipo III que contribuem para a fibrose da cápsula articular durante a inflamação crônica (KIDD et al., 2001). A IL-1 também diminui a síntese de proteoglicanos e de colágeno tipo II, sendo responsável pela formação de tecido de reparação funcionalmente inadequado (CARON, 2003).

A TNF- α é uma citocina mediadora do processo inflamatório agudo, envolvida nos estágios iniciais do desenvolvimento da doença degenerativa articular (CARON, 2003). É encontrada em elevadas concentrações em articulações inflamadas, sendo produzida pelos fagócitos mononucleares. Estimula a síntese de enzimas degradativas da matriz extracelular, e de prostaglandina E₂ (PGE₂), e inibe a síntese de proteoglicanos e colágeno pelos condrócitos (MCILWRAITH, 1996; MAY, 1997; CARON, 2003), tendo um papel predominante no início e progressão da destruição articular (PENNINX et al., 2004).

A PGE₂ é um mediador inflamatório que pode contribuir para a depleção da matriz extracelular causando erosão na cartilagem e no osso subcondral (CARON, 2003). É o mediador inflamatório mais importante encontrado durante a inflamação articular (HARDY et al., 1998). Pode ser liberada pelas células sinoviais e por condrócitos, diminuindo a síntese de proteoglicanos e acelerando a perda de glicosaminoglicanos pela cartilagem articular (GIBSON et al., 1996).

As PGE₂ juntamente com outras substâncias, como as citocinas e os leucotrienos, parecem aumentar a sensibilidade dos nociceptores (receptores de dor) presentes nos tecidos que cercam a articulação. Ainda que não estejam

presentes na cartilagem articular, há uma abundância de nociceptores nos tecidos periarticulares como cápsula articular, ligamentos, tendões, músculos e osso subcondral. Como as prostaglandinas e outros mediadores aumentam a sensibilidade destes nociceptores aos estímulos mecânicos e químicos, pode ocorrer uma resposta dolorosa quando a articulação experimenta estímulos mecânicos normalmente inócuos, como distensão, movimento e pressão. Os estímulos mecânicos podem resultar na distensão da cápsula articular, dos tendões e dos ligamentos devido a uma alteração no caminhar, espasmos musculares secundários ao esforço e fraqueza, ou pressão exercida sobre o osso subcondral devido à perda de cartilagem e à biomecânica alterada (DRAY, 1995).

Há também evidências de que a membrana sinovial e a cápsula articular inflamadas são fonte de enzimas lisossomais degenerativas. Outro mecanismo que pode estar envolvido na degeneração da cartilagem articular é o radical peróxido que degrada os proteoglicanos, colágeno e o ácido hialurônico (MCILWRAITH, 1996).

As metaloproteinases (MMPs) são sintetizadas pelos sinoviócitos e condrócitos e estão presentes em altas concentrações em doenças articulares. (CARON, 2003). São as principais responsáveis pela degradação da matriz cartilaginosa na osteoartrite, e são inibidas pelos inibidores de metaloproteinases teciduais (TIMPs). Logo, o balanço entre as MMPs e TIMPs é importante para a progressão da degradação da cartilagem articular (MCILWRAITH, 1996; CLEGG et al., 1998).

Muitas vezes, a quantidade dos proteoglicanos da cartilagem articular é reduzida, juntamente com a desagregação do colágeno. Isso resulta em aumento da captação da água na cartilagem tornando-a biomecanicamente frágil. Estes achados também podem ser acompanhados por necrose de condrócitos e eventual perda de espaço articular. Esclerose óssea subcondral comumente acompanha a degeneração cartilagem (KAWCAK et al., 2001).

Degradação do ácido hialurônico no líquido sinovial é resultante de quimiotaxia e de subprodutos da inflamação, enzimas lisossomais, e não lisossomais elaboradas por sinoviócitos lesionados, radicais livres derivados de neutrófilos e macrófagos. (GOODRICH; NIXON, 2006).

A progressão crônica dessas alterações leva a formação de osteofitos periarticulares nas margens articulares. A camada fibrosa e revestimento sinovial da

cápsula articular são alterados na osteoartrite. A sinóvia torna-se congestionada, descolorada, e espessada. Histologicamente, sinoviócitos aparecem hipertróficos, e células linfoplasmáticas e macrófagos podem estar presentes na subíntima do tecido sinovial (MCILWRAITH, 1996).

Conforme mostrado acima, existe uma multiplicidade de fatores envolvidos na degradação enzimática da cartilagem articular. Quando a inflamação começa dentro da sinóvia, osso subcondral, ou cartilagem, a cascata inflamatória é de importância primordial para os eventos que se seguem. Entendimento da doença, e conceber um plano de tratamento que interrompa a consequente progressão das alterações bioquímicas é imperativo (TODHUNTER; LUST, 1990).

A figura 1 ilustra a estrutura de uma articulação saudável e as figuras 2 e 3 mostram as alterações ocorridas na articulação quando se desenvolve o processo de osteoartrite

Fonte: <http://www.dclahdvm.com/Articles/EquineJointDisease/EquineJointDisease.htm>

Figura 1 - Estrutura de articulação saudável
- São Paulo - 2009

Fonte: <http://www.dclahdvm.com/Articles/EquineJointDisease/EquineJointDisease.htm>

Figura 2 - Alterações articulares ocorridas na osteoartrite - São Paulo - 2009

Líquido sinovial com mediadores inflamatórios

Fonte: <http://www.dclahdvm.com/Articles/EquineJointDisease/EquineJointDisease.htm>

Figura 3 - Alterações articulares ocorridas na osteoartrite - São Paulo - 2009

2.1.3 Tratamento

O tratamento visa inibir as mudanças ocorridas durante o processo da osteoartrite, evitar maiores degradações cartilagíneas e o restabelecimento da função. A terapia precoce e focada para tratar a inflamação irá reduzir a progressão da doença. Infelizmente os clínicos nem sempre são capazes de intervir nas fases iniciais e, muitas vezes, começam o tratamento em pacientes com doença subaguda ou crônica.

Na última década, estudos experimentais e em seres humanos acometidos por osteoartrite resultaram em uma explosão de conhecimentos sobre a estrutura, bioquímica e metabolismo da cartilagem articular juntamente com a maior conscientização sobre o impacto social e econômico da doença articular.

Em equinos, as terapias convencionais para a osteoartrite visam aliviar a dor e o desconforto, incluindo, muitas vezes, o uso de anti-inflamatórios não hormonais (AINEs) ou administração intra-articular de esteróides (TRUMBLE, 2005). Como a osteoartrite é frequentemente uma doença crônica, que exige longo período de terapia, o uso prolongado destes fármacos podem levar a efeitos secundários. Por exemplo, AINEs podem ser ulcerogênicos, ou terem efeitos adversos em condrócitos e na formação da matriz da cartilagem (MOSKOWITZ, 1996). Além disso, administrações de esteróides intra-articular, a longo prazo, podem alterar o metabolismo da cartilagem articular (FRISBIE et al., 1998).

A osteoartrite também é a doença em que as pessoas mais utilizam outras alternativas de terapias, numa tentativa de aliviar os efeitos colaterais ou efeitos incompletos das terapias convencionais (RESCH et al., 1997).

Estas alternativas de terapias incluem exercício, fisioterapia, acupuntura, quiropraxia, e uso de nutracêuticos. O uso de nutracêuticos na osteoartrite visa a diminuição das doses de outros medicamentos que são mais deletérios ao organismo, e a prevenção de uma maior degradação das estruturas presentes na articulação (TRUMBLE, 2005).

2.2 AGENTES MODIFICADORES DA DOENÇA OSTEOARTRÍTICA (AMOA)

Nos últimos anos, foram feitos esforços para identificar tratamentos complementares para a osteoartrite. A investigação tem incidido sobre métodos e tratamentos capazes de abrandar a progressão da degradação da cartilagem, e promover a síntese da matriz cartilagínea (SERNI, 1993).

Os produtos disponíveis no mercado prometem um efeito positivo sobre a matriz da cartilagem, aumentando a produção de ácido hialurônico (AH), inibindo as enzimas catabólicas em articulações osteoartíticas, fornecendo precursores necessários para manutenção e reparação cartilagínea (BUCCI, 1994), e incentivando a normalização química e estrutural do líquido sinovial e da matriz da cartilagem (BASSLEER et al., 1992), melhorando, portanto a função articular.

Muitos destes agentes ganharam lugar no tratamento da osteoartrite em animais, apesar da falta de estudos científicos confirmando a sua eficácia clínica. Esses produtos foram inicialmente chamados de “agentes condroprotetores”, ou seja, compostos que: aumentam a síntese de macromoléculas por condrócitos; aumentam a síntese de ácido hialurônico por sinoviócitos; inibem enzimas degradativas ou mediadores inflamatórios; e eliminam ou previnem a formação de fibrina, trombos, e placas na membrana sinovial ou vasos subcondrais (GHOSH et al., 1992).

Atualmente, não se conhece um agente capaz de realizar concomitantemente todos estes objetivos. Como resultado, o termo agente condroprotetor é considerado impróprio por muitos autores, e o termo agente modificador da doença osteoartítica é preferível (MCLAUGHLIN, 2000).

Além disso, como muitos destes produtos agem gradualmente incorporando-se na matriz da cartilagem, o termo agente modificador da doença osteoartítica de ação lenta é frequentemente utilizado. Estes produtos podem ser divididos em produtos de administração parenteral e de administração oral (MCLAUGHLIN, 2000).

Os agentes modificadores da doença osteoartítica orais são comercializados como suplementos nutricionais. Logo, uma vez considerados suplementos, seus fabricantes não são obrigados a fornecer dados rígidos sobre sua eficácia clínica a órgãos controladores governamentais de medicamentos. Como resultado, pouca

evidência científica sobre seu valor no tratamento da osteoartrite tem sido relatada (MCLAUGHLIN, 2000).

Além disso, não existe controle rígido para garantir, que os produtos realmente contenham os componentes listados no rótulo, ou que os componentes estejam em quantidades adequadas (MCLAUGHLIN, 2000).

Portanto, a variação entre os produtos disponíveis é significativa, e os resultados obtidos na avaliação científica de um determinado produto, podem não se aplicar a outros, aparentemente semelhantes (MCLAUGHLIN, 2000).

2.2.1 Glicosaminoglicanos

Os glicosaminoglicanos (GAGs) são heteropolissacarídeos lineares formados por unidades dissacarídicas repetitivas, em que um dos açúcares é uma hexosamina (α -D-glucosamina, β -D-glucosamina ou β -D-galactosamina) e o outro é um açúcar não-nitrogenado, que pode ser um ácido urônico (ácido β -D-glucurônico ou α -L-idurônico) ou um açúcar neutro (β -D-galactose), unidos por ligações glicosídicas. Estes compostos apresentam alta densidade de carga aniônica devido à presença de grupamentos sulfato em diferentes números e posições e ainda grupamentos carboxila dos resíduos de ácido urônico (JACKSON et al., 1991; KJÈLEEN; LINDAHL, 1991).

Os principais glicosaminoglicanos de tecidos de mamíferos são: ácido hialurônico ou hialuronam (AH), condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS), queratam sulfato (KS), heparam sulfato (HS) e heparina (Hep). O quadro 1 apresenta a composição desses glicosaminoglicanos quanto ao tipo de hexosamina, tipo de açúcar não-nitrogenado, tipo e posição dos grupamentos sulfato. E as unidades dissacarídicas são apresentadas na figura 4 (VIEIRA et al., 2007).

GAGs	Açúcar não nitrogenado		Hexosamina (Hx)		Posição sulfato
Ácido hialurônico	Ácido β -D-glucurônico		β -D-N-acetilglucosamina		(-)
Condroitim sulfato	Ácido β -D-glucurônico		β -D-N-acetilgalactosamina		C4 ou C6 (Hx)
Dermatam sulfato	Ácido α -L-idurônico Ácido β -D-glucurônico		β -D-N-acetilgalactosamina		C4 (Hx)
Queratam sulfato	β -D-galactose		β -D-N-acetilglucosamina		C6 (Hx) C6 (Gal)
Heparam sulfato	Ácido β -D-glucurônico Ácido α -L-idurônico		α -D-N-acetilglucosamina α -D-glucosamina sulfato		N2 e/ou C6 (Hx)
Heparina	Ácido α -L-idurônico Ácido β -D-glucurônico		α -D-glucosamina N-sulfato		N2 e/ou C6 (Hx) C2 (AU)

Hx: resíduos de hexosamina; AU: resíduos de ácido urônico

Quadro 1 - Composição dos dissacarídeos dos glicosaminoglicanos de mamíferos - São Paulo - 2009

Figura 4 - Principais unidades dissacarídicas dos glicosaminoglicanos - São Paulo - 2009

Os glicosaminoglicanos ocorrem nos tecidos covalentemente ligados às proteínas, formando os proteoglicanos, com exceção do ácido hialurônico, que ocorre nos tecidos como cadeia polissacarídica livre (FRASER; LAURENT, 1989). Portanto, os proteoglicanos (PGs) são macromoléculas complexas formadas por um esqueleto protéico a qual, as cadeias de glicosaminoglicanos estão ligadas covalentemente (Figura 5).

Fonte: <http://employees.csbsju.edu/HJAKUBOWSKI/classes/ch331/cho/proteoglycan.gif>

Figura 5 - Estrutura do proteoglicano - São Paulo - 2009

Os proteoglicanos são sintetizados pela via secretória celular, sendo o esqueleto protéico traduzido no retículo endoplasmático rugoso, e glicosilado no retículo endoplasmático rugoso e no complexo de golgi.

Em contraste, o ácido hialurônico é sintetizado na superfície celular por uma família de enzimas de membrana chamadas de ácido hialurônico sintases (*HAS*, *hyaluronic acid synthases*), que adicionam os resíduos alternados de N-acetil-glucosamina e ácido glucurônico à extremidade redutora do polímero nascente. À medida que vai sendo sintetizado, o polissacarídeo já é secretado para o meio extracelular.

2.2.1.1 Proteoglicanos de Cartilagem

O primeiro proteoglicano descrito foi o agrecan, que ocorre em altas concentrações na matriz da cartilagem. O tecido cartilágneo é, de todos os tecidos de mamíferos, o mais rico em proteoglicanos e glicosaminoglicanos, que correspondem a mais de 10% do peso seco do tecido (MICHELACCI et al., 1979, 1981).

O agrecam é formado por um esqueleto protéico de cerca de 200 kDa, ao qual estão ligadas cadeias de queratam sulfato (cerca de 30) e de condroitim sulfato (cerca de 100) (Figura 6) (GALLAGHER, 1989).

Fonte: © 1994 by Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and James D. Watson. Molecular Biology of the Cell. Figura 18-38, disponível no [site](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>.

Figura 6 - Moléculas de agrecam e de proteína de ligação formando agregados com ácido hialurônico - São Paulo - 2009

O esqueleto protéico forma duas regiões globulares próximo à extremidade N-terminal da molécula – G1 e G2 – e uma região globular na extremidade C-terminal. Entre G2 e G3 existe um longo domínio estendido, ao qual se ligam as cadeias de glicosaminoglicanos. Além disso, estão presentes também oligossacarídeos N- e O-ligados (Figura 7) (GALLAGHER, 1989).

Fonte: The involvement of aggrecan polymorphism in degeneration of human intervertebral disc and articular cartilage. P. Roughley, D. Martens, J. rantakokko, M. Alini, F. mwale and J. Antoniou, p. 3. Disponível no *site* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>.

Figura 7 - Estrutura do Agrecam. LP - ligação protéica, G1, G2, G3 - domínios, KS - queratam sulfato, IGD - interglobular domínio, CS1, CS2 - domínios ricos em condroitim sulfato - São Paulo - 2009

Agrecam interage, pelo domínio G1, com ácido hialurônico, formando agregados multi e macromoleculares enormes, que ficam presos na malha de colágeno. Esta ligação é estabilizada por uma glicoproteína de baixo peso molecular, que tem homologia com G1, chamada de “proteína de ligação” ou *link protein* (FRANZÉN et al., 1981).

Estes agregados devido à sua natureza poliônica, retêm água e são os principais responsáveis pelas propriedades de resistência à pressão da cartilagem, ou seja, quando a cartilagem é submetida à pressão, a água se desloca, sendo

atraída de volta quando a pressão diminui, causando mínima deformação e amortecendo o impacto sobre os ossos (SCOTT, 1992).

O domínio G3 interage com outras proteínas da matriz, regulando e estabilizando todo o tecido.

Além disso, proteoglicanos de baixo peso molecular, da família SLRP (*small leucine rich protein*) como decorim e biglicam, e proteoglicanos de dermatam sulfato também estão presentes. Decorim é capaz de interagir com fibrilas de colágeno regulando a fibrilogênese (KRESSE et al., 1993). Na superfície dos condrócitos, (assim como em quase todas as demais células de tecidos animais) estão presentes proteoglicanos de heparam sulfato da família dos sindecans.

Nas décadas de 1970/1980, demonstrou-se que existe uma correlação entre a estrutura do agregam e a ocorrência de processos de crescimento e ossificação nas cartilagens articulares. Cartilagens humanas de indivíduos recém-nascidos contêm muito menos queratam sulfato do que cartilagens adultas normais. Além disso, o condroitim sulfato é híbrido, formado por unidades dissacarídicas 4- e 6-sulfatadas, enquanto no adulto, é exclusivamente 6-sulfatado. A proporção de dissacarídeos 4-sulfatados é tanto maior quanto mais próximo da região de crescimento ósseo, chegando a 50% no disco epifisário (MICHELACCI et al., 1979, 1981).

Na osteoartrite e em tumores de cartilagem, tanto benignos como malignos, as mesmas alterações também ocorrem: diminuição na concentração de queratam sulfato e aumento na proporção de dissacarídeos 4-sulfatados no condroitim sulfato (MICHELACCI et al., 1979, 1981; MOURÃO et al., 1979).

Brown et al. (1998), encontraram relação direta entre o aumento de dissacarídeos 6-sulfatados na cartilagem articular de equinos e o avançar da idade, e uma diminuição destes nos casos de doença articular degenerativa.

Esses dados sugerem uma correlação entre estrutura do condroitim sulfato da matriz da cartilagem, e a ocorrência de processos de crescimento e ossificação do tecido. Por outro lado, o condroitim 6-sulfato pode estar relacionado com a manutenção da integridade da superfície articular (MICHELACCI et al., 1979).

2.2.1.2 Ácido Hialurônico

Ácido hialurônico, também conhecido como hialuronam, é o glicosaminoglicano estruturalmente mais simples, constituído pela alternância de N-acetilglucosamina e ácido glucurônico. Conforme já mencionamos, diferentemente dos outros glicosaminoglicanos, este é o único que não ocorre nos tecidos covalentemente ligado a um esqueleto protéico. Além disso, pode se associar por interações não-covalentes com outras moléculas específicas e esta interação pode contribuir para a organização e matriz onde reside (WIGHT et al., 1991).

