

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO SULFATO DE CONDROITINA
SOBRE O DESENVOLVIMENTO PRÉ-NATAL DE RATOS WISTAR.**

Alessandra Krein

Dissertação para obtenção do grau de Mestre
em Ciências Veterinárias na área de
Farmacologia.

Orientador: João Roberto Braga de Mello.

PORTO ALEGRE

Setembro de 2003

AGRADECIMENTOS

Agradeço à UFRGS, por oferecer o curso de pós-graduação de modo totalmente gratuito. E à CAPES, por disponibilizar a bolsa, sem a qual seria muito mais penosa a conclusão do curso.

Ao meu orientador, João Roberto Braga de Mello, o qual me orientou sem paternalismos, exigindo sempre minha independência e iniciativa perante cada etapa do meu mestrado, me guiando sem me carregar, meu muito obrigada.

Às minhas colegas de laboratório, Vanessa Möller, Fernanda Bastos de Mello, Eliane Dallegrave, Ângela Potter, Mariângela, Beatriz, meu muito obrigada pelas orientações, discussões e muitos risos, e pela disponibilidade, para dúvidas e conversas amigas.

Às eficientes e amigas funcionárias do PG, Carmen, Vera, Andréia, muito obrigada pela paciência e esforço em sempre resolver minhas confusões de datas, documentos, matrículas, etc.

Ao funcionário do ratário do Departamento de Farmacologia, Diego, obrigada pela força.

Finalmente, agradeço aos meus pais, Gilberto e Leoni, pelo total incentivo, doação e apoio durante não só o meu mestrado, mas em toda minha vida, em todos os aspectos. Obrigada, de coração.

Finalizo agradecendo ao meu filho, João, por surgir de maneira inesperada, em meio ao meu mestrado, trazendo muito mais cor e sentido a todas as minhas ações.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	9
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 Doenças articulares.....	16
3.2 O que é o SC?.....	17
3.3 Mecanismo de ação.....	18
3.4 Farmacocinética.....	18
3.5 Reações adversas e toxicidade.....	20
3.6 Terapia das AO.....	21
3.7 Ações do SC.....	23
3.8 Ensaio clínicos.....	26
3.9 Testes de teratogenicidade.....	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 Animais.....	37
4.2 Fármaco.....	37
4.3 Procedimentos de acasalamento.....	38
4.4 Tratamento.....	38
4.5 Variáveis avaliadas nas fêmeas durante a gestação.....	39
4.6 Avaliação dos fetos e órgãos das fêmeas.....	39
4.7 Métodos de coloração.....	39

4.7.1 Coloração de alizarina.....	39
4.8 Diagnóstico das alterações ósseas.....	41
4.9 Taxas avaliadas.....	42
4.10 Variáveis avaliadas.....	42
4.11 Análise estatística.....	43
5 RESULTADOS.....	44
5.1 Desenvolvimento ponderal das ratas durante a gestação.....	44
5.2 Consumo de ração das ratas durante a gestação.....	45
5.3 Consumo de água das ratas durante a gestação.....	45
5.4 Massa relativa dos órgãos das fêmeas ao final da gestação.....	46
5.5 Variáveis reprodutivas das ratas.....	47
5.6 Taxa de teratogenia.....	48
6 DISCUSSÃO.....	55
7 CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1- Massa relativa dos órgãos (%) das fêmeas tratadas com SC. As ratas foram tratadas do 6º ao 15º dia da gestação, nas dosagens 200 mg/kg (n=13), 400 mg/kg (n=14), 600 mg/kg (n=14) e um grupo controle (n=14) tratado com água destilada (10 ml/kg). São apresentados os valores médios e \pm epm (Porto Alegre/RS, 06/03)..... 47
- TABELA 2- Variáveis reprodutivas das ratas tratadas com SC. As ratas foram tratadas com SC, do 6º ao 15º dia da gestação, nas dosagens 200 mg/kg (n=13), 400 mg/kg (n=14), 600 mg/kg (n=14) e um grupo controle (n=14) tratado com água destilada (10 ml/kg). São apresentados os valores médios das observações indicadas (\pm epm) e as taxas de perdas pós-implantação (Porto Alegre/RS, 06/03)..... 48
- TABELA 3- Ocorrência de alterações ósseas nos fetos de fêmeas tratadas por via oral com SC. As ratas foram tratadas com SC, do 6º ao 15º dia da gestação, nas dosagens 200 mg/kg (n=13), 400 mg/kg (n=14), 600 mg/kg (n=14) e um grupo controle (n=14) tratado com água destilada (10 ml/kg). Valores expressos em percentual..... 49

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1- Desenvolvimento ponderal das ratas (1º dia = 100%) durante os 21 dias de gestação. As ratas foram tratadas com SC, do 6º ao 15º dia da gestação, nas dosagens 200 mg/kg (n=13), 400 mg/kg (n=14), 600 mg/kg (n=14) e um grupo controle (n=14) tratado com água destilada (10 ml/kg). Os valores representam a média dos animais por grupo (Porto Alegre/RS, 06/03)..... 44
- FIGURA 2- Consumo percentual de ração (%) em relação à massa corporal durante os 21 dias de gestação. As ratas foram tratadas com SC, do 6º ao 15º dia da gestação, nas dosagens 200 mg/kg (n=13), 400 mg/kg (n=14), 600 mg/kg (n=14) e um grupo controle (n=14) tratado com água destilada (10 ml/kg). Os valores apresentam a média dos animais por grupo (Porto Alegre/RS, 06/03)..... 45
- FIGURA 3- Consumo percentual de água (%) em relação à massa corporal durante os 21 dias de gestação. As ratas foram tratadas com SC, do 6º ao 15º dia da gestação, nas dosagens 200 mg/kg (n=13), 400 mg/kg (n=14), 600 mg/kg (n=14) e um grupo controle (n=14) tratado com água destilada (10 ml/kg). Os valores representam a média dos animais por grupo (Porto Alegre/RS, 06/03)..... 46
- FIGURA 4- Feto processado pela técnica de coloração de alizarina de Taylor e Van Dyke (1985). Os ossos estão corados de púrpura, a massa muscular está translúcida. A seta indica uma 14ª costela rudimentar. O feto pertence ao grupo 400 mg/kg (Porto Alegre/RS, 06/03)..... 50

- FIGURA 5- Feto processado pela técnica de coloração de alizarina de Taylor e Van Dyke (1985). Os ossos estão corados, a massa muscular está translúcida. Pode-se notar que os ossos do esterno estão pouco ossificados, e verifica-se o duplo centro de ossificação em duas porções indicadas pelas setas. O feto pertence ao grupo 400 mg/kg (Porto Alegre/RS, 06/03)..... 50
- FIGURA 6- Feto processado pela técnica de coloração de alizarina de Taylor e Van Dyke (1985). Os ossos estão corados, a massa muscular está translúcida. A seta indica a malformação denominada palato fendido. O feto pertence ao grupo 400 mg/kg (Porto Alegre/RS, 06/03)..... 51
- FIGURA 7- Feto processado pela técnica de coloração de alizarina de Taylor e Van Dyke (1985). Os ossos estão corados, a massa muscular está translúcida. A seta indica o duplo centro de ossificação em uma das vértebras torácicas. O feto pertence ao grupo 200 mg/kg (Porto Alegre/RS, 06/03)..... 51
- FIGURA 8- Feto processado pela técnica de coloração de alizarina de Taylor e Van Dyke (1985). Os ossos estão corados, a massa muscular está translúcida. As setas indicam o 14º par de costelas rudimentares. O feto pertence ao grupo 200 mg/kg (Porto Alegre/RS, 06/03)..... 52
- FIGURA 9- Feto processado pela técnica de coloração de alizarina de Taylor e Van Dyke (1985). Os ossos estão corados, a massa muscular está translúcida. A seta indica uma ossificação adicional na base inferior do supraoccipital. O feto pertence ao grupo controle (Porto Alegre/RS, 06/03)..... 52
- FIGURA 10- Feto processado pela técnica de coloração de alizarina de Taylor e Van Dyke (1985). Os ossos estão de púrpura, a massa muscular está translúcida. A seta indica a ossificação adicional na base superior esquerda do supraoccipital. O feto pertence ao grupo controle (Porto Alegre/RS, 06/03)..... 53
- FIGURA 11- Feto processado pela técnica de coloração de alizarina de Taylor e Van Dyke (1985). Os ossos estão corados, a massa muscular está translúcida. A seta indica o duplo centro de ossificação em um dos ossos do esterno. O feto pertence ao grupo controle (Porto Alegre/RS, 06/03)..... 53