O ácido hialurônico é um componente comum de fluídos orgânicos, incluindo o líquido sinovial e o humor aquoso e da matriz extracelular (ALTMAN; MOSKOWITZ, 1998).

Na cartilagem é sintetizado pelos condrócitos. Moléculas de agregam interagem com as moléculas nascentes de ácido hialurônico, tornando as regiões pericelulares da matriz extracelular mais ricas em glicosaminoglicanos (CHRIS et al., 2002).

O ácido hialurônico modula a resposta quimiotática dentro da membrana sinovial, reduzindo a migração celular e diminuindo as taxas de difusão e fluxo de solutos (FORRESTER; BALAZS, 1980; HOWARD; MCILWRAITH, 1993), ou seja, influencia a composição do líquido sinovial, agindo como barreira para componentes ativos do plasma e leucócitos adentrarem a cavidade articular (HOWARD; MCILWRAITH, 1996). Além disso, confere viscosidade ao líquido articular, facilitando a lubrificação articular.

2.2.1.3 Utilização de Condroitim Sulfato e Glucosamina no Tratamento da Osteoartrite

Como os proteoglicanos de condroitim sulfato são os principais constituintes das cartilagens, esperava-se que fornecendo condroitim sulfato, houvesse uma melhora das condições biológicas do tecido. Entretanto, há controvérsias quanto à

proposta sobre os benefícios do tratamento com condroitim sulfato nos pacientes com osteoartrite (OWENS et al., 2004).

Estudos *in vitro* demonstraram a capacidade do condroitim sulfato em diminuir a perda de componentes da cartilagem articular, e de inibir enzimas condrolíticas (BASSLEER et al., 1998).

Em estudo clínico realizado em humanos com osteoartrite e idade acima de 50 anos, observou-se significativa redução do uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) no grupo de pacientes tratados com doses de 2 g/dia de condroitim sulfato (MAZIÉRES et al., 1992). O alívio da dor relacionada à osteoartrite foi percebido após três meses de tratamento e persistiu até um a dois meses após a descontinuação do tratamento (VERBRUGEN et al., 1997). Além disso, três metanálises (LEEB et al., 2000; MCALINDON, 2000; TOWHEED, 2002) demonstraram a eficácia de condroitim sulfato no controle da dor e na melhora funcional articular dos pacientes acometidos pela osteoartrite.

Quando adicionado à cultura celular de condrócitos, efeitos metabólicos foram notados. Em modelos experimentais com condrócitos humanos, o condroitim sulfato aumentou a produção de glicosaminoglicanos, sem efeito visível sobre a síntese de colágeno II (BASSLEER et al., 1998).

Em modelos experimentais utilizando coelhos com osteoartrite induzida experimentalmente, o condroitim sulfato conferiu proteção à cartilagem em relação a sua degradação. Demonstrou-se que os animais que receberam suplementação com condroitim sulfato apresentaram menor perda de proteoglicanos da cartilagem em relação aos que não receberam a suplementação (TAYLOR et al., 1996).

Resumidamente, existem inúmeros artigos científicos mostrando a atividade imunológica, antioxidante e os efeitos sobre o metabolismo celular *in vitro* do condroitim sulfato (VOLPI, 2006). Bem como, estudos clínicos que comprovam sua eficácia clínica em diminuir os sintomas da osteoartrite tanto em humanos como em equinos. Paralelamente, também existem estudos randomizados e com controle que não observaram qualquer eficácia clínica do condroitim sulfato (RICHARDSON; LOINAZ, 2007).

Quanto à glucosamina que é uma hexosamina (monossacarídeo aminado) componente de quase todos os glicosaminoglicanos e glicoproteínas de tecidos animais, incluindo a cartilagem articular. É um dos glicolipídeos e componente de

oligossacarídeos O-ligados e N-ligados das glicoproteínas dos glicosaminoglicanos (CANAPP, 1999; DEAL; MOSKOWITZ, 1999).

A glucosamina é produzida no organismo pela adição de um grupo amino à glicose. Esta molécula pode ser posteriormente acetilada, formando N-acetilglucosamina. A N-acetilglucosamina é convertida em N-acetilgalactosamina (a hexosamina de condroitim sulfato e dermatam sulfato) pela C4-epimerase, que age sobre a UDP-N-acetilglucosamina (DEAL; MOSKOWITZ, 1999).

Após a administração oral de glucosamina sulfato, pelo menos 90% é absorvido, aparecendo 10% nas fezes. Da quantidade absorvida, cerca de 20-30% do composto aparece posteriormente na urina, e até 70% aparece expirado com CO₂, e cerca de 8-12% são retidos nos tecidos (VAN DER KRAN et al., 1988).

Estudos utilizando cromatografia líquida de alta performance (HPLC) mostraram que a biodisponibilidade da glucosamina é de 21% em humanos e 12% em cães, após administração oral (ADEBOWALE et al., 2000). Estudos independentes mostraram que a biodisponibilidade do medicamento oral em equinos é de 6% (OKE; WEESE, 2006). Além disso, concluiu-se que o nível de glucosamina no líquido sinovial é 10% do nível de glucosamina no soro, indicando que a glucosamina não é rapidamente difundida da circulação para o líquido sinovial (OKE; WEESE, 2006).

Preparações de glucosamina estão disponíveis no mercado na forma de sulfato, cloro-hidrato, e cloreto. Também existem preparações de N-acetilglucosamina.

A maioria dos estudos clínicos em humanos é conduzida com glucosamina sulfato, uma vez que também o sulfato pode ser componente limitante para a síntese dos glicosaminoglicanos sulfatados. Há menos informações disponíveis sobre os efeitos clínicos das outras formas. As preparações sulfato e cloro-hidrato da glucosamina diferem em grau de pureza, teor de sódio, bioatividade e equivalência de doses. Porém a maioria dos estudos realizados em cavalos utiliza a forma de cloro-hidrato (Figura 8) (LAVERTY et al., 2005).

Fonte : <http://urahglobalmarketing.com/images/Molecular-S-of-Glucosamine2.jpg>

Figura 8 - Estrutura da glucosamina sulfato e da glucosamina cloro-hidrato - São Paulo - 2009

Não há relatos de efeitos colaterais do uso de glucosamina em animais (OKE; WEESE, 2006). Contudo, sugere que a glucosamina cloreto e a N-acetil glucosamina não são efetivas. Hoffer (2001), indicando a importância da associação com o sulfato inorgânico, cuja depleção pode levar à diminuição da síntese de glicosaminoglicanos *in vivo*.

Um estudo analisou os efeitos inibitórios da glucosamina (concentração de 25 mg/ml) em cartilagem articular de equina condicionada com IL-1, isto porque a IL-1 tem mostrado estar presente em níveis elevados nas doenças articulares e é responsável por estimular as alterações ocorridas na osteoartrite, tais como o aumento da produção de PGE_2 , óxido nítrico, e matriz das metaloproteinases. Verificou-se um efeito inibitório sobre todas as enzimas associadas com a degradação da cartilagem articular neste experimento. Porém a significância estatística descrita neste experimento não implica necessariamente em um significado clínico, porque uma concentração de 25 mg/ml é improvável de ser alcançada *in vivo* (FELTON et al., 2002).

Em um outro estudo que analisou a síntese de glicosaminoglicanos e o seu conteúdo total de fragmentos de cartilagem articular equina (normal e cultivada com IL-1) que foram tratadas com glucosamina, condroitim sulfato e a associação de ambos (0; 12,5; 25; 125; e 250 μ g/ml), demonstrou que os fragmentos cultivados com IL-1 tratados com altas doses de glucosamina e condroitim sulfato apresentavam uma diminuição da liberação de glicosaminoglicanos, e este achado

possui uma significância clínica, já que outros pesquisadores relataram que os níveis de glucosaminoglicanos foram maiores em articulações com osteoartrite, o que pode indicar degradação da cartilagem. A concentração de 250 µg/ml pode ser encontrada *in vivo* (ALWAN et al., 1991).

A glucosamina também afeta a expressão gênica de condrócitos humanos, induzindo um aumento duas vezes maior nas concentrações do mRNA de perlecan e agregam (JIMENEZ; DODGE, 1997).

Em condrócitos de fetos humanos, a glucosamina aumenta a síntese de colágeno tipo II específico de cartilagem, sendo que este efeito não é observado em condrócitos de adultos (JIMENEZ; DODGE, 1997).

Sandy et al. (1998) demonstraram que o efeito da interleucina (IL-1) na indução da atividade da agreganase nos condrócitos pode ser inibida pela glutamina e glucosamina.

Além dos efeitos da glucosamina no metabolismo da cartilagem, efeitos anti-inflamatórios têm sido descritos como, por exemplo, em modelos experimentais de inflamação em ratos. Inicialmente a atividade anti-inflamatória da glucosamina foi relacionada a mecanismos substancialmente diferentes daqueles utilizados pelos dos AINEs, que atuam principalmente por inibição das ciclooxigenases, ou seja, não sendo um inibidor das ciclooxigenases, seus efeitos seriam prostaglandina-independentes (SETNIKAR et al., 1991). Porém, nos estudos mais recentes, a redução dos níveis de PGE₂ em fragmentos de cartilagem tratados com glucosamina ou associada com o condroitim sulfato foi atribuída a uma diminuição na expressão gênica de ciclooxigenases-2 (COX-2) (CHAN et al., 2005).

Alguns dos mecanismos da ação anti-inflamatória da glucosamina podem estar relacionados com o estímulo da biossíntese dos proteoglicanos. Tem sido sugerido que os recém-sintetizados proteoglicanos podem estabilizar membranas celulares, resultando em um efeito anti-inflamatório (VERBRUGGEN et al., 1997).

A glucosamina também reduz a geração de radicais superóxido por macrófagos e inibe enzimas lisosomais (ZUPANETS et al., 1991).

Estudos em que a glucosamina foi administrada em associação com AINEs, como diclofenaco, indometacina ou piroxicam, mostraram que esta associação permite a diminuição na dose de AINEs (ZUPANETS et al., 1991).

Estes potenciais mecanismos de ação tornam a glucosamina uma opção atraente para o tratamento de osteoartrite (PELLETIER et al., 1997).

Muitos agentes orais modificadores da doença osteoartrítica contêm glucosamina e condroitim sulfato, em diferentes combinações e formas. Postula-se que estes componentes sejam absorvidos pelo trato gastrointestinal, e incorporados aos tecidos articulares, fornecendo os precursores necessários para promover o reparo da cartilagem (MCLAUGHLIN, 2000).

Tanto a glucosamina quanto o condroitim sulfato inibem a degradação dos proteoglicanos, principalmente pela inibição das metaloproteinases e da IL-1. A produção de glicosaminoglicanos também é estimulada por ambos (RODGERS, 2006). A glucosamina em associação com o condroitim sulfato estimulam a produção de ácido hialurônico, aumentando assim a viscosidade do líquido sinovial.

Existem numerosos estudos em cavalos que sugerem uma ação sinérgica entre a glucosamina e o condroitim sulfato, e que seus efeitos benéficos são maiores quando em associação do que quando cada um é administrado separadamente. (RODGERS, 2006).

Rodgers (2006) relatou que o uso oral de glucosamina e condroitim sulfato em cavalos com osteoartrite, diminui drasticamente a necessidade de infiltrações intra-articulares com ácido hialurônico e/ou corticosteróides tanto em número de aplicações assim como em frequência.

A maioria dos estudos realizados em equinos prioriza doses entre nove a 12 gramas de compostos ativos de glucosamina e condroitim sulfato por seis a oito semanas de tratamento a fim de demonstrar alguma eficácia, por meio de mensuração clínica no alívio de dor articular. (RODGERS, 2006).

Hanson et al. (1997), realizaram um estudo utilizando 25 cavalos com doença articular degenerativa e que foram suplementados com a associação de glucosamina e condroitim sulfato, por seis semanas. A cada duas semanas foram feitas avaliações quanto ao grau de claudicação e teste de flexão. Em todas as avaliações houve uma rápida e significativa melhora já nas primeiras duas semanas, independentemente da idade, articulação afetada e atividade esportiva.

Em 2001 Hanson et al. realizaram outro estudo usando 14 cavalos com idades entre cinco e 15 anos com claudicação progressiva de membro torácico, em que foi administrado composto contendo glucosamina e condroitim sulfato por dois meses. As avaliações clínicas foram realizadas no dia 0, 28 e 56. Obteve-se melhora significativa dos graus de claudicação tanto no dia 28 quanto no dia 56 em relação ao grupo placebo.

Apesar dos resultados positivos apontados, há controvérsias quanto à proposta sobre os benefícios do tratamento com glucosamina e condroitim sulfato nos pacientes com osteoartrite (OWENS et al., 2004).

Relatos e alguns ensaios clínicos indicam que esses agentes são eficazes no tratamento da osteoartrite (MCLAUGHLIN, 2000). No entanto, estudos adicionais a longo prazo, são necessários para documentar sua plena eficácia no tratamento da osteoartrite, em animais (MCLAUGHLIN, 2000).

2.2.1.4 Utilização do Ácido Hialurônico no Tratamento da Osteoartrite

Estudos clínicos com administração de ácido hialurônico exógeno são realizados em cavalos desde a década de 1970. Alguns dos primeiros estudos realizados com injeção intra-articular de ácido hialurônico, relatou melhorias significativas na claudicação e qualidade do líquido sinovial, sendo que não houve reações adversas relatadas (ASHEIM; LINDBLAD, 1976).

Os estudos *in vitro* dos efeitos do ácido hialurônico exógeno identificaram inibição da quimiotaxia de macrófagos (PISKO et al., 1983) e redução da habilidade de proliferação e migração linfocítica (BALAZS; DARZYNKIEWICZ, 1973; HOWARD; MCILWRAITH, 1993).

Resumidamente, os efeitos benéficos do ácido hialurônico seriam explicados por um aumento da lubrificação da membrana sinovial, controle da passagem de células inflamatórias através da membrana, diminuição da efusão sinovial e efeito anti-inflamatório direto, especialmente pela diminuição das prostaglandinas no líquido sinovial (MCILWRAITH, 1994). A aplicação terapêutica de ácido hialurônico visa restabelecer essas funções na doença degenerativa. Os resultados observados em diversos estudos clínicos são positivos, mostrando melhora da claudicação, aspecto macroscópico da lesão, dentre outros. O exato mecanismo de ação celular do ácido hialurônico, entretanto, ainda não está plenamente esclarecido (GOODRICH; NIXON, 2006).

O ácido hialurônico exógeno estimula a síntese de novo ácido hialurônico, inibe a liberação de ácido araquidônico e inibe a síntese de prostaglandina E_2 induzida pela IL-1 pelos sinoviócitos humanos, e a partir de macrófagos durante a

fagocitose (HOWARD; MCILWRAITH, 1996). Também influencia na aderência, proliferação, migração e fagocitose dos leucócitos (ALTMAN; MOSKOWITZ, 1998), desempenha um efeito anti-inflamatório direto (FORTIER, 2005), e proporciona um efeito analgésico em cavalos com artrite traumática (BALAZS, 2004).

Todas essas propriedades biológicas parecem ser dependentes do peso molecular, e exigem um produto com peso superior a 900 kDa (GHOSH; GUIDOLIN, 2002; NAKAMURA et al., 2004).

Injeções intra-articulares são provavelmente as formas mais eficazes para a ação do ácido hialurônico em uma única articulação acometida (FORTIER, 2005).

Os riscos de infecção articular, e interesse de tratar múltiplas articulações, ao mesmo tempo, têm impulsionado o estudo clínico em preparações intravenosas e orais (FORTIER, 2005).

Há uma grande variedade de artigos científicos demonstrando os efeitos benéficos do ácido hialurônico em cartilagem (TAKAHASHI et al., 2000; GHOSH; GUIDOLIN, 2002), tendão (GAUGHAN et al., 1991) e osteoblastos (LAJEUNESSE et al., 2003).

Vários produtos orais comercializados contendo ácido hialurônico são tidos como eficazes para o tratamento de doenças articulares em cavalos (FORTIER, 2005). Contudo, não há dados satisfatórios quanto à absorção, biodisponibilidade, distribuição, ou a eficácia destes produtos orais (FORTIER, 2005).

Também, numerosos relatos clínicos apóiam o uso de ácido hialurônico na doença articular em equinos (RUTH; SWITES, 1985; GAUSTAD; LARSEN, 1995), e mais uma vez há poucos dados que documentem a farmacocinética e os efeitos biológicos da administração intravenosa de ácido hialurônico (KAWCAK et al., 1997; POPOT et al., 2004), e não há dados objetivos sobre a absorção ou eficácia de produtos orais com ácido hialurônico.

2.2.1.5 Degradação e Eliminação dos Proteoglicanos e Glicosaminoglicanos

Estima-se que dos 250 mg de glicosaminoglicanos metabolizados diariamente no homem, cerca de 10% desses sejam excretados na urina (HESSE et al., 1987).

Os 90% restantes são completamente despolimerizados até monossacarídeos e sulfato por enzimas lisossomais.

Cavalos excretam cerca de 2-10 mg/l glicosaminoglicanos na urina. Os principais glicosaminoglicanos encontrados na urina de cavalo são o condroitim sulfato (~70%), heparam sulfato (~20%) e dermatam sulfato (~10%). Além disso, são encontrados traços de queratam sulfato (~0,015 mg/l) e ácido hialurônico, só detectados por métodos imunoquímicos (VIEIRA et al., 2007).

Sabe-se que em humanos a excreção de glicosaminoglicanos sofre influência da idade (MICHELACCI; HORTON, 1989) as diferenças quanto a gênero e ritmo circadiano, desaparecem quando é feita a correção por creatinina urinária.

Como os métodos de isolamento e identificação dos glicosaminoglicanos são muitos e se baseiam em diferentes propriedades, os resultados obtidos por diferentes autores são, frequentemente, discordantes (MICHELACCI, 1995). Muitos autores dosam glicosaminoglicanos pelo método colorimétrico de dimetilmetilenodiamino (DMB), que sofre a influência de outros componentes (orgânicos e inorgânicos) da urina, levando a resultados pouco confiáveis (LIMA et al., 2007).

Em se tratando de equinos, vários foram os trabalhos que quantificaram os glicosaminoglicanos no líquido sinovial, porém poucos relatam a quantificação destes compostos na urina. Alwan et al. (1991) observaram níveis mais altos de glicosaminoglicanos no líquido sinovial, soro e urina de cavalos acometidos por osteoartrite do que em cavalos normais ou com artrite infecciosa. Porém, não discriminaram os glicosaminoglicanos urinários encontrados.

Outros métodos usados para isolamento dos glicosaminoglicanos urinários baseiam-se em precipitação com as aminas quartenárias brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) ou cloreto de cetilpiridina (CPC); precipitação com azul de alcian; diálise ou cromatografia de gel filtração para separação da fração macromolecular (MICHELACCI, 1995). Lima et al. (2007) mostraram que o isolamento de glicosaminoglicanos urinários por cromatografia por troca iônica após eletroforese em gel de agarose é um método confiável que elimina a interferência de outros componentes urinários e permite a identificação e quantificação individual de glicosaminoglicanos em equinos.

2.2.1.6 Biomarcadores da Doença Articular

Alterações bioquímicas causadas pela osteoartrite envolvem processos dinâmicos de todos os constituintes da articulação (FRISBIE et al., 2002). A liberação de diferentes macromoléculas e seus fragmentos no líquido sinovial e no soro e, posteriormente, excretados na urina na forma de glicosaminoglicanos estão relacionados a processos anabólicos e catabólicos da cartilagem (SUMER et al., 2006).

Vários pesquisadores têm tentado identificar produtos de degradação das macromoléculas típicas da cartilagem articular no líquido sinovial, soro e urina, como possíveis marcadores que possam refletir a destruição da cartilagem, monitorando assim o início, e a progressão da doença articular (ALWAN et al., 1991). Para tal, vários compostos têm sido utilizados, incluindo os glicosaminoglicanos.

Biomarcadores podem ser usados para: 1) esclarecer os processos patofisiológicos da articulação; 2) diagnóstico diferencial entre articulações afetadas e não afetadas, e distinção de grau de degradação na cartilagem articular; 3) monitorar a resposta à terapia; 4) possibilitar um prognóstico. De acordo com a maneira pela qual os biomarcadores são detectados, eles podem ser divididos em bioquímicos e imunológicos.

Recentemente o termo biomarcadores tem sido aplicado também para técnicas de imagem, marcadores genéticos e *microarrays*.

Biomarcadores que proporcionam informações específicas sobre alterações no anabolismo e catabolismo da matriz da cartilagem são designados como biomarcadores diretos. Eles são originários principalmente de tecidos cartilagíneos, ou são enzimas que somente são ativas nestes tecidos, como anticorpos contra propeptídeos carboxiterminais do colágeno tipo II (CPII), fragmentos de colágeno tipo II, glicosaminoglicanos (CS e KS), proteína oligomérica da matriz cartilagínea (MCILWRAITH, 2005).

Já os biomarcadores indiretos não são derivados de tecidos componentes da articulação, mas influenciam o metabolismo destes ou a integridade da matriz cartilagínea. Exemplos de biomarcadores indireto são: metaloproteinases de matriz (MMPs), agreganase, inibidores de metaloproteinases teciduais (TIMPs), ecosanóides (PGE₂), fatores de crescimento tipo insulina (IGF-1), interleucina 1 e 6

(IL-1, IL-6), $\text{TNF}\alpha$, ácido hialurônico e proteína C reativa (CRP) (MCILWRAITH, 2005).

Por outro lado de acordo com estudos de Vieira et al. (2007) a análise de glicosaminoglicanos da urina seria uma alternativa, bem menos invasiva, possibilitando a análise de um grande número de amostras.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da administração oral de condroitim sulfato, ácido hialurônico e glucosamina associados sobre a evolução clínica, radiológica, e glicosaminoglicanos urinários, do líquido sinovial e sérico de cavalos acometidos por osteoartrite.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O presente projeto teve como objetivos específicos:

- avaliar as alterações articulares em cavalos acometidos por osteoartrite antes, durante e após o término do tratamento com condroitim sulfato, glucosamina e ácido hialurônico por meio de exames clínico e radiológico;
- identificar e quantificar os glicosaminoglicanos urinários;
- identificar e quantificar condroitim sulfato e ácido hialurônico no líquido sinovial de articulações com osteoartrite;
- identificar e quantificar ácido hialurônico sérico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados seis equinos, com idades entre seis e doze anos, machos ou fêmeas, submetidos ao mesmo manejo nutricional, e alojados no Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo - USP.

Os animais foram avaliados clínica e radiograficamente no início do experimento (dia 0), para identificação de lesões articulares nas articulações tibiotársicas e exclusão de outras enfermidades que interferissem nos resultados. Também foram colhidas amostras de sangue, líquido sinovial e duas amostras de urina, com intervalo de 24 horas, de cada animal.

O tratamento foi iniciado pela administração oral diária de 30 gramas de preparação comercial contendo glucosamina (3,15 gramas), condroitim sulfato (2,85 gramas) e ácido hialurônico (0,10 gramas), por 25 dias consecutivos.

Foram colhidas amostras de sangue, líquido sinovial e urina nos dias 5, 10, 15, 20, 27, 34, 41, 48 e 55 após o início do tratamento.

Também foram colhidas amostras de líquido sinovial de 10 articulações tibiotársicas de cavalos hígidos como controle.

4.2 EXAME FÍSICO

O exame físico articular foi realizado no dia anterior ao início do tratamento (dia 0), e nos dias 30 e 60. O exame constou de:

- a - inspeção (aumento de volume, postura antiálgica em estação);
- b - palpação (calor, dor na flexão passiva, consistência);
- c - dinâmica (claudicação presente ou ausente);
- d - teste de flexão articular (positivo ou negativo).

4.3 EXAME RADIOGRÁFICO

O exame radiográfico foi realizado antes do início do tratamento e 30 dias após o término do mesmo, ou seja, 60 dias após o início da administração dos medicamentos. As articulações tibiotársicas dos animais selecionados foram radiografadas em quatro projeções: dorsoplantar, lateromedial, dorsolateral plantaromedial e dorsomedial plantarolateral.

A avaliação das imagens radiográficas foi realizada por meio de escores, utilizando uma escala de 0 a 5, adaptada de Kirker-Head et al. (2000):

Os parâmetros e escores utilizados foram os seguintes:

a - aumento de volume dos tecidos moles peri-articulares;

0 = nenhum

1 = perda de planos teciduais

2 = pequeno aumento de volume ou confinado à cápsula articular

3 = moderada distensão capsular

4 = severa distensão capsular, com envolvimento de outros tecidos

5 = grande aumento de volume envolvendo todos os tecidos peri-articulares

b - mineralização de tecidos moles;

0 = nenhum

1 = suspeito

2 = pequeno aumento de volume ou confinado à cápsula articular

3 = alteração capsular ou peri-articular

4 = reação marginal com osteófitos e entesófitos

5 = grande envolvimento de tecidos peri-articulares

c - aumento de espaço articular;

0 = nenhum

1 = suspeito

2 = imediatamente reconhecido, sem distensão da cápsula articular

3 = óbvio com distensão da cápsula articular

4 = articulação amplamente separada

5 = acompanhada por subluxação ou ruptura de ligamento

d - diminuição de espaço articular;

0 = normal

1 = leve ou orientação desigual do espaço articular

2 = estreitamento, com o espaço ainda observado entre as duas extremidades ósseas

3 = extremidades ósseas se tocando em alguns lugares

4 = acompanhada por esclerose subcondral

5 = anquilose ou pontes trabeculares

e - evidência de osteofitos;

0 = nenhum

1 = sugestivo de mineralização da margem articular

2 = margens articulares moderadamente elevadas

3 = borda da margem articular facilmente reconhecida

4 = “labeamento” proeminente ao redor da margem articular

5 = “labeamento” proeminente e irregular com fragmentação ou mineralização nos tecidos moles adjacentes

f - evidência de entesófitos;

0 = nenhum

1 = fraco sombreado na inserção capsular ou ligamentar

2 = linhas ou pontes de mineralização na inserção capsular ou ligamentar

3 = projeção óssea facilmente reconhecida no local da inserção

4 = reação óssea periosteal proeminente no local da inserção

5 = reação periosteal proeminente com extensiva mineralização dos tecidos moles

g - esclerose de osso subcondral;

0 = nenhuma

1 = suspeita ou placa óssea subcondral mais densa

2 = zonas escleróticas localizadas

3 = reação esclerótica confinada, envolvendo grande parte da placa óssea subcondral

4 = esclerose se estendendo de forma desigual pela epífise

5 = extensiva esclerose envolvendo toda placa óssea subcondral e estendendo-se através da epífise

h - mudanças erosivas e lesões articulares;

0 = nenhuma

1 = pequena depressão na margem subcondral, levemente irregular

2 = erosão superficial do osso subcondral sem esclerose

3 = erosão superficial do osso subcondral com zonas restrita de esclerose

4 = erosão irregular proeminente ou lise cística do osso subcondral e epífise, com ou sem esclerose

5 = severa erosão ou lesão cística estendendo-se pela epífise, com esclerose e periostite reativa

i - evidência de fragmentos osteocondrais;

0 = nenhum

1 = fragmento osteocondral sutil, não deslocado

2 = fragmento osteocondral pequeno e bem definido, separado ou não

3 = grande fragmento (>10% da largura do espaço articular)

4 = fragmento osteocondral acompanhado de moderada resposta proliferativa

5 = múltiplos fragmentos osteocondrais ou fragmentação com avançada resposta proliferativa

Os exames radiográficos foram realizados com uso de um aparelho de raios-x portátil¹, do Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP, sendo as unidades de exposições determinadas levando em consideração a região do corpo e a sua

¹ Diagnostic X, Ray Unit.

espessura. A distância foco-filme manteve-se fixa, e as películas radiográficas foram usadas com chassis rígidos e compostos por telas intensificadoras rápidas com emissão de luz verde. As películas radiográficas expostas à radiação foram identificadas e posteriormente submetidas ao processo de revelação automático.

4.4 COLHEITA E PREPARAÇÃO DE URINA

Para análise da velocidade de excreção do condroitim sulfato administrado, duas amostras de urina de cada um dos seis cavalos foram colhidas antes do início do tratamento. Durante a administração do produto, colheitas de urina foram realizadas nos dias 5, 10, 15 e 20. Ao término do tratamento, as urinas foram colhidas nos dias 27, 34, 41, 48 e 55. Todas as amostras foram colhidas no mesmo horário do dia. Para fins de avaliação estatística, foram utilizados os valores dos dias 0, 27 e 55 (antes do tratamento, ao fim do tratamento e 30 dias após o término do tratamento).

A colheita de urina foi realizada por cateterismo uretral ou micção espontânea. A urina foi armazenada em coletores universais estéreis e transportada em isopor com gelo. Após devidamente identificadas foram congeladas a -20°C (Figura 9).

Figura 9 - Foto demonstrando a colheita de urina de égua por de cateterismo uretral - São Paulo - 2009

4.4.1 Análise das Urinas

Os glicosaminoglicanos presentes nas amostras de urina foram isolados e quantificados no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP.

Como glicosaminoglicanos padrões foram utilizados condroitim sulfato, dermatam sulfato (de pele de porco ou de mucosa intestinal suína) adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA) e heparam sulfato (de pâncreas bovino), preparado no laboratório como descrito por Dietrich e Nader (1974).

4.4.1.1 Extração dos Glicosaminoglicanos Urinários

Os glicosaminoglicanos (condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato) das amostras de urina foram extraídos por cromatografia de troca iônica em Q-Sepharose Fast Flow (5 ml *bed* volume, 1 x 5 cm). A capacidade da coluna foi determinada com condroitim sulfato padrão.

Cada amostra de urina foi diluída com 3 volumes de água destilada e aplicada à coluna previamente equilibrada com água destilada. A coluna foi lavada duas vezes com NaCl 0,3 M (10 ml), e os glicosaminoglicanos foram eluídos com NaCl 2 M (10 ml). Em seguida, foram precipitados pela adição lenta e sob agitação de 3 volumes de metanol. Após 24 horas a -20°C, o precipitado formado foi coletado por centrifugação (3000 X g, 20 minutos) e seco a vácuo. As amostras foram ressuspensas em 100 µl de água destilada (Figura 10 e 11).

Figura 10 - Colunas de cromatografia de troca iônica em Q-Sepharose - São Paulo - 2009

Figura 11 - Precipitação dos glicosaminoglicanos com metanol, após cromatografia - São Paulo - 2009

4.4.1.2 Identificação e Quantificação

Alíquotas (5 µl) de soluções de glicosaminoglicanos urinários, foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (0,055%), em tampão 1,3-diaminopropano-acetato 0,05 M, pH 9 (PDA), como descrito por Jaques et al. (1968) e modificado por Dietrich e Dietrich (1976). Uma mistura padrão de glicosaminoglicanos (5 µl), contendo condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato, na concentração de 1 mg/ml cada, foi aplicada às lâminas. Em seguida, os compostos foram submetidos à eletroforese (5 V/cm), em cuba refrigerada, por aproximadamente uma hora. O corante vermelho de cresol foi utilizado como indicador da distância percorrida pelos glicosaminoglicanos, pois o mesmo migra próximo ao condroitim sulfato.

Na eletroforese em gel de agarose, tampão PDA, os glicosaminoglicanos são separados pela capacidade de interação com a diamina. Os compostos que menos interagem com 1,3-diaminopropano apresentam maior migração eletroforética. Assim, o tampão PDA discrimina, por ordem decrescente da mobilidade eletroforética, condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS), e heparam sulfato (HS) / heparina.

Após a eletroforese, os glicosaminoglicanos foram fixados no gel por cetavlon (brometo de cetiltrimetilamônio) 0,1%, por 2 horas, no mínimo. A seguir, o gel foi recoberto com papel de filtro e seco sob corrente de ar aquecida. Os glicosaminoglicanos foram corados com azul de toluidina 0,1% em acético 1% e etanol 50%, por 15 minutos. O excesso de corante foi removido por ácido acético 1% e etanol 50%. Os glicosaminoglicanos foram quantificados por densitometria² das respectivas bandas metacromáticas, por comparação com padrões conhecidos (Figura 12).

² Densitômetro Helena, Quick Scan 2000

Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose de glicosaminoglicanos de urina de cavalo eluídos da coluna de troca iônica em Q-Sepharose. M - mistura padrão, CS - condroitim sulfato, DS - dermatam sulfato, HS - heparam sulfato, 1 a 11 - número de amostras - São Paulo - 2009

4.5 COLHEITA E PREPARAÇÃO DE SANGUE

Foram colhidas amostras de 3 ml de sangue da veia jugular e acondicionadas em tubos sem anticoagulante. Essas amostras foram centrifugadas, e o soro foi separado e aliqotado em microtubos, identificados e congelados a - 20°C.

4.5.1 Quantificação de Ácido Hialurônico Sérico

Em alíquotas de 100 µl de soro, adicionou-se 300 µl de protease alcalina P126³ (4 mg/ml Tris HCl 0,05 M). As misturas foram incubadas por 24 horas a 60°C. A enzima foi inativada por aquecimento a 98°C, por 20 minutos, resíduos foram removidos por centrifugação (8000 X g, 15 minutos) e o sobrenadante foi coletado.

³ Maxatase, Biocon do Brasil Indústria Ltda.

A determinação do ácido hialurônico sérico foi realizada segundo Martins et al. (2003). Resumidamente, placas foram revestidas com proteínas de ligação ao ácido hialurônico (HABP), obtidas de cartilagem bovina, e sucessivamente foram incubadas com amostras contendo solução padrão de ácido hialurônico ou soro, a HABP conjugada a biotina, e estreptavidina ligada ao europium. Após a liberação do europium da estreptavidina, o resultado é uma solução final fluorescente, a qual é lida pelo fluorímetro. O método é específico para ácido hialurônico mesmo na presença substancial de outras quantidades de glicosaminoglicanos ou proteínas.

4.6 COLHEITA DE LÍQUIDO SINOVIAL

Foram colhidas amostras de líquido sinovial das articulações tibiotársicas direita e esquerda, acometidas por osteoartrite. O acesso escolhido para a artrocentese foi a face dorsomedial imediatamente distal e dorsal ao maléolo medial da tíbia, e plantar ao ramo cranial da veia safena medial (STASHAK, 2002), utilizando agulhas hipodérmicas 40 x 12. O local da punção das articulações tibiotársicas foi preparado assepticamente antes de cada colheita, com uso de iodopovidona e álcool 70% (Figuras 13 e 14).

As amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada à 4°C, 10000 rpm, durante 30 minutos, aliquotadas em microtubos em 2 frações, identificadas e congeladas a - 20°C.

Figura 13 - Foto demonstrando o local da punção da articulação tibiotársica e a aquisição da amostra de líquido sinovial - São Paulo - 2009

Figura 14 - Foto demonstrando amostra de líquido sinovial - São Paulo - 2009

4.6.1 Identificação e Quantificação de Glicosaminoglicanos

Líquido sinovial (10 -50 µl) foi incubado com maxatase (20 -100 µl) (4 mg/ml Tris HCl 0,05 M), por 24 horas a 50 °C.

Em seguida, resíduos insolúveis foram removidos por centrifugação, e ao sobrenadante foram adicionados 3 volumes de metanol. Após 24 horas a - 20°C, os glicosaminoglicanos precipitados foram coletados por centrifugação, secos a vácuo, ressuspensos em água destilada e analisados como descritos no item 4.4.1.2 (Figura 15). Para melhor visualização e quantificação do controitim sulfato, as amostras de líquido sinovial também foram tratados com hialuronidase⁴ (100 U/ml acetato 0,1 M pH 5,0) (Figura 16).

Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose de glicosaminoglicanos do líquido sinovial de cavalo. M - mistura padrão, CS - condroitim sulfato, DS - dermatam sulfato, HS - heparam sulfato, P - padrão de AH - ácido hialurônico - São Paulo - 2009

⁴ Hyaluronate lyase - from streptomyces hyalurolyticus, Sigma, cod. H1136

Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose tratada com hialuronidase de glicosaminoglicanos do líquido sinovial de cavalo. M - mistura padrão, CS - condroitim sulfato, DS - dermatam sulfato, HS - heparam sulfato, P - padrão de AH - ácido hialurônico, 1 a 10 - número de amostras - São Paulo - 2009

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram avaliados pelo de programa computacional Instat. Graphpad 3 software. Após análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas foi aplicado o teste de Tukey - Kramer para comparação entre os dias de observação para os valores de glicosaminoglicanos urinários, sérico e do líquido sinovial.

Para os dados não paramétricos utilizou-se o teste de Wilcoxon na identificação de diferenças nos exames físicos e radiográfico do início e final do experimento.

O grau de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 EXAME FÍSICO

O exame físico realizado em todos os animais 30 dias após o início do tratamento não diferiu em nenhum aspecto do exame realizado no início do experimento. Vale ressaltar que os animais 1, 5 e 6 já não apresentaram alterações ao exame físico no início do experimento (Quadros 2 a 8).

Ao final do experimento houve remissão da claudicação do membro pélvico esquerdo no animal 2 (quadro 7), porém o aumento de volume nas articulações tibiotársicas (direita e esquerda), com consistência flutuante, observado no início do experimento ainda se mantinha (Quadro 2 e 4).