- FIGURA 12- Feto processado pela técnica de coloração de alizarina de Taylor e Van Dyke (1985). Os ossos estão corados, a massa muscular está translúcida. É possível notar a pobre ossificação dos ossos do esterno, embora o esqueleto geral esteja bem corado. O feto pertence ao grupo controle (Porto Alegre/RS, 06/03)..... 54
- FIGURA 13- Feto corado pela técnica de alizarina de Taylor e Van Dyke (1985). Os ossos estão corados de púrpura, a massa muscular está translúcida. Esse feto foi escolhido por estar dentro dos padrões de normalidade na avaliação da estrutura esquelética, pertence ao grupo controle (Porto Alegre/RS, 06/03)..... 54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR – *American College of Rheumatology* (Colégio Americano de Reumatologia)

AINES – Antiinflamatórios Não Esteróides

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

°C – graus Celsius

CATEME – Câmara Técnica de Medicamentos

CFR – *Code of Federal Regulations* (Código de Regulamentos Federais)

CO₂ – gás carbônico

COX₂ – Cicloxigenase 2

Da - Daltons

DL₅₀ – Dose Letal 50

EPA – *Environmental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental)

EULAR - *European League Against Rheumatism* (Associação Européia Contra o Reumatismo)

FDA – *Food and Drug Administration* (Administração de Alimentos e Drogas)

g - grama

G - Glicosamina

GAGs - Glicosaminoglicanos

GAGPS – Glicosaminoglicanos polisulfatados

h - hora

ICBS – Instituto de Ciências Básicas da Saúde

IV - intravenosa

IM - intramuscular

KDa – Quilo Daltons

kg - Quilograma

KOH – Hidróxido de Potássio

µg - micrograma

mg - miligrama

ml - mililitro

n – número

NIH - *National Institutes of Health* (Instituto Nacional de Saúde)

NOAEL – *No-observed-adverse-effects* (efeitos adversos não observados)

NTIS – *National Technical Information Service* (Serviço Nacional de Informação Técnica)

OA - Osteoartrites/osteoartroses

OECD - *Organization for Economic Cooperation and Development* (Organização para
Cooperação Econômica e Desenvolvimento)

OPP – *Office of Pesticide Programs* (Escritório de Programas de Pesticidas)

OPPT – *Office of Pollution Prevention and Toxics* (Escritório de Prevenção da Poluição e
Tóxicos)

OPPTS – *Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances* (Escritório de Prevenção de
Substâncias Tóxicas e Pesticidas)

PGI - Proteoglicanos

RS – Rio Grande do Sul

RTECS - *Registry of Toxic Effects of Chemical Substances* (Registro de Efeitos Tóxicos de
Substâncias Químicas)

SC – Sulfato de condroitina

SNC – Sistema Nervoso Central

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

VO – Via Oral

RESUMO

O sulfato de condroitina (SC) é um agente protetor de cartilagem usado na terapêutica das osteoartrites/osteoartroses. Considerado nutracêutico (parte de alimento que propicia benefício médico), não é regulamentado pela FDA (*Food and Drug Administration*) nos Estados Unidos. No Brasil a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) controla esses produtos. Na Europa, agências controladoras de medicamentos também controlam a liberação desses produtos para o comércio.

O presente estudo foi realizado para avaliar a embriofeto-toxicidade potencial dessa substância. O estudo é parte de uma avaliação para verificação da segurança do SC. Para isso foi utilizado o segmento II, dos testes de toxicidade reprodutiva preconizado pelas normas da EPA (*Environmental Protection Agency*) e FDA. O SC nas dosagens de 200, 400 e 600 mg/kg de massa corporal foi administrado por via oral a ratas Wistar (N=14) entre os dias 6 e 15 de prenhez. Aos 21 dias de gestação (dia previsto para o parto) as fêmeas tratadas foram mortas e foi realizada histerectomia. O número de sítios de implantação, de fetos vivos e mortos, reabsorções e corpos lúteos foram registrados. Os fetos foram pesados, examinados quanto a malformações externas, e fixados em formol para posterior técnica de coloração por alizarina para avaliação esquelética. O desenvolvimento ponderal das ratas e seu consumo de água e ração também foram registrados para posterior avaliação de toxicidade materna.

Não houve alteração nos índices de fertilidade e reprodutivos das mães entre os grupos. O desenvolvimento ponderal e consumos de água e ração também não foram alterados pelo tratamento com diferentes doses de SC, quando comparados com o grupo controle. Não foram encontradas alterações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nos percentuais de malformações esqueléticas (200 mg/kg = 25,45%, 400 mg/kg = 19,44%, 600 mg/kg = 11,84%, controle = 12,76%).

Os resultados verificados nesse trabalho permitem afirmar que o SC em doses de 200, 400 e 600 mg/kg, administrado no período de embriogênese, não é teratogênico para ratas Wistar. Também não ocorreram sinais de toxicidade materna.

ABSTRACT

Chondroitin Sulfate (CS), is a chondroprotective agent used on osteoarthritis/osteoarthrosis (AO) therapies. Considered nutraceutical, it is not regularized in the United States but it is in Europe.

This study was done to evaluate the potential embryofetus-toxicity of this substance. This study is part of an evaluation to verify the security of CS. For this purpose it was used the Segment II of reproductive toxicity test recongnized by EPA (Environmental Protection Agency) and FDA (Food and Drug Administration). The CS administered on doses of 200, 400 and 600 mg/Kg of body weight was given by *gavage* to Wistar female rats (N=14) from the 6th to the 15th days of pregnancy and caesarians were done immediately after the mother's sacrifice, on the 21th days of pregnancy (parturion day).

The number of sieges of implantation, alive and dead fetus, reabsorption and lutes bodies were registered. The fetus were weighted, examined in relation to external misformation, and fixed in formol to a later coloration technique by Alizarin Red Solution to skeleton evaluation. The ponderable development of the female rats and its water and ration consumption were also registered to a later evaluation of maternal toxicity.

It was not found alterations significant statistical ($p=0,05$) on the skeleton bad formation percentages through the test of Qui-Square (200 mg = 25,45%, 400 mg = 19,44%, 600 mg = 11,84%, control = 12,76%). There were no changes on the fertility and reproductive index from the mother. The ponderal development and consumption were also not modified by the treatment with different doses of CS, when compared with the control group.

The results verified on this study allow to assure that CS in doses of 200, 400, 600 mg/Kg, administered on embriogenesis period, is not teratogenic to Wistar female rats. There weren't also signals of maternal toxicity.

1. INTRODUÇÃO

Os problemas articulares como as osteoartrites/osteoartroses (OA) que acometem tanto pessoas como animais, são situações importantes na prática médica e veterinária. Geralmente a lesão causa dor e limitação do movimento, trazendo sofrimento ao seu portador.

Os tratamentos para essa patologia vão desde fármacos antiinflamatórios não esteróides (AINES) e corticosteróides, até os chamados nutracêuticos (qualquer substância considerada alimento ou parte de alimento que propicie benefícios médicos ou para a saúde, incluindo a prevenção e tratamento de doenças) como o sulfato de condroitina (SC).

O fármaco ideal para tratamento das OA deve proporcionar qualidade de vida por reduzir a dor articular, aumentar a mobilidade articular e reduzir a destruição da cartilagem.

Como qualquer medicamento, os benefícios desses fármacos são sempre comparados com seus efeitos adversos, principalmente porque a terapêutica das OA é prolongada (semanas a meses).

Para melhor compreensão do papel do SC na terapêutica das OA e seu crescente uso, serão apresentados os pontos positivos e negativos dos fármacos utilizados atualmente.

Como efeito adverso, os AINES freqüentemente ocasionam úlceras gástricas. Isso pode ser notado principalmente em cães, pois essa espécie tem maior sensibilidade gastrointestinal à esses fármacos do que o homem, devido às diferenças na farmacocinética e sensibilidade tecidual. Os cães também fazem a circulação entero-hepática de AINES, o que aumenta a meia-vida e o potencial para efeitos adversos desses fármacos. Os efeitos nocivos potenciais são: anormalidades gastrointestinais, inibição do metabolismo da cartilagem, toxicose renal e tendência hemorrágica (Hulse, 1998).

Outra terapia para AO está baseada no uso de corticosteróides. Tanto na medicina veterinária como na medicina humana pois eles reduzem efetivamente a inflamação sinovial. Os corticosteróides têm potencial de diminuição da síntese do colágeno e proteoglicano (PGI), devendo ser evitado longo tratamento. Além disso a terapêutica prolongada com esse fármaco suprime a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, o que limita seu uso em dias alternados, ou não mais do que 3 dias de duração (Hulse, 1998).

Dito isso, passamos para os glicosaminoglicanos polisulfatados (GAGPS), como o SC, que são denominados nutracêuticos, e preenchem os requisitos de fármaco ideal para uso nas OA. Eles reduzem a expressão de enzimas degradativas da cartilagem, diminuindo a degradação da matriz cartilaginosa, também induzem a síntese de nova matriz e possuem ainda efeito antiinflamatório. Além de impedirem a progressão da lesão e proporcionarem efeito antiinflamatório, na literatura são citados poucos efeitos adversos indesejáveis, mesmo com seu uso prolongado (Hulse, 1998).

Existem muitos trabalhos sobre o SC, principalmente ensaios clínicos em humanos, mas a área de toxicidade reprodutiva é ainda pouco explorada, tendo somente algumas pesquisas (Camus, 1972; Bali *et al.*, 2001).

Segundo a *Food and Drug Administration* (FDA), qualquer fármaco ou suplemento alimentar deve ser testado para toxicidade reprodutiva. Os testes exigidos por esse órgão, para liberação dos fármacos ou suplementos alimentares, são divididos em três segmentos (Neubert *et al.*, 1996). O segmento utilizado nesse trabalho foi o II, que investiga a teratogenicidade.

De acordo com a pesquisa de revisão bibliográfica realizada, existem poucos trabalhos publicados que avaliam o efeito dessa substância sobre a reprodução em ratas Wistar. Alguns laboratórios farmacêuticos, apenas não indicam seu uso na gestação, devido à uma suposta tendência hemorrágica. Em razão disso, maiores informações sobre toxicidade reprodutiva fazem-se necessárias.

Foi utilizado o segmento II de avaliação de toxicidade pré-natal conforme normas da EPA (*Environmental Protection Agency*) de 1996 e recomendações da FDA, e OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*) para testes desta natureza.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliação toxicológica do SC no desenvolvimento pré-natal do sistema esquelético dos fetos de ratas Wistar, tratadas durante o período de organogênese, determinando a possível teratogenicidade do SC, usando doses 10, 20 e 30 vezes maiores que a preconizada para uso terapêutico em cães.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a taxa de malformações externas e esqueléticas das ninhadas, por grupo.
- Avaliação do efeito do SC nas ratas, durante a gestação, para investigar a possibilidade de toxicidade materna.
- Avaliação do SC nas variáveis reprodutivas das fêmeas.
- Avaliar a média de peso dos filhotes, individual e por ninhada.
- Avaliar a média do número de filhotes por ninhada.
- Avaliar a média de filhotes vivos/mortos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Doenças articulares

As doenças articulares são problemas difíceis de solucionar na medicina veterinária, já que independentemente da causa, o dano sofrido pela matriz da cartilagem e condrócitos, inicia um círculo vicioso de degradação da cartilagem, que acaba resultando em alterações articulares e periarticulares, conhecidas como osteoartrites/osteoartroses (OA), (Johnston, 2001).

As OA têm sido descritas como doença articular freqüentemente encontrada em cães (Benett, 1985).

Também em pessoas idosas, as OA são um problema, sendo a patologia mais prevalente do sistema musculoesquelético em idosos. Nos Estados Unidos (EUA), estima-se que atinja mais de 16 milhões de pessoas, principalmente aquelas com mais de 40 anos (Da Câmara & Dowless, 1998).

O processo degenerativo é causado por um defeito na elaboração das macromoléculas que compõe a cartilagem, essas macromoléculas incluem os glicosaminoglicanos (GAGs) e proteoglicanos (PGI) (Johnston, 2001).

A cartilagem normal e madura é formada por condrócitos embebidos na matriz extracelular. Os condrócitos são responsáveis pela biossíntese, homeostase e catabolismo da cartilagem. Junto com as fibras colágenas, dão à cartilagem sua força tênsil. A matriz extracelular contém um componente mais específico, o agregado PGI (Bali *et al.*, 2001).

Na estrutura morfológica da articulação há um padrão sazonal, que é baseado na organização dos condrócitos, na orientação do colágeno e na distribuição de PGI. Essa orientação do colágeno e do PGI, forma um material composto, que resiste às forças de compressão e tração sem sofrer danos, e permite a transmissão dessas forças ao osso subcondral subjacente.

A ruptura dessa organização é o início da OA. A partir desse ponto, quando é detectada a OA, o tratamento é direcionado para alívio dos sinais clínicos (Johnston, 2001).

A OA é acompanhada por sinovite proliferativa nas articulações em humanos, caninos e eqüinos. A taxa de síntese e liberação de enzimas degradativas é alta nas articulações inflamadas. Em adição, os debris da cartilagem e produtos da degradação da matriz podem causar reações inflamatórias, incluindo ativação do complemento (Todhunter & Lust, 1994).

3.2 O que é o SC

As preparações comerciais de SC são uma mistura de SC-4 e 6 derivados de cartilagem traqueal de bovinos adultos e terneiros (Reyes *et al.*, 2000). O SC-4 e SC-6 são os GAGs mais abundantes na cartilagem articular (Häuselmann, 2001).

O SC, é constituído de GAGs monossulfatados que são formados por unidades dissacarídeo (N-acetilgalactosamina + ácido glicurônico) repetidas. Esses componentes são moléculas muito longas, com pesos moleculares de 25 a 40 kDa. Os resíduos galactosaminos são sulfatados em posição 4 (SC-4) ou 6 (SC-6). O resíduo sulfato e ácido carboxílico do ácido glicurônico são ionizados, conferindo à cadeia uma forte carga negativa, o que explica parcialmente seu papel farmacológico (Paroli *et al.*, 1991; Bali *et al.*, 2001). Essa carga negativa faz com que haja repelência entre essas cadeias, resultando em resistência à compressão (Johnston, 2001).