No animal 3 o teste de flexão positivo nas articulações tibiotársicas tornou-se negativo (Quadro 8) e o aumento de volume (Quadro 2) e a claudicação do membro pélvico esquerdo (Quadro 7) mantiveram-se presentes ao final do experimento.

Já a claudicação observada no membro pélvico esquerdo do animal 4 diminuiu de grau 2 para 1 (Quadro 7)

AUMENTO DE VOLUME				
ANIMAIS	TIBIOTÁRSICA DIREITA		TIBIOTÁRSICA ESQUERDA	
	ANTES	APÓS	ANTES	APÓS
A1	0	0	0	0
A2	1	1	1	1
A3	0	0	1	1
A4	1	1	0	0
A5	0	0	0	0
A6	0	0	0	0
Mediana	0a	0a	0a	0a

Quadro 2 - Aumento de volume nas articulações tibiotársica direita e esquerda, dos animais 1 a 6, antes do tratamento e ao final do experimento - São Paulo - 2009

POSTURA ANTIÁLGICA				
ANIMAIS	TIBIOTÁRSICA DIREITA		TIBIOTÁRSICA ESQUERDA	
	ANTES	APÓS	ANTES	APÓS
A1	-	-	-	-
A2	-	-	-	-
A3	-	-	-	-
A4	-	-	-	-
A5	-	-	-	-
A6	-	-	-	-

Quadro 3 - Presença(+) ou ausência(-) de postura antiálgica nas articulações tibiotalárica direita e esquerda, dos animais 1 a 6, antes do tratamento e ao final do experimento - São Paulo - 2009

CONSISTÊNCIA				
ANIMAIS	TIBIOTÁRSICA DIREITA		TIBIOTÁRSICA ESQUERDA	
	ANTES	APÓS	ANTES	APÓS
A1	-	-	-	-
A2	FLUTUANTE	FLUTUANTE	FLUTUANTE	FLUTUANTE
A3	-	-	-	-
A4	FLUTUANTE	FLUTUANTE	-	-
A5	-	-	-	-
A6	-	-	-	-

Quadro 4 - Consistência do aumento de volume das articulações tibiotalárica direita e esquerda, dos animais 1 a 6, antes do tratamento e ao final do experimento - São Paulo - 2009

CALOR				
ANIMAIS	TIBIOTÁRSICA DIREITA		TIBIOTÁRSICA ESQUERDA	
	ANTES	APÓS	ANTES	APÓS
A1	-	-	-	-
A2	-	-	-	-
A3	-	-	-	-
A4	-	-	-	-
A5	-	-	-	-
A6	-	-	-	-

Quadro 5 - Presença(+) ou ausência(-) de calor nas articulações tibiotársica direita e esquerda e dos animais 1 a 6, antes do tratamento e ao final do experimento - São Paulo - 2009

DOR				
ANIMAIS	TIBIOTÁRSICA DIREITA		TIBIOTÁRSICA ESQUERDA	
	ANTES	APÓS	ANTES	APÓS
A1	-	-	-	-
A2	-	-	-	-
A3	-	-	-	-
A4	-	-	-	-
A5	-	-	-	-
A6	-	-	-	-

Quadro 6 - Presença(+) ou ausência(-) de dor nas articulações tibiotársica direita e esquerda, dos animais 1 a 6, antes do tratamento e ao final do experimento - São Paulo - 2009

GRAU DE CLAUDICAÇÃO (1 a 5)				
ANIMAIS	M.P. DIREITO		M.P. ESQUERDO	
	ANTES	APÓS	ANTES	APÓS
A1	0	0	0	0
A2	0	0	2	0
A3	0	0	3	3
A4	0	0	2	1
A5	0	0	0	0
A6	0	0	0	0
Mediana	0a	0a	1 ^a	0a

Quadro 7 - Grau de claudicação dos membros posteriores (MP) direito e esquerdo, dos animais 1 a 6, antes do tratamento e ao final do experimento - São Paulo - 2009

TESTE DE FLEXÃO ARTICULAR				
ANIMAIS	TIBIOTÁRSICA DIREITA		TIBIOTÁRSICA ESQUERDA	
	ANTES	APÓS	ANTES	APÓS
A1	0	0	0	0
A2	0	0	0	0
A3	0	0	1	0
A4	0	0	0	0
A5	0	0	0	0
A6	0	0	0	0
Mediana	0a	0a	0a	0a

Quadro 8 - Teste de flexão articular das articulações tibiotalársica direita e esquerda, dos animais 1 a 6, antes do tratamento e ao final do tratamento - São Paulo - 2009

5.2 EXAME RADIOGRÁFICO

No início do experimento todos os cavalos apresentavam alterações ao exame radiográfico em uma das articulações tibiotársicas (Quadros 9 a 14).

Apesar da diminuição dos escores em algumas características observadas (Quadros 9 a 14), levando a diminuição da somatória dos mesmos, e consequentemente a diminuição da mediana (Quadro 15), a avaliação radiográfica não mostrou diferenças entre o início e final do experimento ($p>0,05$).

Características	Articulações			
	Tibiotársica direita		Tibiotársica esquerda	
	Antes	Após	Antes	Após
aumento de volume dos tecidos moles	0	0	1	1
peri-articulares				
mineralização de tecidos moles	0	0	0	0
aumento de espaço articular	0	0	0	0
diminuição de espaço articular	0	0	0	0
evidência de osteófitos	0	0	1	1
evidência de entesófitos	0	0	0	0
esclerose de osso subcondral	0	0	0	1
mudanças erosivas e lesões articulares	0	0	0	0
evidência de fragmentos osteocondrais	0	0	0	0
Soma dos escores	0	0	2	3

Quadro 9 - Valores em escore, para as características analisadas nas radiografias das articulações tibiotársica direita, tibiotársica esquerda, do animal número 1 antes do tratamento e ao final do experimento - São Paulo - 2009

Características	Articulações			
	Tibiotársica direita		Tibiotársica esquerda	
	Antes	Após	Antes	Após
aumento de volume dos tecidos moles	0	0	0	0
peri-articulares				
mineralização de tecidos moles	0	0	0	0
aumento de espaço articular	0	0	0	0
diminuição de espaço articular	0	0	1	1
evidência de osteófitos	0	0	2	1
evidência de entesófitos	0	0	0	0
esclerose de osso subcondral	0	0	0	0
mudanças erosivas e lesões articulares	0	0	0	0
evidência de fragmentos osteocondrais	0	0	0	0
Soma dos escores	0	0	3	2

Quadro 10 - Valores em escore, para as características analisadas nas radiografias das articulações tibiotársica direita, tibiotársica esquerda, do animal número 2 antes do tratamento e ao final do experimento - São Paulo - 2009

Características	Articulações			
	Tibiotársica direita		Tibiotársica esquerda	
	Antes	Após	Antes	Após
aumento de volume dos tecidos moles	0	0	0	0
peri-articulares				
mineralização de tecidos moles	0	0	0	0
aumento de espaço articular	0	0	0	0
diminuição de espaço articular	1	1	1	1
evidência de osteófitos	3	2	2	1
evidência de entesófitos	0	0	0	0
esclerose de osso subcondral	0	0	0	0
mudanças erosivas e lesões articulares	2	1	0	0
evidência de fragmentos osteocondrais	0	0	0	0
Soma dos escores	6	4	3	2

Quadro 11 - Valores em escore, para as características analisadas nas radiografias das articulações tibiotársica direita, tibiotársica esquerda, do animal número 3 antes do tratamento e ao final do experimento - São Paulo - 2009

Características	Articulações			
	Tibiotársica direita		Tibiotársica esquerda	
	Antes	Após	Antes	Após
aumento de volume dos tecidos moles	0	0	0	0
peri-articulares				
mineralização de tecidos moles	0	0	0	0
aumento de espaço articular	0	0	0	0
diminuição de espaço articular	0	0	1	1
evidência de osteófitos	1	1	2	1
evidência de entesófitos	0	0	0	0
esclerose de osso subcondral	0	0	0	0
mudanças erosivas e lesões articulares	0	0	0	0
evidência de fragmentos osteocondrais	0	0	0	0
Soma dos escores	1	1	3	2

Quadro 12 - Valores em escore, para as características analisadas nas radiografias das articulações tibiotársica direita, tibiotársica esquerda, do animal número 4 antes do tratamento e ao final do experimento - São Paulo - 2009

Características	Articulações			
	Tibiotársica direita		Tibiotársica esquerda	
	Antes	Após	Antes	Após
aumento de volume dos tecidos moles	0	0	0	0
peri-articulares				
mineralização de tecidos moles	0	0	0	0
aumento de espaço articular	0	0	0	0
diminuição de espaço articular	1	1	0	0
evidência de osteófitos	0	1	1	0
evidência de entesófitos	0	0	0	0
esclerose de osso subcondral	0	0	0	0
mudanças erosivas e lesões articulares	0	0	0	0
evidência de fragmentos osteocondrais	0	0	0	0
Soma dos escores	1	2	1	0

Quadro 13 - Valores em escore, para as características analisadas nas radiografias das articulações tibiotársica direita, tibiotársica esquerda, do animal número 5 antes do tratamento e ao final do experimento - São Paulo - 2009

Características	Articulações			
	Tibiotársica direita		Tibiotársica esquerda	
	Antes	Após	Antes	Após
aumento de volume dos tecidos moles	0	0	0	0
peri-articulares				
mineralização de tecidos moles	0	0	0	0
aumento de espaço articular	0	0	0	0
diminuição de espaço articular	1	1	2	2
evidência de osteófitos	0	0	1	1
evidência de entesófitos	0	0	0	0
esclerose de osso subcondral	0	0	0	0
mudanças erosivas e lesões articulares	0	0	0	0
evidência de fragmentos osteocondrais	0	0	2	2
Soma dos escores	1	1	5	5

Quadro 14 - Valores em escore, para as características analisadas nas radiografias das articulações tibiotársica direita, tibiotársica esquerda, do animal número 6 antes do tratamento e ao final do experimento - São Paulo - 2009

Animais	Articulações			
	Tibiotársica direita		Tibiotársica esquerda	
	Antes	Após	Antes	Após
1	0	0	2	3
2	0	0	3	2
3	6	4	3	2
4	1	1	3	2
5	1	2	1	0
6	1	1	5	5
Mediana	1a	1a	3a	2a

Quadro 15 - Mediana dos escores atribuídos às radiografias das articulações tibiotársica direita, tibiotársica esquerda, dos animais 1 a 6, antes do tratamento e ao final do experimento - São Paulo - 2009

As figuras 17 e 18 ilustram a imagem radiográfica da articulação tibiotársica do cavalo 3, antes e após o tratamento, mostrando remodelação do osteofito.

Figura 17 - Imagem radiográfica da articulação tibiotársica direita do cavalo 3, antes do tratamento - São Paulo - 2009

Figura 18- Imagem radiográfica da articulação tibiotársica direita do cavalo 3, após 30 dias do final do tratamento - São Paulo - 2009

5.3 ANÁLISE DA URINA

5.3.1 Quantificação dos Glicosaminoglicanos Urinários

Os resultados obtidos no nosso estudo quando avaliados os dias 0, 27 e 55, mostraram aumento da excreção urinária de condroitim sulfato no dia 27, quando comparado ao dia 0 (respectivamente $5,38 \pm 1,33$; $2,96 \pm 1,26$ mg/l; $p < 0,05$) (Tabela 1). O que não foi observado quando foram utilizados os valores de condroitim sulfato/creatinina urinária (respectivamente $1,46 \pm 0,39$; $1,29 \pm 0,62$ mg/l) (Tabela 2). O mesmo ocorreu com o dermatam sulfato, ou seja, houve aumento da excreção urinária no dia 27 quando comparado ao dia 0 (respectivamente $1,30 \pm 0,47$; $0,66 \pm$

0,33 mg/l; $p < 0,05$) (Tabela 1). Da mesma maneira a análise dos resultados do dermatam sulfato/creatinina urinária não mostrou variação (Tabela 2).

Durante a pesquisa, as médias de heparam sulfato apresentaram pequena amplitude de variação. Analisando os dias 0, 27 e 55, observa-se um aumento da excreção urinária no dia 27, tanto quando comparado com o dia 0 (respectivamente $0,96 \pm 0,39$; $0,42 \pm 0,24$ mg/l; $p < 0,05$), como quando comparado com o dia 55 ($0,96 \pm 0,39$; $0,36 \pm 0,30$ mg/l, $p < 0,05$) (Tabela 1).

Igualmente aos outros glicosaminoglicanos os valores de heparam sulfato/creatinina urinária não apresentaram variação (Tabela 2).

Analisando-se os glicosaminoglicanos totais, entre os dias 0, 27 e 55, observou-se aumento da excreção urinária no dias 27 quando comparado com o dia 0 (respectivamente $7,64 \pm 2,00$; $4,05 \pm 1,78$ mg/l; $p < 0,05$) (Tabela 1). O que também não foi estatisticamente significativo quando a escala glicosaminoglicanos totais/creatinina urinária foi utilizada (Tabela 2).

Tabela 1- Valores médios e desvio padrão de condroitim sulfato(CS), dermatam sulfato(DS) e heparam sulfato(HS) e glicosaminoglicanos totais (GAGs) em mg/l da urina de seis cavalos com osteoartrite - São Paulo - 2009

	CS (mg/l)	DS (mg/l)	HS (mg/l)	GAGs TOTAIS (mg/l)
DIAS				
0	$2,96 \pm 1,26^A$	$0,66 \pm 0,33^A$	$0,42 \pm 0,24^A$	$4,05 \pm 1,78^A$
5	$5,08 \pm 2,31$	$1,20 \pm 0,46$	$0,74 \pm 0,45$	$7,01 \pm 3,02$
10	$3,80 \pm 1,15$	$1,03 \pm 0,25$	$0,60 \pm 0,33$	$5,43 \pm 1,58$
15	$5,46 \pm 2,83$	$1,26 \pm 0,60$	$0,75 \pm 0,69$	$7,47 \pm 3,98$
20	$4,07 \pm 1,62$	$1,10 \pm 0,52$	$0,43 \pm 0,55$	$5,59 \pm 2,48$
27	$5,38 \pm 1,33^B$	$1,30 \pm 0,47^B$	$0,96 \pm 0,39^B$	$7,64 \pm 2,00^B$
34	$4,06 \pm 1,75$	$1,03 \pm 0,49$	$0,58 \pm 0,39$	$5,68 \pm 2,55$
41	$2,87 \pm 1,12$	$0,75 \pm 0,42$	$0,26 \pm 0,20$	$3,89 \pm 1,64$
48	$2,48 \pm 1,56$	$0,75 \pm 0,53$	$0,38 \pm 0,34$	$3,61 \pm 2,39$
55	$4,24 \pm 2,00^{AB}$	$1,09 \pm 0,47^{AB}$	$0,36 \pm 0,30^A$	$5,69 \pm 2,68^{AB}$

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna entre os dias 0, 27 e 55 denotam significância para $P < 0,05$.

Tabela 2- Valores médios e desvio padrão de condroitim sulfato(CS), dermatam sulfato(DS) e heparam sulfato(HS) e glicosaminoglicanos totais (GAGs) por creatinina urinária (CREAT) de seis cavalos com osteoartrite - São Paulo - 2009

	CS/CREAT (X 10 ⁻³)	DS/CREAT (X 10 ⁻³)	HS/CREAT (X 10 ⁻³)	GAGs / CREAT (X 10 ⁻³)
DIAS				
0	1,29 ± 0,62 ^A	0,27 ± 0,15 ^A	0,17 ± 0,11 ^A	1,74 ± 0,86 ^A
5	1,84 ± 1,20	0,41 ± 0,18	0,27 ± 0,22	2,53 ± 1,55
10	1,99 ± 1,13	0,54 ± 0,29	0,33 ± 0,30	2,86 ± 1,68
15	1,82 ± 1,00	0,42 ± 0,21	0,26 ± 0,27	2,50 ± 1,46
20	1,33 ± 0,51	0,36 ± 0,17	0,13 ± 0,17	1,82 ± 0,77
27	1,46 ± 0,39 ^A	0,34 ± 0,05 ^A	0,25 ± 0,05 ^A	2,05 ± 0,43 ^A
34	1,47 ± 0,64	0,37 ± 0,17	0,21 ± 0,14	2,06 ± 0,93
41	1,36 ± 0,41	0,34 ± 0,17	0,13 ± 0,11	1,83 ± 0,59
48	1,16 ± 0,56	0,32 ± 0,16	0,17 ± 0,11	1,65 ± 0,79
55	1,56 ± 0,68 ^A	0,40 ± 0,11 ^A	0,14 ± 0,09 ^A	2,10 ± 0,85 ^A

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna entre os dias 0, 27 e 55 denotam significância para $p < 0,05$.

Os valores das médias (foram feitas em duplicata) da excreção urinária de glicosaminoglicanos (mg/l), creatinina (g/l), e a razão GAGs/creatinina individuais dos animais no decorrer do experimento encontram-se nos apêndices A a F.

Os gráficos 1 e 2 ilustram três momentos diferentes de observação: início do experimento (dia 0), final do tratamento (dia 27) e final do experimento (média dos dias 41 a 55).

Gráfico 1 - Efeito da administração de condroitim sulfato, glucosamina e ácido hialurônico na excreção de glicosaminoglicanos urinários (condroitim sulfato - CS, dermatam sulfato-DS, heparam sulfato-HS e glicosaminoglicanos-GAGs totais) em mg/l de seis cavalos com osteoartrite - São Paulo - 2009

Gráfico 2 - Efeito da administração de condroitim sulfato, glucosamina e ácido hialurônico na excreção de glicosaminoglicanos urinários (condroitim sulfato-CS, dermatam sulfato-DS, heparam sulfato-HS e glicosaminoglicanos-GAGs totais), GAG/creatinina $\times 10^{-3}$, em seis cavalos com osteoartrite - São Paulo - 2009

As figuras 19 e 20 ilustram a eletroforese em gel de agarose de glicosaminoglicanos urinários isolados de 10 amostras do animal 5, realizada em duplicata.

Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose de glicosaminoglicanos da urina do cavalo 5 eluídos da coluna de troca iônica em Q-Sepharose. M - mistura padrão, CS - condroitim sulfato, DS - dermatam sulfato, HS - heparam sulfato, 1 a 11 - amostras de urina - São Paulo - 2009

Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose de glicosaminoglicanos da urina do cavalo 5 eluídos da coluna de troca iônica em Q-Sepharose. M - mistura padrão, CS - condroitim sulfato, DS - dermatam sulfato, HS - heparam sulfato, 1 a 11 - amostras de urina - São Paulo - 2009

5.4 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO SÉRICO

As médias obtidas do ácido hialurônico sérico apresentaram variação no decorrer do experimento. Os resultados obtidos mostraram um aumento significativo no dia 55 quando comparado aos dias 0 e 27 (respectivamente $21,08 \pm 7,66$; $10,61 \pm 5,94$; $12,58 \pm 5,21$ ng/ml; $p < 0,01$) (Tabela 3 e Gráfico 3).