Os GAGs formam os PGI. Os PGI são moléculas compostas de uma proteína central a que estão ligadas cadeias laterais de GAGs. O complexo todo é uma grande molécula de aproximadamente 100×10^6 Da (Bali *et al.*, 2001). Esse complexo também pode ser chamado de monômero proteoglicano, é ele que confere rigidez compressiva à cartilagem. O monômero proteoglicano mais comumente encontrado na cartilagem articular é o agrecano. Os GAGs que formam o agrecano são SC e sulfato de ceratina. Os agrecanos ligam-se a uma molécula de ácido hialuronônico para formar um agregado de agrecanos (Johnston, 2001).

Resumindo, na cartilagem, os GAGs são complexados à uma proteína central, para formar os PGs que são ancorados (como agregados) na estrutura central de ácido hialurônico e à rede de colágeno. As cargas negativas nos GAGs permitem que os PGI absorvam e diminuam o estresse mecânico e peso nas articulações, através de um mecanismo de absorção do choque envolvendo a ligação e liberação de moléculas de água (Paroli *et al.*, 1991).

3.3 Mecanismos de ação

Estudos *in vivo* e *in vitro* mostram que o SC regula a formação de nova cartilagem por estimulação da síntese de condrócitos, PGs e ácido hialurônico. Em adição, o SC inibe enzimas proteolíticas e lisossomais (elastase, hialuronidase) que podem danificar a cartilagem articular (Towheed *et al.*, 1998).

Somando-se à atividade metabólica reguladora, o SC possui propriedades antiinflamatórias por mecanismos envolvendo a inibição do reconhecimento do complemento C₁ (Bifoni & Paroli, 1991).

3.4 Farmacocinética

A primeira evidência da presença de SC-4 de baixo peso molecular no sangue, após administração de SC em ratos, foi relatada em 1978 por Hata e Nagai. Eles detectaram uma meia-vida de 10 a 12 horas após injeção intraperitoneal de SC.

Sue (1979), através de estudo com preparações radiomarcadas, relatou que 70% da radioatividade foram absorvidos após administração por via oral em ratos e cães, mas somente 8,5% foram atribuídos a moléculas de SC intactas. A radioatividade associada com as moléculas de peso molecular menor do que ou igual àsquelas de N-acetilgalactosamina, persistiram e aumentaram com o tempo. Há evidência experimental para indicar que a molécula de SC é absorvida por pinocitose, como é o caso com heparina e outros componentes de alto peso molecular.

Palmieri *et al.*(1990), verificaram após administração de SC, via oral, um rápido aumento na concentração sanguínea, seguida por um platô de 14 horas no rato e 28 horas nos cães. Observou também um tropismo do SC por tecidos ricos em GAGs (olhos, cartilagem articular, discos lombares e as correspondentes epífises vertebrais). Os componentes de baixo peso molecular aumentaram progressivamente com o tempo após a administração, e 24 horas depois eles representaram a maioria dos componentes. Somente 10% da fração de alto peso molecular foram encontrados no plasma, urina, fluido sinovial e cartilagem. Isso pode ser resultado da metabolização do SC em componentes com baixo peso molecular.

Para Baici *et al.*(1992), após administração por via oral de SC, a concentração de GAGs no soro não mudou em 18 pessoas (6 voluntários sadios, 6 pacientes com artrite

reumatóide e 6 pacientes com osteoartrite). Por outro lado, para Gross (1983), a concentração de SC aumenta no plasma e no fluido sinovial em humanos.

A farmacocinética do SC foi investigada em humanos, após administração por via oral (Conte *et al.*, 1995). Após a administração oral de 3 g de SC a 12 voluntários saudáveis, foram avaliados os níveis de SC no plasma, demonstrando que a concentração máxima alcançada foi de 11,4 µg/ml (atingida em 3,2 horas) e o tempo de meia-vida foi de aproximadamente 6 horas. Um pico de oligo e polissacarídeos com um peso molecular menor que 5000 Da derivados da digestão parcial do SC exógeno, também foi encontrado no plasma.

Conte *et al.* (1995), investigaram os aspectos químicos e farmacocinéticos do tratamento oral de ratos e cães com SC radiomarcado. Demonstraram que mais de 70% da radioatividade foi absorvida e encontrada na urina e tecidos. A urina foi a principal rota de excreção. Após 1,6 h no rato e 2,1 h no cão, houve pico de concentração no plasma. Após 24 horas da administração via oral, a radioatividade da substância estava maior no intestino, fígado, rins, fluido sinovial e cartilagem do que nos outros tecidos. Após 36 horas da administração via oral, a substância foi fracamente encontrada no plasma do cão e do rato.

O SC foi administrado via oral no homem (voluntários saudáveis) em uma única dose diária de 0,8 g e duas doses diárias de 0,4 g. Os resultados mostraram que ambas as formas de administração, determinaram um aumento significativo da concentração plasmática do SC, durante um período de 24 horas. Os valores de eliminação foram os mesmos para as duas administrações (Conte *et al.*, 1995).

Palmieri *et al.* (1990) mostraram que o SC exógeno marcado, administrado por via oral ou parenteral, é distribuído em vários tecidos incluindo intestino, fígado, rins (órgãos envolvidos na absorção, biotransformação e excreção dos oligo e polissacarídeos) com tendência a acumular no fluido sinovial e tecidos ricos em GAGs tais como cartilagem articular.

Alguns parâmetros bioquímicos (nº de leucócitos, proteínas, GAGPS, quantidade de ácido hialurônico e atividade da N-acetilglucosaminidase) do fluido sinovial foram avaliados em indivíduos com OA (tratados e controle). Não foram observadas variações no indivíduo que não recebeu SC. Após cinco dias de administração de SC, houve um aumento significativo da concentração e massa molecular do ácido hialurônico, e uma diminuição da enzima lisossomal N-acetilglucosaminidase. Não houve diferença significativa na contagem de leucócitos e proteínas (Conte *et al.*, 1995). Uma vez que o propósito desse estudo de Conte foi demonstrar que o SC exógeno administrado oralmente, alcança o fluido sinovial, o mesmo foi fracionado por cromatografia em gel antes e durante o tratamento com SC. Após cinco dias de

tratamento a distribuição da massa molecular de ácido hialurônico mudou, sugerindo que há uma variação quantitativa e qualitativa dessa molécula durante o tratamento com SC.

Palmieri *et al.* (1990) investigaram a distribuição da radioatividade do SC radiomarcado, administrado oral e parenteralmente. Demonstraram que mais de 70% do SC oral foi absorvido. Independentemente da rota de administração, a radioatividade foi excretada principalmente através da urina. Um tropismo da radioatividade foi observado em tecidos ricos em GAGs, tais como cartilagem articular. O SC foi encontrado no plasma, urina, fluido sinovial e cartilagem.

No homem, o rim é o principal órgão de eliminação para o SC e seus fragmentos após administração oral (Conte *et al.*, 1991).

Segundo Conte *et al.* (1991), o destino metabólico do SC exógeno é similar no homem e em animais experimentais.

3.5 Reações adversas e toxicidade

O SC é bem tolerado após consumo oral (Oliviero *et al.*, 1991; Rovetta, 1991). Somente 3% dos pacientes tiveram queixa de sintomas gástricos leves ou náusea (Oliviero *et al.*, 1991).

Para Camus (1972), tecnicamente a DL_{50} não pode ser estabelecida para o SC, já que mesmo após doses tão elevadas como 1-2 g/kg (oral ou i.v. em camundongo) 150 mg/kg (i.m. em camundongo) e 1,5 g/kg (ratos), não há relato de mortes ou conseqüências tóxicas.

No RTECS (*Registry of Toxic Effects of Chemical Substances* - Registro de Efeitos Tóxicos de Substâncias Químicas), o SC tem algumas informações sobre toxicidade avaliadas. A DL_{50} está estabelecida em 2.340 mg/kg em camundongos via intravenosa (Rinsho, 1960). A menor dose tóxica intravenosa publicada é de 1.680 mg/kg/14 dias, em ratos. Nessa dose podem ser vistas mudanças no peso do fígado, perda de peso ou diminuição do ganho de peso (Rinsho, 1960). A menor dose tóxica via oral publicada é de 445 g/kg/26 semanas. Nessa dose podem ser vistas diminuição da quantidade de alimento ingerido, perda de peso ou diminuição do ganho de peso (Rinsho, 1960).

Em estudos de toxicidade sub-aguda ou crônica usando cobaias, a administração oral de 100 mg/kg de SC por 5 dias por semana por 8 semanas não causou morte (Camus, 1972).

Não foram observadas malformações nos fetos ou filhotes de ratas ou coelhas tratadas com 0,1 a 1 g/kg de SC (Camus, 1972).

Pierre (2001), relatou que em um estudo administrando 1 g/kg/dia oralmente a ratos e coelhos, a droga não teve efeitos observáveis na mutagênese ou na função reprodutiva. Segundo Pierre (2001), não foram observados sintomas clínicos significantes após administração oral de SC a animais. Em experimentos de dose única de 2 g/kg em roedores, e doses de 60 a 100 mg/kg em ratos, gatos e cães por mais de 3 meses, o SC foi bem tolerado.

Segundo Reyes *et al.* (2000), o uso do SC, como suplemento, na terapia da OA é indicado baseando-se na absorção e acúmulo no tecido cartilaginoso e líquido sinovial, na eficácia similar aos AINES e na longa duração de ação. Apesar disso recomendam ensaios clínicos de longa duração e observam que há limitada informação na literatura sobre efeito sinérgico, contra-indicações e interações medicamentosas do SC como terapia da OA.

3.6 Terapia da AO

Por muitos anos, fármacos antiinflamatórios não esteróides (AINES), têm sido usados para suportar a dor e inflamação articular associadas com a OA em humanos (Holtzinger *et al.*, 1992; Vasseur *et al.*, 1995; Creamer & Hochberg, 1997). Mas os AINES são apenas paliativos já que não mudam o curso da condição patológica, e seu uso é limitado em razão dos seus efeitos adversos. Segundo Palmoski & Brandt (1980), esses fármacos poderiam até mesmo exacerbar a progressão da OA.

Na medicina veterinária também são usados corticosteróides e AINES, para o tratamento de OA. Entretanto, a necessidade de longos períodos de tratamento com esses agentes, pode produzir efeitos adversos e atingem os condrócitos interferindo na homeostase da matriz cartilaginosa (Manley, 1995).

Nesse contexto, ganharam força as pesquisas que investigam os chamados agentes modificadores da doença OA, como o SC, que podem influenciar diretamente o metabolismo do condrócito de maneira benéfica (Hulse, 1998). Esses agentes sustentam ou aumentam a síntese de ácido hialurônico pelos sinoviócitos (maior constituinte do fluido sinovial e lubrificante da membrana sinovial), inibem enzimas degradativas (ex: colagenase, catepsinas, hialuronidase, condroitinases) ou mediadores inflamatórios (interleucina-1, fator de 'necrose e tumor', prostaglandina E₂) e removem ou evitam a formação de fibrina, trombos e placas na sínovia ou vasos sanguíneos subcondrais (Ghosh *et al.* 1992). Desse modo, esses agentes contrariam o processo inflamatório destrutivo e auxiliam a normalização do fluido sinovial e matriz cartilaginosa (Bassler *et al.*, 1992; Hannan *et al.*, 1987).

Os componentes capazes dessas ações são idênticos aos usados pelo corpo para fabricar PGI, ou seja, os glicosaminoglicanos polisulfatados (GAGPS), como o SC (Bucci, 1994; Todhunter & Lust, 1994).

Os GAGPS são capazes de induzir a síntese de matriz da cartilagem articular e diminuir a sua degradação, eles são uma mistura de GAGs altamente sulfatados, cujo principal componente dessa mistura é o SC. O SC é extraído de traquéia e pulmões bovinos pela indústria farmacêutica (Todhunter & Lust, 1994).

Denominados de nutracêuticos pela indústria farmacêutica, a glicosamina (G) e o SC são considerados agentes condroprotetores, e por serem componentes do corpo, são considerados mais seguros do que AINES (Reyes, 2000).

O SC e a G são classificados como nutrifarmacêuticos nos Estados Unidos, assim como outros componentes tais como soja, vitaminas C, D, E, minerais e ervas, e oligoelementos como selênio, zinco, manganês e cobre (Häuselmann, 2001).

Não existe referência ao termo nutracêutico na legislação brasileira, segundo a professora Lys Mary Bileski Cândido da Universidade Federal do Paraná. O termo significa “qualquer substância considerada alimento ou parte de alimento que propicie benefícios médicos ou para a saúde, incluindo a prevenção e tratamento de doenças” (www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/doc008.pdf - 06/03).

Segundo Deolinda Maria Felin Scalabrin, Doutora em Medicina pela Disciplina de Alergia e Imunologia do Departamento de Pediatria da Universidade Federal de São Paulo e consultora médica da *Mead Johnson Nutritionals*, são exemplos de nutracêuticos: zinco, selênio, ferro, cobre, vitaminas A, C, E e B6, e o ácido fólico (www.meadjohnson.com.br/enfanews/01/nutra.asp -06/03).

Nos Estados Unidos, a G e o SC são amplamente usados e existe um grande número de medicamentos que contém essas substâncias, que não são regulamentados pelo FDA. Essas substâncias são controladas por agências federais de fármacos na Europa, mas não nos Estados Unidos. Isso pode explicar porque as companhias farmacêuticas não têm interesse em financiar testes independentes de alta qualidade para esses componentes (Häuselmann, 2001).

Na medicina humana, GAGs como G e SC, estão sendo usados como alternativa aos AINES no tratamento das OA. Estudos com o SC demonstraram que o mesmo regula a formação de nova cartilagem pela estimulação da síntese de colágeno, PGI e ácido hialurônico pelos condrócitos, e inibe enzimas proteolíticas e lisossomais (elastase, hialuronidase) que podem danificar a cartilagem articular. Em adição a essa atividade regulatória metabólica, o

SC ainda possui propriedades antiinflamatórias através de um mecanismo que impede o reconhecimento do complemento C₁ (Reyes *et al.*, 2000).

3.7 Ações do SC

O SC administrado contribui para o “*pool*” (nível) endógeno de GAGs, principalmente de SC, e em menor extensão para sulfato de queratina e ácido hialurônico (Paroli *et al.*, 1991).

Uma outra propriedade do agregado PGI, é regular a função de citocinas e fatores de crescimento que ligam-se à sua proteína central (Bali *et al.*, 2001).

A ação de enzimas liberadas de leucócitos polimorfonucleares (ex: protease neutral, β -glicoronidase, e mieloperoxidase), foi inibida por GAGPS de modo dose-dependente (Todhunter & Lust, 1994).

A destruição da cartilagem em articulações osteoartríticas pode resultar da ação direta de metaloproteinases neutras extracelulares ativas (ex: estromelina e colagenase), ou enzimas lisossomais intracelulares (ácidas) nos PGI e colágeno. A estromelina degrada o agregado PGI (agrecano) da cartilagem, e a colagenase cliva o colágeno tripla hélice. Considera-se que os grupos sulfatos nos GAGPS (carregados negativamente) reajam com os resíduos aminoácidos em proteínas (carregados positivamente), incluindo as metaloproteinases neutras (Todhunter & Lust, 1994). Os GAGPS diminuem os efeitos degradativos de proteinases neutras e enzimas lisossomais na cartilagem articular *in vitro*.