Os valores individuais de ácido hialurônico (ng/ml) sérico dos animais (1-6), encontram-se no apêndice G.

Tabela 3 - Valores médios e desvio padrão (ng/ml) de ácido hialurônico sanguíneo de seis cavalos com osteoartrite no decorrer do experimento - São Paulo - 2009

ÁCIDO HIALURÔNICO (ng/ml)	
DIAS	
0	10,61 ± 5,94 ^A
5	15,54 ± 5,26
10	16,43 ± 12,82
15	17,92 ± 7,88
20	17,83 ± 9,09
27	12,58 ± 5,21 ^A
55	21,08 ± 7,66 ^B

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna entre os dias 0, 27 e 55 denotam significância para $p < 0,05$.

Gráfico 3 - Efeito da administração de condroitim sulfato, glucosamina e ácido hialurônico no ácido hialurônico sanguíneo (ng/ml) de seis cavalos com osteoartrite no decorrer do experimento - São Paulo - 2009

5.5 ANÁLISE DO LÍQUIDO SINOVIAL

5.5.1 Quantificação do Condroitím Sulfato

As médias das concentrações de condroitim sulfato no líquido sinovial de articulações com osteoartrite aumentaram após início do tratamento, tendendo a um decréscimo no decorrer da pesquisa. O valor médio mínimo foi no dia 0 ($76,13 \mu\text{g/ml}$), e o valor médio máximo foi no dia 34 ($117,16 \mu\text{g/ml}$). Observou-se aumento significativo no dia 27 quando comparado aos dias 0 e 55 (respectivamente $93,05 \pm 21,90$; $76,13 \pm 62,16$; $61,61 \pm 21,18 \mu\text{g/ml}$; $p < 0,05$) (Tabela 4 e Gráfico 4).

Analisando o grupo tratado e o grupo controle ($31,35 \pm 6,86 \mu\text{g/ml}$), observa-se um aumento significativo em relação ao dia 0, 27 e 55 (respectivamente $76,13 \pm 62,16 \mu\text{g/ml}$; $p < 0,05$; $93,05 \pm 21,90 \mu\text{g/ml}$; $p < 0,0001$; $61,61 \pm 21,18 \mu\text{g/ml}$; $p < 0,001$) (Tabela 4 e Gráfico 4).

Os valores individuais de condroitim sulfato ($\mu\text{g/ml}$) do líquido sinovial dos animais (1-6), encontram-se no apêndice H.

Tabela 4 - Valores médios e desvio padrão ($\mu\text{g/ml}$) de condroitim sulfato do líquido sinovial de articulações tibiotársicas acometidas por osteoartrite de seis cavalos e do grupo controle - São Paulo - 2009

	CONTROLE	CONDROITIM SULFATO ($\mu\text{g/ml}$)
DIAS		
0	$31,35 \pm 6,86^a$	$76,13 \pm 62,16^{ABb}$
5		$109,76 \pm 64,97$
10		$95,62 \pm 40,69$
15		$107,23 \pm 57,80$
20		$78,85 \pm 13,67$
27		$93,05 \pm 21,90^{Bb}$
34		$117,16 \pm 62,04$
41		$86,55 \pm 18,34$
48		$77,28 \pm 40,14$
55		$61,61 \pm 21,18^{Ab}$

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna entre os dias 0, 27 e 55 denotam significância para $p < 0,05$. Letras minúsculas diferentes entre colunas denotam significância para $p < 0,05$.

Gráfico 4 - Efeito da administração de condroitim sulfato, glucosamina e ácido hialurônico na concentração de condroitim sulfato (µg/ml) do líquido sinovial de articulações com osteoartrite (OA) - São Paulo - 2009

A figura 21 ilustra a eletroforese em gel de agarose de 10 amostras isoladas de líquido sinovial do animal 6 tratadas previamente com hialuronidase.

Figura 21- Eletroforese em gel de agarose tratada com hialuronidase de glicosaminoglicanos do líquido sinovial do cavalo 6. M - mistura padrão, CS - condroitim sulfato, DS - dermatam sulfato, HS - heparam sulfato, P - padrão de AH - ácido hialurônico, 1 a 10 - número de amostras - São Paulo - 2009

5.5.2 Quantificação de Ácido Hialurônico

As médias das concentrações de ácido hialurônico no líquido sinovial de articulações com osteoartrite diminuíram após o início do tratamento, e ao final do estudo apresentavam-se ainda mais diminuídas, sem apresentarem diferença significativa ($p > 0,05$) (Tabela 5 e Gráfico 5).

Contudo, a análise estatística entre os valores médios do ácido hialurônico das articulações do grupo controle ($522,12 \pm 128,09 \mu\text{g/ml}$) com os valores médios das articulações com osteoartrite do grupo tratado, mostrou diminuição significativa no dia 27 ($351,15 \pm 62,36 \mu\text{g/ml}$; $p < 0,01$) (Tabela 5 e Gráfico 5).

Os valores individuais do ácido hialurônico do líquido sinovial dos animais (1-6), encontram-se no apêndice I.

Tabela 5 - Valores médios e desvio padrão ($\mu\text{g/ml}$) de ácido hialurônico do líquido sinovial de articulações com osteoartrite de seis cavalos e do grupo controle - São Paulo - 2009

	CONTROLE	ÁCIDO HIALURÔNICO ($\mu\text{g/ml}$)
DIAS		
0	522,12 $\pm$ 128,09 ^a	440,07 $\pm$ 274,57 ^{Aa}
5		523,28 $\pm$ 295,32
10		418,16 $\pm$ 170,51
15		387,36 $\pm$ 112,96
20		420,33 $\pm$ 126,17
27		351,15 $\pm$ 62,36 ^{Ab}
34		496,03 $\pm$ 225,02
41		399,76 $\pm$ 209,00
48		418,30 $\pm$ 307,78
55		375,99 $\pm$ 225,13 ^{Aa}

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna entre os dias 0, 27 e 55 denotam significância para $p < 0,05$. Letras minúsculas diferentes entre colunas denotam significância para $p < 0,05$.

Gráfico 5 - Efeito da administração de condroitim sulfato, glucosamina e ácido hialurônico no ácido hialurônico em $\mu\text{g/ml}$ do líquido sinovial de articulações com osteoartrite (OA) - São Paulo - 2009

A figura 22 ilustra a eletroforese em gel de agarose de glicosaminoglicanos do líquido sinovial isolados de 10 amostras do animal 6.

Figura 22- Eletroforese em gel de agarose de glicosaminoglicanos do líquido sinovial do cavalo 6. M - mistura padrão, CS - condroitim sulfato, DS - dermatam sulfato, HS - heparam sulfato, P - padrão de AH - ácido hialurônico, 1 a 10 - número de amostras - São Paulo - 2009

6 DISCUSSÃO

A avaliação da dor realizada por meio de exame físico, observando-se claudicação, dor à flexão passiva e resposta ao teste de flexão articular, resulta muitas vezes em discrepâncias entre resultados clínicos e estatísticos, o que pode ser atribuído à natureza subjetiva deste método de avaliação. Avaliações utilizando placas de força como as realizadas por Silva Jr (2007) permitem dados mais uniformes, contudo existe dificuldade em se transpor este tipo de instalação e equipamentos para equinos.

Como este experimento foi conduzido utilizando-se cavalos acometidos naturalmente por osteoartrite, ou seja, não induzida experimentalmente, houve diversidade nos sinais clínicos apresentados pelos animais, não sendo possível padronizá-los, diferentemente do que ocorre em estudos que induzem a osteoartrite (FRISBIE et al., 2009) e conseguem similaridade no tipo de claudicação, resposta à flexão articular, efusão articular e alterações radiográficas. A dificuldade em se padronizar os sinais clínicos pode ter sido a responsável pelo fato de não ocorrer diferenças entre o início e final do experimento. Também ressalta-se o fato de três animais não apresentarem alterações ao exame físico no início do experimento.

Os mecanismos envolvidos na gênese da dor na osteoartrite são pouco compreendidos e a eficácia sintomática da glucosamina ou condroitim sulfato é controversa (MICHEL et al., 2005; FORSYTH et al., 2006; OKE et al., 2006). A redução da dor associada a esses compostos tem sido mais atribuída às suas possíveis propriedades modificadoras de doença do que a um efeito analgésico direto. Porém, estudos realizados em camundongos (TALLARIDA et al., 2003) e em humanos acometidos por osteoartrite (COHEN et al., 2003) sugerem propriedades analgésicas intrínsecas leves desses compostos.

Silva Jr (2007) utilizando ratos com osteoartrite induzida por meio da transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA) demonstrou que a combinação de sulfato de glucosamina e condroitim sulfato reduz a hipernocicepção em 18,5%, redução semelhante ao grupo que recebia meloxicam, um inibidor da ciclooxigenase. Apesar destes resultados positivos existem muitas controvérsias quanto aos benefícios do tratamento oral com glucosamina e condroitim sulfato nos pacientes com osteoartrite (WHITE et al., 1996; WRIGHT, 2001; RICHARDSON, LOINAZ, 2007).

No presente estudo, observou-se que após o uso da associação de condroitim sulfato, glucosamina e ácido hialurônico oral houve diminuição do grau de claudicação em dois dos três animais que mancavam e negatividade do teste de flexão no único animal que apresentava este teste positivo.

Ensaio clínico, especialmente ensaios randomizados, longos e com controle, utilizando glucosamina e condroitim sulfato são raros na literatura veterinária (RICHARDSON; LOINAZ, 2007). Hanson et al. (1997) relatou que a combinação de condroitim sulfato e glucosamina cloro-hidrato oral (1,8 mg e 5,4 mg respectivamente, duas vezes ao dia, para cavalos com até 545 kg) melhorou a claudicação, flexão articular e comprimento do passo nas primeiras duas semanas após o tratamento. Clayton et al. (2002) observaram melhora na simetria do passo após utilização de suplemento oral para “saúde articular” durante duas semanas, composto por ácido glucurônico, ácido glutâmico, glutamina, prolina, entre outros. Mais recentemente, Forsyth et al. (2006) observaram melhora na movimentação articular e no comprimento do passo após oito semanas de uso de condroitim sulfato e glucosamina cloro-hidrato oral em cavalos veteranos. Bergin et al. (2006) observaram diminuição na efusão articular após utilização de ácido hialurônico oral no pós-operatório de 27 articulações acometidas por osteocondrite dissecante.

Concomitantemente foi observada diminuição nos escores radiográficos, sem que as medianas diferissem antes e após o tratamento ($p > 0,05$). A utilização oral de glucosamina cloro hidrato e condroitim sulfato por Hanson et al. (2001) melhoraram o grau de claudicação dos cavalos, porém igualmente não houve melhora nos escores radiográficos.

Observou-se também a falta de correlação entre lesão radiográfica e sintoma, como já relatado por diversos autores (LITTLE et al., 1990; MCILWRAITH, 1996; DAVIS et al., 2002; MELO et al., 2003; TAYLOR et al., 2006; SILVA JR., 2007). Os animais que não apresentaram claudicação ao exame físico, possuíam alterações radiográficas das articulações tibiotársicas, com escores similares e, até mesmo, superiores, como no animal 6, aos escores dos animais que mostraram claudicação.

Este tipo de observação pode sugerir que não exista correlação entre os níveis de biomarcadores, como o condroitim sulfato e ácido hialurônico, e alterações radiográficas. Além disso, Taylor et al. (2006) afirmam que a quantificação de um marcador molecular em um único momento não pode refletir um processo dinâmico de uma doença, como a osteoartrite.

No presente estudo, foi possível constatar melhoras clínicas e radiográficas nos cavalos acometidos pela osteoartrite, contudo concorda-se que há necessidade de se aumentar o número de animais observados, bem como o período de observação, e inserir um grupo placebo para que diferenças significativas possam ser documentadas.

Em relação à quantificação dos glicosaminoglicanos urinários, Vieira et al. (2007) mostrou que cavalos atletas excretam menos glicosaminoglicanos na urina (4,69 mg/l; 2,75 GAG/creatinina $\times 10^{-3}$) do que cavalos não atletas (6,79 mg/l; 2,93 GAG/creatinina $\times 10^{-3}$), sendo que ocorre um aumento de condroitim sulfato + dermatam sulfato concomitantemente à diminuição de heparam sulfato nos atletas doentes comparativamente aos sadios. Uma vez acometidos por osteoartrite, os cavalos atletas excretam 5,19 mg/l (2,88 GAG/creatinina $\times 10^{-3}$), e os sem atividade física excretam cerca de 6,88 mg/l (3,28 GAG/creatinina $\times 10^{-3}$), ou seja, ocorre um aumento na excreção urinária de glicosaminoglicanos em ambos os casos.

Comparando-se os resultados de Vieira et al. (2007) aos resultados encontrados em nosso estudo observamos que antes do tratamento, os cavalos acompanhados, que não eram atletas, mas possuíam osteoartrite, apresentavam valores inferiores (4,05 mg/l; 1,74 GAG/creatinina $\times 10^{-3}$) aos animais atletas e não atletas saudáveis do experimento citado. Porém, em relação ao estudo realizado por Moraes et al (2009)⁵ os valores foram superiores aos cavalos atletas acometidos por OA (3,70 mg/l; 1,43 GAG/creatinina $\times 10^{-3}$).

Tanto os valores encontrados no presente estudo como o de Moraes et al. (2009)⁵ foram inferiores aos de Vieira et al. (2007). A diferença entre os valores obtidos por Vieira et al. (2007), com os de Moraes et al. (2009)⁵ para cavalos atletas, deve estar relacionado ao tipo de exercício físico realizado, ou seja, os primeiros tratavam-se de cavalos de corrida e os do estudo seguinte de cavalo de salto ou adestramento. Isto porque o exercício aumenta a concentração de glicosaminoglicanos no líquido sinovial e soro (FRISBIE et al., 2008) e provavelmente a excreção urinária. Também pode ter ocorrido diferenças quanto ao intervalo de tempo dado entre o exercício e a colheita da amostra (CALATRONI et al., 2008).

⁵ MORAES, A. P. L.; BACCARIN, R. Y. A. Relação entre excreção urinária de condroitim sulfato e osteoartrite em equinos. **Relatório Final de Iniciação Científica**. São Paulo: [s.n.], 2009. Trabalho não publicado.

Distinções entre os graus de lesão cartilagínea tanto na osteoartrite como na osteocondrose alteram a concentração de glicosaminoglicanos no líquido sinovial e soro, e o tamanho das cadeias de condroitim sulfato (BROWN et al., 2007). Este fato pode ter influenciado nas diferenças entre os valores obtidos para cavalos com osteoartrite neste trabalho e nos de Moraes et al. (2009)⁵, com os de Vieira et al. (2007).

Os valores de excreção de glicosaminoglicanos urinários obtidos neste trabalho estão mais próximos aos dados de Moraes et al. (2009)⁵, com isso coincidem com a afirmação de Vieira et al. (2007), ou seja, cavalos não atletas acometidos por osteoartrite excretam mais GAGs urinários do que cavalos atletas e igualmente portadores de osteoartrite.

Os valores também foram diferentes dos obtidos por Alwan et al. (1991) que encontraram respectivamente 15 µg/ml e 8 µg/ml de glicosaminoglicanos urinários em cavalos acometidos por osteoartrite e normais. Contudo, neste caso, a técnica utilizada para mensuração de glicosaminoglicanos urinários não foi adequada (LIMA et al., 2007).

Após o término da medicação foi observado aumento nos valores de glicosaminoglicanos urinários (7,64 mg/l; 2,05 GAG/creatinina x 10⁻³). Ressalta-se que a proporção de condroitim sulfato urinário não se alterou, comprovando-se que não se tratar do condroitim sulfato exógeno. Interessante observar que ao final do experimento ocorreu diminuição da excreção urinária de glicosaminoglicanos, sendo os valores inferiores aos encontrados ao final do tratamento, porém muito próximos aos do início do experimento. Em estudo similar, Moraes et al. (2009)⁵ também observou diminuição dos valores de condroitim sulfato e glicosaminoglicanos totais urinários em cavalos atletas acometidos por osteoartrite, e tratados com associação intramuscular de condroitim sulfato e glucosamina, 120 dias após o término da medicação. Logo, houve comportamento similar dos glicosaminoglicanos urinários entre os distintos estudos.

Em ambos os casos, duas hipóteses podem explicar a variação da curva de excreção urinária de glicosaminoglicanos, ou seja, inicialmente acredita-se que a aplicação do composto estimule a taxa de *turnover* ocorrendo até o término da medicação, a partir de então a queda da curva estaria relacionada à normalização da resposta anabólica.

Acredita-se que o aumento da excreção de glicosaminoglicanos na urina possivelmente reflete aumento na taxa de *turnover* que ocorre nos animais como consequência da alta atividade metabólica. Resultados similares também foram obtidos em humanos e outras espécies (TOMA et al., 1996; PEREIRA et al., 2004), e a diminuição da excreção urinária de GAGs com a idade corrobora esta hipótese. Logo, acredita-se que a medicação composta por condroitim sulfato, glucosamina e ácido hialurônico estimulou a atividade metabólica.

A biodisponibilidade oral da glucosamina e do condroitim sulfato é duvidosa para muitos autores (RICHARDSON; LOINAZ, 2007), contudo Eddington et al. (2001) mostraram que tanto o condroitim sulfato quanto o sulfato de glucosamina são absorvidos pelos cavalos, tendo o condroitim sulfato taxas maiores de absorção e biodisponibilidade (32%) do que o sulfato de glucosamina (2,5%), e possivelmente a taxa de absorção do condroitim sulfato dependa de seu peso molecular.

Alguns estudos recomendam a utilização oral de 22 mg/kg de glucosamina (10 g/500kg) e 8,8 mg/kg (4g/500 kg) de condroitim sulfato para cavalos (WRIGHT, 2001; KIRSTEN et al., 2006), diferente do utilizado neste estudo, ou seja, 3,15 g de glucosamina e 2,85 g de condroitim sulfato, cuja escolha da quantidade a ser administrada baseou-se nas instruções do fabricante do suplemento.

Estes dados, somados ao fato de que a concentração necessária para que haja efeitos benéficos da utilização de glucosamina *in vitro* é de pelo menos 10 µg/ml, e que a dose de 22 mg/kg de glucosamina via oral fornece concentração plasmática de 1,0 µg/ml e concentrações ainda inferiores foram mensuradas no líquido sinovial (KIRSTEN et al., 2006), supõem-se que as alterações observadas no líquido sinovial, plasma e urina estejam mais relacionados ao condroitim sulfato.