Shen *et al.* (2002), observaram que o grau e as posições em anel da sulfatação oligossacarídea na molécula de SC, foram os maiores determinantes da atividade inibitória sobre as enzimas elastase, hialuronidase e lisozima. A diferença observada na afinidade de ligação de duas drogas polisulfatadas (entre elas o SC), em relação às três enzimas imobilizadas, sugere uma conexão conformacional, (em adição às interações de carga) entre os ésteres sulfato dos polissacarídeos e os aminoácidos catiônicos das enzimas.

A atividade de anafilotoxinas C3a e C5a, presentes em articulações osteoartríticas, foi inibida *in vitro* por GAGPS. A atividade hemolítica do complemento pode ser inibida por GAGPS em humanos e eqüinos (Todhunter & Lust, 1994).

Garnier *et al.* (2002), demonstraram “*in vitro*” que o tratamento de células NK (*natural killer*) com enzimas condroitinases resulta na redução substancial da secreção de interferon- γ , (IFN- γ) através da inibição da atividade da interleucina-12.

Sakai *et al.*(2002), demonstraram que o SC inibe a produção de IgE induzida por antígeno, através da indução da secreção de citocinas do tipo IFN- γ , IL-2 e IL-12, e essa característica sugere um uso potencial do SC, na prevenção de alergias mediadas por imunoglobulina E.

Devido ao fato de que o SC assim como a heparina pertence ao grupo de GAGs, algumas avaliações foram realizadas para verificar se o efeito da heparina também é observado com o uso de SC.

Existem alguns trabalhos envolvendo o uso do SC com os perfis hematológicos. O SC não modificou o tempo de coagulação em um trabalho de Pierre (1967). Foi relatada trombocitopenia em alguns pacientes humanos tratados com GAGPS (Wolf, 1983).

Segundo Mahaffey & Moore (1986), os GAGPS causam redução no hematócrito e na concentração de hemoglobina, quando administrados parenteralmente a equínos. Entretanto os GAGPS usados em equínos como agentes condroprotetores, não reduziram o hematócrito ou a concentração de hemoglobina. Essa aparente discrepância pode indicar que existem somente alguns mecanismos similares de ação entre heparina e outros GAGPS (McNamara *et al.*, 1996).

Woessner & Howell (1993), testaram GAGPS em cães na dosagem de 5 e 25 mg/kg IM, relatando aumento no tempo de tromboplastina parcial ativada, protrombina, no tempo da ativação da coagulação e hemorragia/sangramento.

Em um trabalho com cães da raça Beagle, McNamara *et al.*,(1996) testaram agentes condroprotetores para avaliar seus efeitos nos valores hematológicos (hematócrito, contagem de eritrócitos e leucócitos, concentração de hemoglobina, volume corpuscular médio e concentração corpuscular de hemoglobina), hemostáticos (tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada, determinação da agregação plaquetária, determinação do tempo de sangramento) e bioquímicos (glicose do soro, uréia, creatinina, albumina, globulina, fósforo, cálcio, sódio, potássio, cloro, CO₂ total, colesterol, lipase, fosfatase alcalina, alanina transaminase, aspartato transaminase, e valores totais de bilirrubina) em cães clinicamente normais, quando administrados oralmente por 30 dias. Nesse estudo, verificaram-se algumas alterações nas variáveis hematológicas e hemostáticas, entretanto nenhuma dessas alterações pode ser considerada fora do padrão laboratorial normal.

Para Shaw & Ihle (1999), seu uso pode estar associado a um aumento da tendência ao sangramento. Essa suspeita é reforçada pelo fato de que os GAGPS são estruturalmente similares a heparina.

Há crescente evidência de que os PGI, especialmente o SC, são componentes do conjunto da matriz extracelular durante os primeiros estágios da histogênese. Domowicz *et al.* (2000), demonstraram que durante a embriogênese do sistema nervoso central (SNC) da galinha, o SC é sintetizado pelos neurônios de todos os tipos celulares neuronais, com exceção dos astrócitos, sugerindo que mecanismos reguladores neuronais específicos controlem a expressão do SC.

Quanto ao efeito do SC no aparelho digestivo, foi realizado um teste, usando o modelo de alça para intestino isolado de coelho, não ocorreram mudanças na amplitude das contrações intestinais, ou na tonicidade do intestino, em presença de 1 a 3 mg/ml de SC (Pierre, 2001).

Em doses de 0,25 a 1 g/kg, não ocorreram mudanças na taxa de trânsito intestinal em camundongos. No sistema cardiovascular, o SC em doses de 25 a 100 mg/kg (taxa de perfusão de 25 mg/min), não teve efeito no eletrocardiograma, sendo que a dose de 100 mg/kg induz uma leve e transitória depressão da pressão arterial. Em qualquer dose, o SC causa um aumento na frequência respiratória e na sua amplitude. Com respeito à função renal, nenhuma mudança no volume ou concentração eletrolítica da urina foi encontrada após a administração de injeções subcutâneas de SC, em doses de 100 mg/kg (Pierre, 2001).

Mais especificamente em relação à cartilagem, existem estudos não validados que demonstram que o SC e a G ingeridos são incorporados na cartilagem articular do animal. O modelo de instabilidade do joelho em coelhos, que tem sido usado recentemente para demonstrar a eficácia do tratamento com o SC pode não representar a situação de OA crônica (Häuselmann, 2001).

O SC aplicado em coelhos tem demonstrado preservar as propriedades da cartilagem. Ele inibe a perda de cartilagem em lesões articulares induzidas por quimiopapaína em coelhos (Häuselmann, 2001).

Em uma pesquisa envolvendo a administração de GAGPS, em tecidos de cartilagem artrítica de equinos, Glade (1990) concluiu que os mesmos aceleram nova síntese de colágeno e GAGs pelos tecidos das cartilagens artríticas e pelos condrócitos em cultura de tecido, e que os tecidos artríticos foram mais sensíveis aos GAGs exógenos do que os tecidos não-artríticos (necessitaram menor quantidade de GAGPS para estimular a síntese). Ainda nesse estudo, o autor constatou que altas doses de GAGPS inibem o crescimento dos condrócitos (pré-requisito para regeneração tecidual).

Com base em estudos clínicos de eficácia e segurança, em humanos a dosagem de SC eficaz para reduzir a dor e melhorar o quadro patológico dos pacientes com OA, é de 800 a

1200 mg diariamente (aproximadamente 18 mg/kg), divididos em 2 a 4 tomadas (Reyes *et al.*, 2000).

Em cães a dosagem preconizada de um produto comercial à base de SC, é de 20 mg/kg, em uma administração diária, e não consta na bula qualquer referência de contra-indicações para seu uso.

3.8 Ensaios clínicos

Já foram realizados inúmeros ensaios clínicos em humanos e animais usando o SC, que apresentaram resultados favoráveis ao uso do SC, nos casos de doenças articulares, como terapia prolongada. Esses ensaios demonstram que o SC melhora a dor e a mobilidade da articulação.

Estudos recentes têm demonstrado que G e SC fornecem uma modesta a ampla melhora na dor e na função da articulação quando comparados com o placebo e são comparáveis aos AINES no quesito alívio da dor porém com menos efeitos adversos gastrointestinais (Häuselmann, 2001).

Duas publicações não científicas, “*The Arthritis Cure*” (A Cura da Artrite) e “*Maximizing the Arthritis Cure*” (Maximizando a Cura da Artrite), publicadas nos Estados Unidos em 1997, por Jason Theodasakis, mostraram ter influenciado uma importante decisão tomada pelo *Office of Alternative Medicine of the National Institutes of Health* (NIH), para finalmente serem desenvolvidos estudos independentes, maiores e mais bem desenhados do SC. Um ensaio randomizado controlado, de três anos de duração, comparando 4 diferentes tratamentos: SC, G, uma combinação de SC e G, e um inibidor da COX₂ (Celecoxib®) com placebo, patrocinado pelo NIH, ainda está em andamento (Häuselmann, 2001).

Reddy & Dhar (1991) investigaram o efeito de adjuvantes da artrite no metabolismo de GAGs em vários tecidos de ratos. O conteúdo total de GAGs foi encontrado aumentado em todas as amostras de tecido do rato artrítico comparado com o rato normal.

McAlindom *et al.* (1998), realizaram um estudo sobre ensaios clínicos duplo-cego com grupos placebo e controle. Os ensaios clínicos de glucosamina e condroitina mostraram benefícios substanciais no tratamento da OA, embora os autores concluíam que são necessários mais estudos para testar a eficácia dessas duas substâncias.

Leeb *et al.* (1998) avaliaram quatro ensaios randomizados duplo-cegos com grupo controle de placebo ou AINES e grupo tratado com SC. No total os ensaios incluíram 227 pacientes (humanos). Todas essas investigações revelaram que o SC foi no mínimo 50%

superior ao placebo com respeito a dor e o consumo de co-medicamentos, indicando que o SC pode ser uma ferramenta eficaz na terapêutica da OA. Interessantemente, os efeitos adversos ocorreram mais freqüentemente nos grupos placebo.

Em um trabalho de Oliviero (1991), 100 pacientes receberam 1,2 g/dia de SC oral durante seis meses. Várias articulações foram avaliadas e houve redução da dor e melhora evidente da mobilidade após duas semanas de tratamento. Não foram relatados efeitos colaterais.

Em um trabalho duplo-cego usando placebo como controle, 58 pessoas receberam 200 mg de SC, quatro vezes ao dia, oral, durante três meses; e 56 pessoas receberam placebo nas mesmas condições. As articulações avaliadas foram joelho e quadril. Houve melhora na dor articular no grupo tratado com SC (Mazieres *et al.*, 1992).

No trabalho randomizado duplo cego de Morreale *et al.* (1996), 74 pessoas receberam SC, 1,2 g/dia, oral, durante três meses e 172 pessoas receberam diclofenaco 150 mg/dia durante um mês. As articulações avaliadas foram os joelhos. O grupo diclofenaco mostrou redução rápida da dor articular (10 dias) com desaparecimento do efeito após interrupção do tratamento. O grupo SC mostrou melhora após 30 dias com duração superior a três meses após interrupção.

Em um trabalho de Fleish *et al.* (1997), duplo-cego com grupo controle placebo, 25 pessoas receberam 800 mg/dia de SC oral durante um ano e 22 pessoas receberam placebo nas mesmas condições. Os joelhos foram as articulações avaliadas. Como resultados, foram constatados melhora da dor articular, diminuição do inchaço e melhora da mobilidade articular. Além disso, o uso do acetaminofeno diminuiu mais no grupo SC do que no grupo placebo.

Em um tratamento realizado por Busci & Poor (1998), duplo-cego com grupo controle placebo, 40 pessoas receberam 800 mg/dia, oral, durante seis meses, 40 pessoas receberam o placebo nas mesmas condições. As articulações avaliadas foram os joelhos. Como resultado houve significativa melhora. Uso significativamente menor de acetaminofeno no grupo SC do que no grupo placebo.

Bourgeois *et al.* (1998), realizaram teste duplo-cego com grupo controle placebo. Nesse estudo 40 pacientes receberam 1,2 g/dia de SC oral, durante seis meses, o grupo controle com 44 pacientes recebeu placebo nas mesmas condições. A articulação avaliada foi a do joelho. O grupo SC teve redução significativa na dor articular espontânea (não observado no grupo controle).

Em um teste duplo-cego com grupo controle placebo e acompanhamento radiológico da progressão da recuperação, 42 pacientes receberam SC ou placebo. No grupo SC, a dosagem foi de 800 mg/dia, oral, durante um ano. O joelho foi a articulação avaliada. No grupo SC houve significativa redução da dor e aumento da mobilidade, também houve normalidade da bioquímica na articulação e osso. O espaço articular no grupo placebo diminuiu significativamente, mas não mudou no grupo SC, (Uebelhart *et al.*1998).

Verbruggen *et al.*(1998), estudaram a OA com acompanhamento radiológico da progressão da doença, contaram com 34 pacientes que tomaram 1,2 g/dia de SC oral durante três anos e 85 pacientes que receberam placebo nas mesmas condições. As articulações avaliadas foram as das mãos (interfalangeais). Nesse estudo houve significativa diminuição na erosão da cartilagem no grupo SC (8,8%) comparado ao placebo (29,4%).

Segundo o depoimento de Danao-Camara (2000), sobre mais de 200 pacientes com dor osteoartrítica que receberam uma combinação de glucosamina e condroitina, foram constatados entre esses pacientes: um caso de fotossensibilização, reproduzível com novo desafio; três casos de hipertensão sistólica reversível na ausência de hipertensão prévia e desacompanhados de sintomas ou anormalidades laboratoriais; quatro episódios de proteinúria; três pacientes com elevação dos níveis de creatina fosfoquinase, assintomática, reversível e em um caso não reincidiu com novo desafio. Embora não tenha certeza de que foram a glucosamina ou a condroitina que provocaram essas alterações, Danao-Camara sugere que essa possibilidade seja considerada nos próximos ensaios com esses agentes.

Girardi & Freitas (2001) realizaram uma pesquisa clínica com equinos, sobre o uso de SC, juntamente com tratamento padrão para artropatia séptica traumática. Nesse trabalho utilizaram além do SC: enrofloxacina e lavagem articular com solução fisiológica e nitrofurazona. O animal alvo desse estudo apresentava artropatia séptica traumática da articulação társica e claudicação do membro posterior direito, o tratamento resultou em melhora do quadro clínico. Os índices de uréia, creatinina, fosfatase alcalina, creatina fosfoquinase, alanina-aminotransferase e aspartato amino-transferase mantiveram-se dentro da normalidade.

Glade (1990), publicou que os GAGPS podem estimular a síntese da rede de colágeno e GAGs, em tecidos cartilagosos normais ou com artrite em equinos. Nos seus experimentos, os tecidos que sofreram de artrite foram os mais sensíveis ao estímulo induzido por GAGPS.

Em estudos com cães predispostos a displasia, os filhotes submetidos a tratamento com GAGPS cresceram com a mesma taxa daqueles tratados com solução salina (Lust *et al.*, 1992).

Segundo Todhunter & Lust (1994), os GAGPS são um adjuvante no tratamento de OA, mas não uma panacéia. Há evidência de que sejam benéficos na prevenção e tratamento de OA induzida experimentalmente em cães com displasia coxo-femural. Sugerem também, que são mais efetivos como prevenção do que como tratamento da OA avançada, e que inibem a ativação ou síntese de metaloproteinases responsáveis pela degradação da matriz articular na OA.

O Colégio Americano de Reumatologia (*American College of Rheumatology – ACR*) e a Associação Européia Contra o Reumatismo (*European League Against Rheumatism – EULAR*), têm publicado protocolos e recomendações para o tratamento da AO do quadril (ACR) e do joelho (ACR e EULAR), baseados na combinação de evidência corrente e opinião de especialistas.

3.9 Testes de teratogenicidade

Greeg em 1941 foi o primeiro a associar a morte, cegueira e surdez em recém nascidos com a prevalência da rubéola em mulheres gestantes. Foi a partir de 1956, ano em que a talidomida foi empregada para náuseas e vômitos durante a gestação, que começaram a surgir inúmeros casos de focomelia (um tipo de teratogenia). Em 1961, o mundo reconheceu que essa droga estava associada a malformações (do tipo focomelia) no feto. A talidomida antes de ser comercializada, foi testada em ratos, mas não era sabido que esta espécie é mais resistente aos efeitos teratogênicos da talidomida do que o homem. A partir dessa época os testes perinatais tornaram-se mais complexos, exigindo estudos multigeracionais, em no mínimo 3 espécies (uma delas não roedora), em 3 dosagens diferentes e em concentrações de 3 a 5 vezes maiores que a dose terapêutica (Spinosa *et al.*, 1999).