Os valores médios plasmáticos de ácido hialurônico foram inferiores (10,61 ng/ml) aos valores obtidos por Popot et al. (2004), para cavalos em repouso (29-253 ng/ml) ou pós-exercício (49-120 ng/ml), e aos valores encontrados por Tulamo et al. (1990) (190-760 ng/ml). Deve-se ressaltar que o método empregado em nosso estudo é muito específico e sensível, permitindo que o ácido hialurônico seja mensurado na presença de grandes quantidades de outros glicosaminoglicanos (MARTINS et al., 2003).

Entretanto, os resultados estão em acordo os resultados obtidos por Nganvongpanit et al. (2008), Caterson et al. (1995) e Lohmander (1991), que

mostraram que os níveis de ácido hialurônico em animais com osteoartrite são menores do que os de animais saudáveis.

Aproximadamente 30 dias após o término da medicação, observou-se aumento expressivo na concentração plasmática de ácido hialurônico nos cavalos em estudo, sugerindo tendência de recuperação, porém ainda abaixo dos valores citados em estudos anteriores para animais saudáveis.

No cavalo, o *clearance* plasmático de ácido hialurônico é baixo (1,5 ml/kg/minuto), o volume de distribuição é limitado (0,06 l/kg), resultando em vida-média curta (15-90 minutos). Calcula-se que a quantidade de ácido hialurônico endógeno que acessa diariamente o plasma seja 114 µg/kg/24 horas ou 65 mg por dia (POPOT et al., 2004). Neste estudo foi administrado 0,10 g de ácido hialurônico via oral para cada cavalo, mesma quantidade utilizada por Bergin et al. (2006), e que reduziu significativamente a efusão articular de cavalos durante o pós-operatório de artroscopias.

É difícil explicar como a suplementação exógena com pequenas quantidades de ácido hialurônico (comparando-se com a produção endógena) pode influenciar positivamente no aumento de sua concentração plasmática 30 dias após, ou na diminuição da efusão articular como no estudo de Bergin et al. (2006). O mesmo ocorreu no experimento de Kawcak et al. (1997) que obtiveram melhora nos escores de claudicação após a utilização de três aplicações de 40 mg de ácido hialurônico a cada 7 dias.

O principal fator influenciador na mensuração do ácido hialurônico no plasma é o exercício, seus valores podem aumentar de uma vez e meia a três vezes, retornando aos valores basais 50 minutos a 2 horas depois do exercício (TULAMO et al., 1996; POPOT et al., 2004). No presente trabalho os cavalos utilizados não foram submetidos a exercício.

Já a concentração de glicosaminoglicanos no líquido sinovial pode variar até três vezes entre articulações do mesmo cavalo (VIITANEN et al., 2000). Também o grau das lesões cartilagíneas (PALMER et al., 1995), o exercício, osteoartrite (FRISBIE et al., 2008) e osteocondrose (BROWN et al., 2007a) alteram a quantidade de glicosaminoglicanos no líquido sinovial de equinos. Analisando os valores iniciais de condroitim sulfato no líquido sinovial dos cavalos com osteoartrite em nosso experimento, obteve-se valor similar (91,36 µg/ml) aos valores encontrados por Palmer et al. (1995) para cavalos com alterações articulares moderadas a severas

(45,5 a 94,8 µg/ml), inferiores ao relatados por Alwan et al. (1991) para cavalos com osteoartrite (256 µg/ml), e superiores ao encontrado por Brown et al. (2007) para cavalos com osteocondrose (25,01 µg/ml). Estas diferenças podem estar relacionadas ao método de análise utilizado nos diferentes experimentos, principalmente quando o DMMB é utilizado, cujo método pode mensurar outros glicosaminoglicanos sulfatados que não o condroitim sulfato (BROWN et al., 2007).

Independentemente destas variações, os valores foram superiores ao observado nas articulações controle (31,35 µg/ml) e ao descrito para articulações saudáveis por Palmer et al. (1995) (25,6 µg/ml), Brown et al. (2007) (24,3-26,5 µg/ml), e Brown et al. (2007a) (33,77 µg/ml).

Importante observar que houve um comportamento similar entre os valores da excreção urinária de condroitim sulfato e suas concentrações no líquido sinovial, ou seja, em ambas análises observou-se aumento de condroitim sulfato após o término da medicação e tendência a diminuição, aproximadamente 30 dias após, sugerindo tendência de melhora articular. Esta relação evidencia um comportamento similar dos eventos ocorridos do líquido sinovial e na urina.

Grauw et al. (2009) observaram aumento na concentração de glicosaminoglicanos no líquido sinovial oito horas após indução de inflamação articular. O retorno aos valores basais ocorreu 168 horas após (sete dias). Artrocenteses repetidas, com intervalo menor que 60 horas, também podem levar ao aumento da concentração de glicosaminoglicanos no líquido sinovial (VAN DEN BOOM et al., 2005). Ambas as situações não ocorreram no presente trabalho.

Aumento nas concentrações de glicosaminoglicanos no líquido sinovial foram relatados em humanos, cavalos e coelhos com traumas articulares ou osteoartrites (ALWAN, 1991). O aumento pode ser reflexo tanto de alterações nos processos de síntese como nos de degradação do condroitim sulfato, tanto na cartilagem articular, como também na membrana sinovial.

Segundo Tulamo et al. (1996), as concentrações de ácido hialurônico em articulações com osteoartrite são geralmente inferiores às das articulações saudáveis, o que se confirmou no nosso estudo, ou seja, as médias de ácido hialurônico no líquido sinovial dos animais com osteoartrite (440,07 µg/ml) foram inferiores às do grupo controle (522,12 µg/ml), porém sem diferença estatística. A mesma observação foi feita por Taylor et al. (2006) que obteve valores entre 4,3 e 436 µg/ml (média= 141 µg/ml) para articulações normais, e entre 11,5 e 304 µg/ml

(média=83,4 µg/ml) para articulações com osteoartrite. Segundo Brown et al. (2007a) o exercício e a osteocondrose diminuem o tamanho da cadeia de ácido hialurônico no líquido sinovial, e sua concentração, sendo que cavalos normais apresentam 1838 µg/ml, exercitados 1385 µg/ml e com osteocondrose 831µg/ml de ácido hialurônico no líquido sinovial.

Estas diferenças nos valores de ácido hialurônico podem estar relacionadas aos diferentes métodos utilizados. Devido a estas discrepâncias, a mensuração de ácido hialurônico no líquido sinovial pode não ser um marcador eficaz de osteoartrite (TAYLOR et al., 2006), mesmo porque ele pode estar refletindo principalmente a funcionalidade da membrana sinovial e não alterações da cartilagem articular.

Ao final do experimento a média do ácido hialurônico no líquido sinovial foi discretamente inferior ao início (375,99 µg/ml) e muito similar aos valores obtidos por Popot et al. (2004) para articulações normais (328 µg/ml). Assumindo que o volume da articulação tibiotársica é de aproximadamente 30 ml, o *clearance* sinovial pode ser estimado em 4 ml/h, e a taxa de turnover do líquido sinovial de aproximadamente 10%, a diminuição na concentração de ácido hialurônico não seria afetada pelas repetidas retiradas de líquido sinovial. Diferentemente de um processo inflamatório com efusão articular, causado, por exemplo, pelas repetidas artrocenteses (VAN DEN BOOM et al., 2004).

Diferentes velocidades de síntese e degradação de ácido hialurônico, assim como mobilização para linfa, influenciam a concentração de ácido hialurônico no líquido sinovial. Em articulações com inflamação aguda, a degradação pode ser maior devido à presença de mediadores da inflamação no líquido. Por outro lado, sabe-se que o TGF- β 1 é o maior estimulante para síntese de ácido hialurônico pela sinóvia e está envolvido no mecanismo de efusão articular nas doenças articulares inflamatórias e degenerativas. O aumento da pressão intra-articular também resulta em aumento da síntese de ácido hialurônico. Logo, a diminuição na concentração de ácido hialurônico causada por uma injúria pode ser decorrente da diluição, a despeito do possível aumento da síntese (BROWN et al., 2007a). Ainda, eventos concomitantes podem, então, resultar numa concentração normal de ácido hialurônico dentro da articulação (TULAMO et al., 1996).

Uma diminuição na concentração de ácido hialurônico no líquido sinovial também pode refletir a presença de hialuronidases ou derivados de radicais livres liberados por neutrófilos. Alternativamente, níveis reduzidos de ácido hialurônico

podem refletir uma diminuição na atividade da membrana sinovial (GARNERO et al., 2000).

Muitos agentes modificadores da doença osteoartrítica orais contém glucosamina e condroitim sulfato sob diversas formas, e mais recentemente ácido hialurônico. Postula-se que estes componentes sejam absorvidos pelo trato gastrointestinal, tornam-se incorporados aos tecidos articulares, e fornecem os precursores necessários para manter a integridade cartilágnea, e talvez até mesmo promover a reparação da cartilagem.

Neste estudo, pode observar alterações nas concentrações de glicosaminoglicanos endógenos após a utilização do suplemento composto por condroitim sulfato, glucosamina e ácido hialurônico, tanto no líquido sinovial, como plasma e urina. Logo, supõe-se que estas alterações sejam reflexo de alterações no metabolismo dos glicosaminoglicanos, e que de fato a suplementação exógena interfira no processo da osteoartrite

7 CONCLUSÃO

Nas condições em que este trabalho foi desenvolvido, conclui-se que:

A administração oral de glucosamina e condroitim sulfato associados ao ácido hialurônico determina:

- tendência ao aumento dos glicosaminoglicanos urinários e do condroitim sulfato no líquido sinovial imediatamente após o tratamento, com diminuição até 30 dias;
- aumento sérico do ácido hialurônico;
- manutenção da concentração de ácido hialurônico no líquido sinovial, com tendência à diminuição.

Apesar de haver indícios de melhora clínica e radiográfica dos animais avaliados, esta informação não se traduz estatisticamente.

REFERÊNCIAS

ADEBOWALE, A. O.; COX, D. S.; LIANG, Z.; EDDINGTON, N. D. Analysis of glucosamine and chondroitin sulfate content in market products and the caco-2 permeability of chondroitin sulfate raw materials. **Journal of the American Nutraceutical Association**, v. 3, n. 1, p. 37-44, 2000.

ALTMAN, R. D.; MOSKOWITS, R. Hialuronato de sódio intraarticular no tratamento da osteoartrose do joelho: um experimento clínico randomizado. **The Journal of Rheumatology**, v. 25, n. 11, 1998.

ALWAN, W. H.; CARTER, S. D.; BENNET, D.; EDWARDS, G. B. Glycosaminoglycans in horses with osteoarthritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 23, n. 1, p. 44-47, 1991.

ASHEIM, A.; LINDBLAD, G. Intra-articular treatment of arthritis in race-horses with sodium hyaluronate. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 17, n. 4, p. 379-394, 1976.

BALAZS, E. A. Viscosupplementation for treatment of osteoarthritis: from initial discovery to current status and results. **Surgical Technology International**, v. 12, p. 278-289, 2004.

BALAZS, E. A.; DARZYNKIEWICZ, Z. The effect of hyaluronic acid on fibroblasts, mononuclear phagocytes, and lymphocytes. In: KULONEN, E.; PIKKARAINEN, J. P. K. K. (Ed.). **Biology of Fibroblasts**. New York: , Academic Press, 1973. p. 237-248.

BASSLEER, C. T.; COMBAL, J. P.; BOUGARET, S. Effects of chondroitin sulfate and interleukin-1 beta on human articular chondrocytes cultivated in clusters. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 6, n. 3, p. 196-204, 1998.

BASSLEER, C.; HENROTIN, Y.; FRANCHIMONT, P. In-vitro evaluation of drugs proposed as chondroprotective agents. **International Journal of Tissue Reactions**, v. 14, n. 5, p. 231-241, 1992.

BERGIN, B. J.; PIERCE, S. W.; BRAMLAGE, L. R.; STROMBERG, A. Oral hyaluronan gel reduces post operative tarsocrural effusion in the yearling Thoroughbred. **Equine Veterinary Journal**, v. 38, n. 4, p. 375-378, 2006.

BRIEF, A. A.; MAURER, S. G.; DI CESARE, 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, 2001.

BROWN, M. P.; WEST, L. A.; MERRIT, K. A.; PLAAS, A. H. K. Changes in sulfatation patterns of chondroitin sulfate in equine articular cartilage and synovial fluid in response to aging and osteoarthritis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 6, p. 786-791, 1998.

BROWN, M. P.; TRUMBLE, T. N.; SANDY, J. D.; MERRITT, K. A. A simplified method of determining synovial fluid chondroitin sulfate chain length. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 15, n. 12, p. 1443-1445, 2007.

BROWN, M. P.; TRUMBLE, T. N.; PLAAS, A. H. K.; SANDY, J. D.; ROMANO, M.; HERNANDEZ, J.; MERNITT, K. A. Exercise and injury increase chondroitin sulfate chain length and decrease hyaluronan chain length in synovial fluid. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 15, p. 1318-1325, 2007a.

BUCCI, L. R. Chondroprotective agents: Glucosamine salts and chondroitin sulfates. **Townsend Letter for Doctors**, v. 1, p. 52-54, 1994.

CALATRONI, A.; AVENOSO, A.; FERLAZZO, A. M.; LIDNER, A.; CAMPO, G. M. Transient increase with strenuous exercise of plasma levels of glycosaminoglycans in humans and horses. **Connective Tissue Research**, v. 49, p. 416-425, 2008.

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, 2002.

CANAPP, S. O. Scintigraphic evaluation of dogs with acute synovitis after treatment with glucosamine-chondroitin sulfate. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 12, p. 1550, 1999.

CARON, J. P. Osteoarthritis. In: ROSS, M. W.; DYSON, S. J. **Diagnosis and management of lameness in the horse**. Philadelphia: Saunders Company, 2003. p. 572-594.

CATERSON, B.; HUGHES, C. E.; ROUGHLEY, P.; MORT, J. S. Anabolic and catabolic markers of proteoglycan metabolism in osteoarthritis. **Acta orthopaedica Scandinavica**. Supplementum, v. 266, p. 121-124, 1995.

CHAN, P. S.; CARON, J. P.; ROSA, G. J.; ORTH, M. Glucosamine and chondroitin sulfate regulate gene expression and synthesis of nitric oxide and prostaglandin E2 in articular cartilage explants. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 13, n. 5, p. 387-394, 2005.

CHARLOTTE, E. L. C.; FIRTH, E. C.; DELAHUNT, J. W.; PFEIFFER, D. U.; THOMPSON, K. G. Naturally occurring osteoarthritis in the metacarpophalangeal joints of wild horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 31, n. 1, p. 73-81, 1999.

CHRIS KIANI; LIWEN CHEN; YAO JIONG WU; ALBERT J YEE; BURTON B YANG. Structure and function of aggrecan. **Cell Research**, v. 12, p. 19-32, 2002.

CLAYTON, H. M.; ALMEIDA, P. E.; PRADES, M. Double-blind study of the effects of an oral supplement intended to support joint health in horses with tarsal degenerative joint disease. **Proceedings of the 48th Annual Convention of American Association of Equine Practitioners**, v. 48, p. 314-317, 2002.

CLEGG, P. D.; COUGHLAN, A. R.; CATER, S. D. Equine Timp-1 and Timp-2: Identification, activity and cellular sources. **Equine Veterinary Journal**, v. 30, n. 5, p. 416-423, 1998.

COHEN, M.; WOLFE, R.; MAI, T.; LEWIS, D. A randomized, double blind, placebo controlled trial of a topical cream containing glucosamine sulfate, chondroitin sulfate, and camphor for osteoarthritis of the knee. **The Journal of Rheumatology**, v. 30, n. 3, p. 523-528, 2003.

DAVIS, M.; ETTINGER, W.; NEUHAUS, J. M.; BARCLAY, J. D.; DEGAI, M. R. Correlates of knee pain among US adults with and without radiographic knee osteoarthritis. **Journal of Rheumatology**, v. 19, p. 1943-1949, 2002.

DEAL, C. L.; MOSKOWITZ, R. W. Nutraceuticals as therapeutic agents in osteoarthritis. The Role of Glucosamine, Chondroitin Sulfate, and Collagen Hydrolysate. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 25, n. 2, p. 380-381, 1999.

DIETRICH C. P.; NADER, H. B. Fractionation and properties of four heparin sulfates from beef lung tissue. Isolation and partial characterization of a homogeneous species of heparitin sulfate. **Biochemical et Biophysica Acta**, v. 343, p. 34-44, 1974.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behavior of acid mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analitical Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 645-647, 1976.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 75, p. 125-131, 1995.

EDDINGTON, N. D.; DU, J.; WHITE, N. Evidence of the Oral Absorption of Chondroitin Sulfate as Determined by Total Disaccharide Content After Oral and Intravenous Administration to Horses. In: ANNUAL CONVENTION OF AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 47., 2001, San Diego, California. Proceedings... 2001. v. 47, p. 326-328.

FELTON, J. I.; CHLEBEK-BROWN, K. A.; CARON, J. P.; ORTH, M. W. Effect of glucosamine on interleukin-1-conditioned articular cartilage. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v. 34, p. 219-223, 2002.

FORRESTER, J. V.; BALAZS, E. A. Inhibition of phagocytosis by high molecular weight hyaluronate. **Immunology**, v. 40, n. 3, p. 435-446, 1980.

FORSYTH, R. K.; BRIGDEN, C. V.; NORTHROP, A. J. Double blind investigation of the effects of oral supplementation of combined glucosamine hydrochloride (GHCL) and chondroitin sulphate (CS) on stride characteristics of veteran horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 36, p. 622-625, 2006.

FORTIER, L. Systemic therapies for joint disease in horses. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 21, n. 3, p. 547-557, 2005.

FRANZÉN, A.; BJÖRNSSON, S.; HEINEGÅRD, D. Cartilage proteoglycan aggregate formation. Role of link protein. **Biochemical Journal**, v. 197, n. 3, p. 669-674, 1981.

FRASER, J.; LAURENT, T. Turnover and metabolism of hyaluronan. **CIBA Foundation Symposium**, v. 143, p. 41-53, 1989.

FRISBIE, D. D.; AL-SOBAYIL, F.; BILLINGHURST, R. C.; KAWCAK, C. E.; MCILWRAITH, C. W. Changes in synovial fluid and serum biomarkers with exercise and early osteoarthritis in horses. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 16, n. 10, p. 1196-1204, 2008.

FRISBIE, D. D.; GHIVIZZANI, S. C.; ROBBINS, P. D.; EVANS, C. H.; MCILWRAITH, C. W. Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene. **Gene therapy**, v. 9, n. 1, p. 12-20, 2002.

FRISBIE, D. D.; KAWCAK, C. E.; BAXTER, G. M.; TROTTER, G. W.; POWERS, B. E.; LASSEN, E. D.; MCILWRAITH, C. W. Effects of 6alpha-methylprednisolone acetate on an equine osteochondral fragment exercise model. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 12, p. 1619-1628, 1998.

FRISBIE, D. D.; KAWCAK, C. E.; MCILWRAITH, W.; WERP, N. M. Evaluation of polysulfated glycosaminoglycan or sodium hyaluronan administered intra-articularly for treatment of horses with experimentally induced osteoarthritis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 70, n. 2, p. 203-209, 2009.

GALLAGHER, J. T. The extended family of proteoglycans: social residents of pericellular zone. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 1, n. 6, p. 1201-1218, 1989.

GARNERO, P.; ROUSSEAU, J. C.; DELMAS, P. D. Molecular basis and clinical use of biochemical markers of bone, cartilage, and synovium in joint diseases. **Arthritis & Rheumatism**, v. 43, n. 5, p. 953-968, 2000.

GAUGHAN, E. M.; NIXON, A. J.; KROOK, L. P. Effects of sodium hyaluronate on tendon healing and adhesion formation in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 5, p. 764-773, 1991.

GAUSTAD, G.; LARSEN, S. Comparison of polysulphated glycosaminoglycan and sodium hyaluronate with placebo in treatment of traumatic arthritis in horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 27, n. 5, p. 356-362, 1995.

GHOSH, P.; GUIDOLIN, D. Potential mechanism of action of intra-articular hyaluronan therapy in osteoarthritis: are the effects molecular weight dependent? **Seminars Arthritis Rheumatism**, v. 32, n. 1, p. 10-37, 2002.

GHOSH, P.; SMITH, M.; WELLS, C. Second line agents in osteoarthritis. In Dixon J. S.; FURST, D.E. (Ed.). **Second line agents in the treatment of rheumatic diseases**. New York: Marcel Dekker, 1992. p. 363-393.

GIBSON, K. T.; HODGE, H.; WHITTEM, T. Inflammatory mediators in equine synovial fluid. **Australian Veterinary Journal**, v. 73, n. 4, p. 148-151, 1996.

GOODRICH, L. R.; NIXON, A. J. Medical treatment of osteoarthritis in the horse - a review. **The Veterinary Journal**, v. 171, p. 51-69, 2006.

GRAUW, J. C.; LEST, C. H. A. V.; WEEREN, P. R. V. Inflammatory mediators and cartilage biomarkers in synovial fluid after a single inflammatory insult: a longitudinal experimental study. **Arthritis Research Therapy**, v. 11, p. 1-8, 2009.

HANSON, R. R.; BRAWNER, W.; BLAIK, M. Oral treatment with a nutraceutical (Consequin®) for ameliorating signs of navicular syndrome in horses. **Veterinary Therapeutics**, v. 2, n. 2, p. 148-159, 2001.

HANSON, R. R.; SMALLEY, L. R.; HUFF, G. K.; WHITE, S.; HAMAD, T. A. Oral treatment with a glucosamine-chondroitin sulfate compound for degenerative joint disease in horses: 25 cases. **Equine Practice**, v. 19, n. 9, p. 16-22, 1997.

HARDY, J.; BERTONE, A. L.; WEISBRODE, S. E.; MUIR, W. W.; O'DORISIO, T. M.; MASTY, J. Cell trafficking, mediator release, and articular metabolism in acute inflammation of innervated or denervated isolated equine joint. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 1, p. 88-100, 1998.

HARST, M. R. V. D.; LEST, C. H. A. V. D.; DEGROOT, J.; KIERS, G. H.; BRAMA, P. A. J.; WEEREN, P. R. V. Study of cartilage and bone layers of the bearing surface of the equine metacarpophalangeal joint relative to different timescales of maturation. **Equine Veterinary Journal**, v. 37, n. 3, p. 200-206, 2005.

HESSE, A.; WURZEL, H.; KRAMPITZ, G.; VAHLENSIECK, W. Experimental determination of the kinetics of calcium-binding with chondroitin sulphate and the effects of uric acid on this process. **Urological Research**, v. 15, n. 2, p. 15-93, 1987.

HOFFER, L. J.; KAPLAN, L. N.; HAMAMED, M. J.; GRIGORIU, A. C.; BARON, M. Sulfate could mediate the therapeutic effect of glucosamine sulfate. **Metabolism: Clinical and experimental**, v. 50, n. 7, p. 767-770, 2001.

HOWARD, R. D.; MCILWRAITH, C. W. Hyaluronan and its use in the treatment of equine joint disease. In: MCILWRAITH, C. W.; TROTTER, G. T. (Ed.). **Joint disease in the horse**. Philadelphia: Saunders, 1996. p. 257-269.

HOWARD, R. D.; MCILWRAITH, C. W. Sodium hyaluronate in the treatment of equine joint disease. **The Compendium on Continuing Education**, v. 15, p. 473-483, 1993.

JACKSON, R. L.; BUSCH, S. J.; CARDIN, A. D. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. **Physiological Reviews**, v. 2, p. 481-539, 1991.

JAQUES, L. B.; BALLIEUX, R. E.; DIETRICH, C. P.; KAVANAGH, L. W. A microelectrophoresis method for heparin. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 351-360, 1968.

JIMENEZ, S.; DODGE, G. The effects of glucosamine sulfate on human chondrocyte gene expression. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 5, p. 72, 1997.

KAWCAK, C. E.; FRISBIE, D. D.; TROTTER, G. W.; MCILWRAITH, C. W.; GILLETTE, S. M.; POWERS, B. E.; WALTON, R. M. Effects of intravenous administration of sodium hyaluronate on carpal joint in exercising horses after arthroscopic surgery and osteochondral fragmentation. **American Journal of Veterinary Research**, v. 58, n. 10, p. 1132-1140, 1997.

KAWCAK, C. E.; MCILWRAITH, C. W.; NORRDIN, R. W.; PARK, R. D.; JAMES, S. P. The role of subchondral bone in joint disease: a review. **Equine Veterinary Journal**, v. 33, n. 2, p. 120-126, 2001.

KIDD, J. A.; FULLER, C.; BARR, A. R. S. Osteoarthritis in the horse. **Equine Veterinary Education**, v. 13, n. 3, p. 160-168, 2001.

KIRKER-HEAD, C. A.; CHANDNA, V. K.; AGARWAL, R. K.; MORRIS, E. A.; TIDWELL, A.; O' CALLAGHAN, M. W.; RAND, W.; KUMAR, M. S. A. Concentrations of substance P and prostaglandin E2 in synovial fluid of normal and abnormal joints of horse. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 6, p. 714-718, 2000.

KIRSTEN, M. N.; ORTH, M. W.; COUSSENS, P. M.; CHAN, P-S.; CARON, J. P. Effects of glucosamine and chondroitin sulphate on mediators of osteoarthritis. **Dentistry, Surgery and Lameness**, v. 52, p. 572-573, 2006.

KJÈLEEN, L.; LINDAHL, U. Proteoglycans : structures and interactions. **Annual Review of Biochemistry**, v. 60, p. 443-475, 1991.

KRESSE, H.; HAUSSER, H.; SCHONHERR, E. Small proteoglycans. **Experientia**, v. 49, p. 403-416, 1993.

LAJEUNESSE, D.; DELALANDRE, A.; MARTEL-PELLETIER, J. Hyaluronic acid reverses the abnormal synthetic activity of human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. **Journal of the International Bone and Mineral Society**, v. 33, n. 4, p. 703-710, 2003.

LAVERTY, S.; SANDY, J. D.; CELESTE, C.; VACHON, P.; MARIER, J. F.; PLAAS, A. H. Synovial fluid levels and serum pharmacokinetics in a large animal model following treatment with oral glucosamine at clinically relevant doses. **Arthritis Rheumatology**, v. 52, n. 1, p. 181-191, 2005.

LEEB, B. F.; SCHWEITZER, H.; MONTAG, K.; SMOLEN, J. S. A meta-analysis of chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis. **The Journal of Rheumatology Supplement**, v. 27, n. 1, p. 205-211, 2000.

LEES, P. Pharmacology of drugs used to treat osteoarthritis in veterinary practice. **Inflammopharmacology**, v. 11, n. 4-6, p. 385-399, 2003.

LIMA, C. R.; BACCARIN, R. Y. A.; MICHELACCI, Y. M. Reliability of agarose gel electrophoresis and 1,9-dimethylmethylene blue tests for quantification of urinary glycosaminoglycans. **Clinica Chimica Acta**, v. 378, n. 1-2, p. 206-215, 2007.

LITTLE, C. B.; HILBERT, B. J.; WICKATROM, S.; HEDLUND B. E. Quantitative microanalysis of equine synovial fluid glycosaminoglycan concentration. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 10, p. 1534-1539, 1990.

LOHMANDER, L. S. Markers of cartilage metabolism in arthrosis. A Review. **Acta orthopaedica Scandinavica**, v. 62, n. 6, p. 623-632, 1991.

MAGNUSSON, L. E.; EKMAN, S. Osteoarthritis of antebrachiocarpal joint of riding horses. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 42, n. 4, p. 429-434, 2001.

MARTINS, J. R. M.; PASSEROTI, C. C.; MACIEL, R. M. B.; SAMPAIO, L. O.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. Practical determination of hyaluronan by a new noncompetitive fluorescence - based assay on serum of normal and cirrhotic patients. **Analytical Biochemistry**, v. 319, p. 65-72, 2003.

MAY, S. A. Cytokines in the pathogenesis of equine joint disease. In: SCHIJNS, V. E. C. J.; HORZINEK, M. C. **Cytikines in veterinary medicine**. CAB International, 1997. p. 191-199.

MAY, S. A. Degenerative joint disease (osteoarthritis, osteoarthrosis, secondary joint disease). In: HOULTON, J. E. F.; COLLINSON, R. W. (Ed.). **Manual of small animal arthrology**. Ames, IA.: Iowa State University Press, 1994. p. 62-74.

MAZIÈRES, B.; LOYAU, G.; MENKES, C. J. Le chondroïtine sulfate dans le traitement de la gonarthrose et de la coxarthrose. **Revue du Rhumatisme et des Maladies Ostéoarticulaires**, v. 59, p. 466-471, 1992.

MCALINDON, T. E. Glucosamine and chondroitin for treatment of osteoarthritis: a systematic quality assesment and meta-analysis. **The Journal of the American Medical Association**, v. 283, n. 11, p.1469-1475, 2000.

MCILWRAITH, C. W. Disease process of synovial membrane, fibrous capsule, ligaments and articular cartilage. In: STASHAK, T. S. **Adam's LAMENESS IN HORSE**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. p. 459-645.

MCILWRAITH, C. W. Doenças das articulações, tendões, ligamentos e estruturas relacionadas. In: STASHAK, T. S. (Ed.). **Claudicação em eqüinos segundo Adams**. 4. ed. São Paulo: Roca, 1994. 943 p.

MCILWRAITH, C. W. General pathobiology of the joint and response to injury. In: MCILWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W. **Joint disease in the horse**. Philadelphia: Saunders Company, 1996. p. 40-70.

MCILWRAITH, C. W. Use of cynovial fluid and serum biomarkers in equine bone and joint disease: a review. **Equine Veterinary Journal**, v. 37, n. 5, p. 473-482, 2005.

MCLAUGHLIN, R. Management of chronic osteoarthritic pain. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 30, n. 4, p. 933-949, 2000.

MELO, 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**, v. 55, n. 1, p. 35-43, 2003.

MICHEL, B. A.; STUCKI, G.; FREY, D.; DE VATHAIRE, F.; VIGNON, E.; BRUEHLMANN, P.; UEBELHART D. Chondroitins 4 and 6 in osteoarthritis of the knee: a randomized, controlled trial. **Arthritis and Rheumatism**, v. 52, n. 3, p. 779-786, 2005.

MICHELACCI, Y. M. Fatores Inibidores e Agregadores da Litogênese: Glicosaminoglicanos. In: SCHOR, N.; HEILBERG, I. P. (Org.). **Calculose Renal. Fisiopatologia, Diagnóstico, Tratamento**. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda., 1995, p. 17-25.

MICHELACCI Y. M.; HORTON D. S. P. Q. Proteoglycans from the cartilage of young hammerhead shark *Sphyrna-Lewini*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 92B, n. 4, p. 651-659, 1989.

MICHELACCI, Y. M.; LAREDO, J.; DIETRICH, C. P. Proteoglycans and chondroitin sulfates from human multiple chondroma (enchondromatosis). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 14, p. 161-172, 1981.

MICHELACCI, Y. M.; MOURÃO, P. A. S.; LAREDO, J.; DIETRICH, C. P. Chondroitin sulfates and proteoglycans from normal and arthrosic human cartilages. **Connective Tissue Research**, v. 7, p. 29-36, 1979.

MOSKOWITZ, R. W. The appropriate use of NSAIDs in arthritic conditions. **American Journal of Orthopedics**, v. 25, n. 9, p. 4-6, 1996.

MOURÃO, P. A. S.; MICHELACCI, Y. M.; TOLEDO, O. M. S. Glycosaminoglycans and proteoglycans from normal and tumoral cartilagens in human and rat. **Cancer Research**, v. 39, p. 2802-2806, 1979.

NAKAMURA, K.; YOKOHAMA, S.; YONEDA, M.; OKAMOTO, S.; TAMAKI, Y.; ITO, T.; OKADA, M.; ASO, K.; MAKINO, I. High, but not low, molecular weight hyaluronan prevents T-cell-mediated liver injury by reducing proinflammatory cytokines in mice. **Journal of Gastroenterology**, v. 39, n. 4, p. 346-354, 2004.

NGANVONGPANIT, K.; ITTHIARBHA, A.; ONG-CHAI, S.; KONGTAWELERT, P. Evaluation of serum chondroitin sulfate and hyaluronan: biomarkers for osteoarthritis in canine hip dysplasia. **Journal of Veterinary Science**, v. 9, n. 3, p. 317-325, 2008.

OKE, S. L.; WEESE, J. S. Review of Glucosamine-Containing Oral Joint Supplements: Are They Effective in the Horse? In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 52., 2006, San Antonio, Texas, USA, **Proceedings...** 2006.

OKE, S.; AGHAZADEH-HABASHI, A.; WEESE, J. S.; JAMALI, F. Evaluation of glucosamine levels in commercial equine oral supplements for joints. **Equine Veterinary Journal**, v. 38, n. 1, p. 93-95, 2006.

OWENS, S.; WAGNER, P.; VANGSNESS, C. T. J. R. Recent advances in glucosamine and chondroitin supplementation. **The Journal of Knee Surgery**, v. 17, n. 4, p. 185-193, 2004.

PALMER, J. L.; BERTONE, A. L.; MCCLAIN, H. Assessment of glycosaminoglycan concentration in equine synovial fluid as a marker of joint disease. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 3, p. 205-212, 1995.

PELLETIER, J. P.; MARTEL-PELLETIER, J.; HOWELL D. S. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: KOOPMAN, W. J. **Arthritis and allied conditions: a textbook of rheumatology**, 13. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997, p. 1969-1984.

PENNINX, B. W. J. H.; ABBAS, H.; AMBROSIUS, W.; NICKLAS, B. J.; DAVIS, C.; MESSIER, S. P.; PAHOR, M. Inflammatory marker and physical function among older adults with knee osteoarthritis. **Journal of Rheumatology**, v. 31, n. 10, p. 2027-2031, 2004.

PENNOCK, C. A.; CHARLES, R. G.; STANSBIE, D. Glycosaminoglycans fractions in normal human urine. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 12, n. 5, p. 207-211, 1975.

PEREIRA D. A.; AGUIAR, J. A.; HAGIWARA, M. K.; MICHELACCI, Y. M. Changes in cat urinary glycosaminoglycans with age and in feline urologic syndrome. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1672, n. 1, p.1-11, 2004.

PISKO, E. J.; TURNER, R. A.; SODERSTROM, L. P.; PANETTI, M.; FOSTER, S. L.; TREADWAY, W. J. Inhibition of neutrophil phagocytosis and enzyme release by hyaluronic acid. **Clinical Experimental Rheumatology**, v. 1, n. 1, p. 41-44, 1983.

POPOT, M. A.; BONNAIRE, Y.; GUECHOT, J. Hyaluronan in horses: physiological production rate, plasma and synovial fluid concentrations in control conditions and following sodium hyaluronate administration. **Equine Veterinary Journal**, v. 36, n. 6, p. 482-487, 2004.

RESCH, K. L.; HILL, S.; ERNST, E. Use of complementary therapies by individuals with 'arthritis.' **Clinical Rheumatology**, v.16, n. 4, p. 391-395, 1997.

RICHARDSON, D. W. Pathophysiology of degenerative joint disease. **Equine Veterinary Science**, v. 11, n. 3, p. 156-157, 1990.

RICHARDSON, D. W.; LOINAZ, R. An Evidence-based approach to selected joint therapies in horses. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 23, n. 2, p. 443-460, 2007.

RIGGS, C. M. Osteochondral injury and joint disease in the athletic horse. **Equine Veterinary Education**, v. 18, n. 2, p. 100-112, 2006.

ROSSDALE, P. D.; HOPES, R.; DIGBY, N. J.; OFFORD, K. Epidemiological study of wastage among racehorses, 1982-1983. **Veterinary Record**, v. 116, n. 3, p. 66-70, 1985.

ROGDERS, M. R. Effects of oral glucosamine and chondroitin sulfates supplementation on frequency of intra-articular therapy of the horse tarsus. **The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 4, n. 2, p. 155-162, 2006.

RUTH, D. T.; SWITES, B. J. Comparison of the effectiveness of intra-articular hyaluronic acid and conventional therapy for the treatment of naturally occurring arthritic conditions in horses. **Equine Practice**, v. 7, n. 9, p. 25-29, 1985.

SANDY, J. D.; BOYER, H.; HYMER, S. S. Control of chondrocyte aggrecanase by glutamine supply. Transactions, 44th Annual Meeting, **Orthopaedic Research Society**, New Orleans, Louisiana, 1998, p. 853

SCOTT, J. E. Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, in vivo and in the tissues. **The FASEB Journal**, v. 6, p. 2639-2645, 1992.

SERNI, U. Profile of glucosamine sulfate as an example of slow acting drug in osteoarthritis. **Revista Española de Reumatología**, v. 20, p. 222-224, 1993, Supplement. Apresentado no In Proceedings of the 18th ILAR Congress of Rheumatology.

SETNIKAR, I.; PACINI, M. A.; REVEL, L. Antiarthritic effects of glucosamine sulfate studied in animal models. **Arzneim Forsch**, v. 41, p. 542-545, 1991.

SILVA JUNIOR, F. S. Osteoartrite experimental em ratos: efeito de sulfato de glicosamina e sulfato de condroitina sobre a incapacitação articular e a lesão de cartilagem articular. 2007. 84 f. Tese (Doutorado em Medicina) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007

STASHAK, T. S. **Adam's lameness in horses**. 5. ed. Philadelphia: Saunders Company, 2002.

SUMER, E. U.; SCHALLER, S.; SONDERGAARD, B. C.; TANKÓ, L. B.; QVIST, P. Application of biomarkers in the clinical development of new drugs for chondroprotection in destructive joint diseases: a review. **Biomarkers**, v. 11, n. 6, p. 485-506, 2006.

TAKAHASHI, K.; HASHIMOTO, S.; KUBO, T.; HIRASAWA, Y.; LOTZ, M.; AMIEL, D. Effect of hyaluronan on chondrocyte apoptosis and nitric oxide production in experimentally induced osteoarthritis. **Journal of Rheumatology**, v. 27, n. 7, p. 1713-1720, 2000.

TALLARIDA, R. J.; COWAN, A.; RAFFA, R. B. Antinociceptive synergy, additivity and subadditivity with combination of oral glucosamine plus nonopioid analgesics in mice. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 307, n. 2, p. 699-704, 2003.

TAYLOR, D. M.; FERGUSON, C. E.; CHREE, A. Absence of detectable infectivity in trachea of BSE affected cattle. **The Veterinary Record**, v. 138, n. 7, p. 160-161, 1996.

TAYLOR, S. E.; WEAVER, M. P.; PITSILLIDES, A. A.; WHEELER, B. T.; WHEELER-JONES, C. P.; SHAW, D. J.; SMITH, R. K. Cartilage oligomeric matrix protein and hyaluronan levels in synovial fluid from horses with osteoarthritis of the tarsometatarsal joint compared to a control population. **Equine Veterinary Journal**, v. 38, n. 6, p. 502-507, 2006.

TODHUNTER, R. J.; LUST, G. Pathophysiology of synovitis: clinical signs and examination in horses. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 12, p. 980-992, 1990.

TOMA, L.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. Differences in the nonreducing ends of heparan sulfates excreted by patients with mucopolysaccharidoses revealed by bacterial heparitinases: a new tool for structural studies and differential diagnosis of Sanfilippo's and Hunter's syndromes. **Laboratory investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 75, n. 6, p. 771-781, 1996.

TOWHEED, T. E. Published meta-analyses of pharmacological therapies for osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 10, n. 11, p. 836-837, 2002.

TRUMBLE, T. N. The Use of Nutraceuticals for Osteoarthritis in Horses. The Veterinary Clinics of North America. **Equine Practice**, v. 21, n. 3, p. 575-597, 2005.

TULAMO, R. M.; SAARI, H.; KONTTINEN, Y. T. Determination of concentration of hyaluronate in equine serum. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 5, p. 740-742, 1990.

TULAMO, R. M.; HOUTTU, J.; TUPAMÄKI, A.; SALONEN, M. Hyaluronate and large molecular weight proteoglycans in synovial fluid from horses with various arthritides. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 6, p. 932-937, 1996.

VAN DEN BOOM, R.; BRAMA, P. A. J.; KIERS, G. H.; DEGROOT, J.; BARNEVELD, A.; VAN WEEREN, P. R. The influence of repeated arthrocentesis and exercise on matrix metalloproteinase and tumour necrosis factor alpha activities in normal equine joints. **Equine Veterinary Journal**, v. 36, n. 2, p. 155-159, 2004.

VAN DEN BOOM, R.; LEST, C. H. A. V.; BULL, S.; BRAMA, P. A. J.; VAN WEEREN, P. R.; BARNEVELD, A. The influence of repeated arthrocentesis and exercise on synovial fluid concentrations of nitric oxide, prostaglandin E2 e glycosaminoglcans in healthy activities equine joints. **Equine Veterinary Journal**, v. 37, n. 3, p. 250-256, 2005.

VAN DER KRAN, P. M.; DEVRIES, B. J.; VITTERS, E. L. Inhibition of glycosaminoglycan synthesis in anatomically intact rat patellar cartilage by paracetamol-induced sulfate depletion. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, n. 19, p. 3683-3690, 1988.

VANNUCCI, A. B.; SILVA, R. G.; LATORRE, L. C.; ZERBINI, C. A. F. Osteoartrose. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 59, p. 35-46, 2002.

VERBRUGGEN, G.; GOEMAERE, S.; VEYS, E. Chondroitin sulfate S/DMOAD (Structure/ Disease Modifying Osteoarthritis (OA) Drug) in the treatment of OA of the finger joints. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 5, p. 70, 1997.

VIEIRA, F. A. C.; BACCARIN, R. Y. A.; AGUIAR, J. A. K.; MICHELACCI, Y. A. Urinary Excretion of Glycosaminoglycans in Horses: Changes With Age, Training, and Osteoarthritis. **Scientific Papers**, v. 25, n. 9, p. 387-400, 2007.

VIGNON, E.; CONROZIER, M. P.; RICHARD, S.; CARRILLON, Y.; FANTINO, O. Radiographic assessment of hip and knee osteoarthritis. Recommendations: recommended guidelines. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 7, n. 4, p. 434-436, 1999.

VIITANEN, M.; BIRD, J.; MAISI, P.; SMITH, R.; TULAMO, R. M.; MAY, S. Differences in the concentration of various synovial fluid constituents between the distal interphalangeal joint, the metacarpophalangeal joint and the navicular bursa in normal horses. **Research in Veterinary Science**, v. 69, n. 1, p. 63-67, 2000.

VOLPI, N. Chondroitin Sulfate: Structure, role and pharmacological Activity. **Advances in Pharmacology**, v. 53, p. 1-568, 2006.

WASTESON, A.; WESSLER, E. Molecular size and xylose content of urinary glycosaminoglycans. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 252, n. 1, p. 13-17, 1971.

WHITE, G. W.; SANDERS, T.; STITES, T.; JONE, E. W.; HAMM, J.; WALLS, R. Efficacy of systemically administered antiarthritic drugs in on induced equine carpal model. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 42., 1996, Denver, Colorado. Proceedings... Colorado: AAEP, 1996. p. 135-137.

WIGHT, T. N.; HEINEGARD, D. K.; HASCALL, V. C. Proteoglycans: structure and function. In: HAY, E. D. **Cell biology of extracellular matrix**. 2.ed. Plenum Press, 1991. p. 45-78.

WRIGHT, I. M. Oral supplements in the treatment and prevention of joint diseases: a review of their potential application to the horse. **Equine Veterinary Education**, v. 13, n. 3, p. 135-139, 2001.

ZUPANETS, I. A.; DROGOVOZ, S. M.; BEZDETOKO, N. V.; RECHKIMAN, I. E.; SEMENOV, A. N. Influence of glucosamine on the anti-reactive effect nonsteroidal anti-inflammatory agents. **Farmakologiya i toksikologiya**, v. 54, n. 2, p. 61-63, 1991.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Média de 2 determinações para cada animal da excreção urinária de glicosaminoglicanos (mg/l) e creatinina (g/l), e a razão GAG/creatinina das amostras de urina do animal 1, no decorrer do experimento - São Paulo - 2009

Dias de colheita	Média mg/l					Razão GAG/creatinina (x 10e-03)				
	CS	DS	HS	Total	Creatinina	CS	DS	HS	Total	% CS
0	1,44	0,20	0,22	1,87	1,31	1,10	0,16	0,17	1,42	77%
0	1,44	0,20	0,22	1,87	1,31	1,10	0,16	0,17	1,42	77%
5	8,38	1,13	1,44	10,95	2,08	4,03	0,54	0,69	5,26	77%
10	5,06	1,32	1,17	7,55	1,27	3,99	1,04	0,92	5,95	67%
15	8,49	1,84	1,97	12,30	2,54	3,34	0,72	0,78	4,84	69%
20	3,28	1,01	0,12	4,42	1,69	1,94	0,60	0,07	2,61	74%
27	6,61	1,29	0,71	8,60	3,39	1,95	0,38	0,21	2,54	77%
34	5,12	1,16	0,52	6,80	2,58	1,98	0,45	0,20	2,63	75%
41	2,91	0,67	0,09	3,67	1,91	1,52	0,35	0,05	1,92	79%
48	1,95	0,53	0,21	2,68	1,15	1,69	0,46	0,18	2,33	73%
55	5,48	1,17	0,36	7,00	2,05	2,67	0,57	0,18	3,42	78%

APÊNDICE B - Média de 2 determinações para cada animal da excreção urinária de glicosaminoglicanos (mg/l) e creatinina (g/l), e a razão GAG/creatinina das amostras de urina do animal 2, no decorrer do experimento - São Paulo - 2009

Dias de colheita	Média mg/l					Razão GAG/creatinina (x 10e-03)				
	CS	DS	HS	Total	Creatinina	CS	DS	HS	Total	% CS
0	2,97	0,83	0,19	4,00	3,41	0,87	0,24	0,06	1,17	74%
0	4,15	1,25	1,12	6,52	4,48	0,93	0,28	0,25	1,46	64%
5	2,61	0,74	0,25	3,60	4,32	0,60	0,17	0,06	0,83	73%
10	2,26	0,67	0,38	3,32	2,46	0,92	0,27	0,16	1,35	68%
15	3,42	0,79	0,45	4,67	3,19	1,07	0,25	0,14	1,46	73%
20	4,33	1,01	0,17	5,50	3,99	1,08	0,25	0,04	1,38	79%
27	3,85	1,14	0,68	5,67	3,80	1,01	0,30	0,18	1,49	68%
34	3,86	1,02	0,69	5,57	1,98	1,95	0,52	0,35	2,81	69%
41	2,03	0,46	0,12	2,60	2,44	0,83	0,19	0,05	1,07	78%
48	1,02	0,27	0,17	1,46	2,24	0,45	0,12	0,08	0,65	70%
55	4,11	1,15	0,27	5,53	3,33	1,23	0,34	0,08	1,66	74%

APÊNDICE C - Média de 2 determinações para cada animal da excreção urinária de glicosaminoglicanos (mg/l) e creatinina (g/l), e a razão GAG/creatinina das amostras de urina do animal 3, no decorrer do experimento - São Paulo - 2009

Dias de colheita	Média mg/l					Razão GAG/creatinina (x 10e-03)				
	CS	DS	HS	Total	Creatinina	CS	DS	HS	Total	% CS
0	2,07	0,38	0,04	2,49	1,23	1,69	0,31	0,04	2,03	83%
0	5,30	1,26	1,18	7,74	1,65	3,21	0,76	0,72	4,69	68%
5	4,04	1,16	0,36	5,56	2,19	1,84	0,53	0,16	2,54	73%
10	3,52	1,01	0,40	4,94	1,50	2,35	0,67	0,27	3,29	71%
15	6,69	1,46	0,53	8,68	3,95	1,69	0,37	0,14	2,20	77%
20	4,91	1,05	0,15	6,11	3,36	1,46	0,31	0,04	1,82	80%
27	3,70	0,74	0,48	4,92	1,93	1,92	0,38	0,25	2,55	75%
34	3,99	0,87	0,25	5,12	3,04	1,31	0,29	0,08	1,68	78%
41	1,94	0,16	0,09	2,20	1,32	1,47	0,12	0,07	1,66	88%
48	0,80	0,17	0,10	1,07	0,62	1,29	0,27	0,15	1,72	75%
55	4,54	1,30	0,28	6,12	3,28	1,39	0,40	0,08	1,87	74%

APÊNDICE D - Média de 2 determinações para cada animal da excreção urinária de glicosaminoglicanos (mg/l) e creatinina (g/l), e a razão GAG/creatinina das amostras de urina do animal 4, no decorrer do experimento - São Paulo - 2009

Dias de colheita	Média mg/l					Razão GAG/creatinina (x 10e-03)				
	CS	DS	HS	Total	Creatinina	CS	DS	HS	Total	% CS
0	1,44	0,18	0,00	1,62	2,04	0,71	0,09	0,00	0,80	89%
0	1,96	0,47	0,42	2,85	3,25	0,60	0,15	0,13	0,88	69%
5	3,17	0,95	0,77	4,89	2,97	1,07	0,32	0,26	1,65	65%
10	2,74	0,81	0,56	4,12	1,89	1,45	0,43	0,30	2,18	67%
15	1,10	0,25	0,06	1,41	1,89	0,58	0,13	0,03	0,75	78%
20	1,19	0,26	0,02	1,48	2,20	0,54	0,12	0,01	0,67	81%
27	5,32	1,13	1,30	7,75	4,17	1,28	0,27	0,31	1,86	69%
34	1,00	0,17	0,05	1,22	2,87	0,35	0,06	0,02	0,43	82%
41	2,04	0,77	0,41	3,22	1,43	1,43	0,54	0,29	2,25	63%
48	2,62	0,79	0,20	3,61	4,37	0,60	0,18	0,05	0,83	73%
55	0,51	0,18	0,09	0,77	0,68	0,75	0,26	0,13	1,13	66%

APÊNDICE E - Média de 2 determinações para cada animal da excreção urinária de glicosaminoglicanos (mg/l) e creatinina (g/l), e a razão GAG/creatinina das amostras de urina do animal 5, no decorrer do experimento - São Paulo - 2009

Dias de colheita	Média mg/l					Razão GAG/creatinina (x 10e-03)				
	CS	DS	HS	Total	Creatinina	CS	DS	HS	Total	% CS
0	3,13	0,55	0,32	4,00	2,87	1,09	0,19	0,11	1,39	78%
0	6,32	1,23	1,01	8,57	3,75	1,69	0,33	0,27	2,28	74%
5	4,95	1,12	0,54	6,61	3,73	1,33	0,30	0,14	1,77	75%
10	4,38	1,12	0,77	6,28	4,05	1,08	0,28	0,19	1,55	70%
15	7,94	1,59	1,09	10,62	3,06	2,59	0,52	0,36	3,47	75%
20	5,58	1,44	1,45	8,47	3,10	1,80	0,47	0,47	2,73	66%
27	6,22	1,34	1,17	8,73	4,22	1,47	0,32	0,28	2,07	71%
34	6,26	1,57	1,08	8,92	3,16	1,98	0,50	0,34	2,82	70%
41	4,73	1,23	0,59	6,55	2,42	1,96	0,51	0,24	2,71	72%
48	4,80	1,29	0,92	7,01	2,65	1,81	0,49	0,35	2,65	68%
55	6,32	1,55	0,93	8,81	3,10	2,04	0,50	0,30	2,84	72%

APÊNDICE F - Média de 2 determinações para cada animal da excreção urinária de glicosaminoglicanos (mg/l) e creatinina (g/l), e a razão GAG/creatinina das amostras de urina do animal 6, no decorrer do experimento - São Paulo - 2009

Dias de colheita	Média mg/l					Razão GAG/creatinina (x 10e-03)				
	CS	DS	HS	Total	Creatinina	CS	DS	HS	Total	% CS
0	2,17	0,25	0,06	2,49	1,98	1,10	0,13	0,03	1,26	87%
0	3,15	1,14	0,28	4,57	2,26	1,40	0,50	0,12	2,02	69%
5	7,31	2,07	1,06	10,44	3,33	2,19	0,62	0,32	3,13	70%
10	4,84	1,23	0,29	6,36	2,25	2,15	0,55	0,13	2,83	76%
15	5,16	1,61	0,36	7,14	3,11	1,66	0,52	0,12	2,29	72%
20	5,12	1,81	0,66	7,59	4,43	1,16	0,41	0,15	1,71	68%
27	6,60	2,16	1,44	10,20	5,77	1,14	0,37	0,25	1,77	65%
34	4,14	1,39	0,91	6,44	3,25	1,27	0,43	0,28	1,98	64%
41	3,58	1,22	0,27	5,07	3,66	0,98	0,33	0,07	1,38	71%
48	3,70	1,46	0,68	5,84	3,41	1,09	0,43	0,20	1,71	63%
55	4,51	1,21	0,21	5,92	3,55	1,27	0,34	0,06	1,67	76%

APÊNDICE G - Valores, média e desvio padrão de ácido hialurônico (AH) em ng/ml do soro dos animais 1 a 6 com osteoartrite - São Paulo - 2009

AH		ANIMAIS						
DIAS	A1	A2	A3	A4	A5	A6	MÉDIA ng/ml	DESVPAD
0	5,10	2,89	11,69	15,09	18,70	10,20	10,61	5,94
5	11,08	17,48	9,29	23,47	18,45	13,47	15,54	5,26
10	3,42	23,80	7,31	10,99	38,39	14,70	16,43	12,82
15	8,97	18,98	8,02	26,88	24,78	19,90	17,92	7,88
20	9,39	12,36	7,54	28,18	25,97	23,56	17,83	9,09
27	6,05	10,72	10,51	21,00	16,07	11,14	12,58	5,21
55	6,39	22,80	27,53	21,57	26,82	21,37	21,08	7,66

APÊNDICE H - Valores, média e desvio padrão de condroitim sulfato (CS) em µg/ml do líquido sinovial dos animais 1 a 6 com osteoartrite - São Paulo - 2009

CS		ANIMAIS						
DIAS	A1	A2	A3	A4	A5	A6	MÉDIA µg/ml	DESVPAD
0	0,16	0,15	0,05	0,04	0,06	0,00	76,13	62,16
5	0,13	0,21	0,08	0,10	0,01	0,13	109,76	64,97
10	0,11	0,16	0,05	0,11	0,05	0,10	95,62	40,69
15	0,19	0,17	0,07	0,06	0,10	0,06	107,23	57,80
20	0,10	0,06	0,09	0,08	0,08	0,07	78,85	13,67
27	0,11	0,13	0,07	0,08	0,08	0,10	93,05	21,90
34	0,11	0,24	0,07	0,09	0,07	0,12	117,16	62,04
41	0,09	0,08	0,11	0,08	0,06	0,10	86,55	18,34
48	0,09	0,14	0,08	0,06	0,07	0,02	77,28	40,14
55	0,04	0,09	0,07	0,05	0,07	0,05	61,61	21,18

APÊNDICE I - Valores, média e desvio padrão de ácido hialurônico (AH) em µg/ml do líquido sinovial dos animais 1 a 6 com osteoartrite - São Paulo - 2009

AH		ANIMAIS						
DIAS	A1	A2	A3	A4	A5	A6	MÉDIA µg/ml	DESVPAD
0	0,44	0,94	0,45	0,43	0,19	0,19	440,07	274,57
5	0,73	0,87	0,69	0,47	0,08	0,30	523,28	295,32
10	0,68	0,50	0,37	0,44	0,16	0,36	418,16	170,51
15	0,47	0,55	0,36	0,29	0,41	0,25	387,36	112,96
20	0,44	0,31	0,54	0,54	0,46	0,23	420,33	126,17
27	0,42	0,39	0,24	0,38	0,34	0,33	351,15	62,36
34	0,47	0,94	0,33	0,41	0,47	0,36	496,03	225,02
41	0,15	0,77	0,39	0,25	0,43	0,41	399,76	209,00
48	0,33	1,01	0,27	0,14	0,48	0,29	418,30	307,78
55	0,27	0,80	0,41	0,17	0,25	0,36	375,99	225,13