Outras drogas também podem ter efeitos diferentes de acordo com a espécie em que são testadas, ex: metotrexato, que é teratogênico no homem e pequenos roedores, mas não em macaco Rhesus (Wilson; Fradkin, 1969; Wilson, 1971).

Para citar outro exemplo da diferença entre espécies, a carbarila é teratogênica em cães, mas não em roedores, homem e macaco Rhesus (Smalley *et al.*, 1968; Robens, 1968; Weil *et al.*, 1972).

Essas diferenças entre espécies podem ser devido à farmacocinética das drogas nas diferentes espécies (Spinosa *et al.*, 1999).

Um medicamento pode ser considerado teratogênico (do grego, *teratos*=monstro), quando é capaz de aumentar a frequência de uma anormalidade funcional ou estrutural nos filhos de determinada espécie animal, quando administrada aos pais antes da concepção, ou à mãe durante um período crítico da gestação. Esse período crítico na gestação é chamado de organogênese, e a lesão no feto é denominada teratogênica (Spinosa *et al.*, 1999).

Um exemplo de medicamento que pode levar à teratogênese, são os anticoagulantes, como warfarina e a heparina, que causam problemas reprodutivos e teratogênese. Um terço dos fetos expostos a essas substâncias é abortado, nasce morto ou com anormalidades estruturais ou morfológicas (Spinosa *et al.*, 1999).

A vitamina D causa dano no desenvolvimento esquelético, principalmente em ossos longos e extremidades, pois ocorre deposição excessiva de cálcio. Alguns metais como o cádmio, arsênico, chumbo e mercúrio são capazes de levar a malformações, tanto estruturais como funcionais (Spinosa *et al.*, 1999).

Os agentes teratogênicos podem ter sua ação interferindo em mecanismos celulares, em dosagens que causam nenhuma ou mínima toxicidade materna (Spinosa *et al.*, 1999).

Efeitos farmacológicos adversos nas mães, como anorexia ou sedação, podem ter uma influência no desenvolvimento fetal (Frohberg, 1977). Por isso as mães são avaliadas nos estudos de toxicidade reprodutiva, ex: peso, consumo, peso dos órgãos, sinais clínicos de toxicidade, abortos e mortalidade (EPA, 1998).

Souza *et al.* (1997), sugerem que a toxicidade materna, como por exemplo, redução no ganho de peso na gestação, pode resultar em efeitos embriofetotóxicos. Esses efeitos refletem-se em 3 índices: mortalidade embrionária, retardo no crescimento pré-natal e malformações fetais. Ou seja, para esses autores, esses índices são dependentes da toxicidade materna e não necessariamente do potencial teratogênico da substância.

Além da toxicidade materna, é importante lembrar da interação materno-fetal, pois as alterações fisiológicas do sistema materno na prenhez propiciam um aumento na absorção e distribuição de medicamentos, redução na sua biotransformação e incremento na sua excreção (Spinosa *et al.*, 1999).

Segundo o FDA, os fármacos podem ser divididos em 5 categorias conforme o risco de teratogenicidade. São elas A, B, C, D e X. Nessa classificação, os fármacos do grupo A, são aqueles para os quais existem estudos controlados em gestantes, e que não demonstraram risco para o feto no primeiro trimestre, não existe evidência de riscos em trimestres

posteriores e a possibilidade de lesão fetal parece remota. Alguns exemplos: ácido fólico, vitaminas A e D em baixas doses, e tiroxina.

No grupo B estão os fármacos que, testados em animais, não demonstraram risco de malformação, mas não existem estudos controlados em mulheres gestantes. Geralmente se aceita o uso de medicamentos dessa categoria durante a gestação.

No grupo C, os medicamentos demonstraram ocasionais malformações, mas estudos controlados em gestantes não detectaram casos. Não se dispõe de estudos em animais nem em mulheres, e não se pode descartar o risco de teratogenia. Seu uso deve restringir-se a situações em que não existe outro fármaco mais seguro.

O grupo D é representado pelos fármacos que tem demonstrado originar malformações em animais, mas não em estudos controlados em mulheres gestantes. São aqueles em que existe risco fetal em mulheres gestantes, mas o benefício pode superar o risco esperado. São aqueles usados em determinadas patologias maternas, em que o risco da doença causar efeitos adversos no feto é superior ao risco teratogênico do medicamento (ex: fármacos utilizados no controle da epilepsia, asma, diabetes, doença da tireóide).

No grupo X, os fármacos demonstraram efeitos teratogênicos em estudos com animais e em mulheres gestantes, e seu risco supera um possível benefício. São absolutamente contraindicados durante a gestação. Como exemplo dessa categoria estão, os anticoncepcionais orais, dietilestilbestrol, ergotamina, medroxiprogesterona, oxitocina, ribavirina, talidomida, estradiol, estrógenos conjugados, testosterona, vitamina A em doses altas (www.fisterra.com/guias2/medicamentos/embarazo.htm acessado em 06/03).

Recentemente, o Instituto Internacional de Ciência da Vida – Fundação de Nutrição, foi convocado para discutir os critérios para listagem de substâncias que possam ser toxicantes desenvolvimentais, sob as condições do “*California’s Safe Drinking Water and Toxic Enforcement Act*” (Ato de Obrigação da Califórnia para Segurança da Água Potável e Tóxicos) de 1986. Tais critérios são muito difíceis para estabelecer, mas eles devem enfatizar relevância humana e biológica. Igualmente, a Comunidade Européia tem classificado os químicos de acordo com sua toxicidade reprodutiva (Thomas, 1989).

Segundo Thomas (1989), o FDA – Agência de Alimentação, recomenda protocolos de teste em estudos reprodutivos de duas gerações, incluindo fase de teratologia, para aditivos e corantes de alimentos.

Para o FDA autorizar o uso de um fármaco, ele deve passar pelos testes exigidos por esse órgão. Conforme o FDA, os estudos em reprodução utilizando animais de laboratório, compreendem 3 etapas, que são chamadas de segmentos I, II, III (Thomas, 1989).

No segmento I são avaliados os efeitos sobre a fertilidade de machos e fêmeas, e performance reprodutiva geral. Compreende o tratamento dos animais, machos e fêmeas, durante um período mínimo antes do acasalamento, de 70 dias para machos e 14 dias para fêmeas. Os tratamentos ainda são realizados durante todo o período de acasalamento para machos e fêmeas, e depois para as fêmeas durante a gestação e lactação. As fêmeas de cada grupo são divididas em dois subgrupos, um subgrupo é sacrificado imediatamente antes do último dia de gestação. No outro subgrupo é permitido aos filhotes nascerem para avaliar seu desenvolvimento. Os fetos do primeiro subgrupo são avaliados conforme o estudo do segmento II (Neubert *et al.*,1996).

No segmento II, é avaliado o potencial do fármaco para causar teratogenicidade. Nesse segmento são usadas fêmeas prenhes, que no caso das ratas são tratadas do 6º ao 15º dia da prenhez, período em que ocorre a organogênese. Todas as ratas são sacrificadas no 21º dia de prenhez para histerectomia e retirada dos órgãos e fetos. Metade das ninhadas são utilizadas para avaliação das vísceras, a outra metade é processada para avaliação de malformações esqueléticas (Neubert *et al.*,1996).

No segmento III faz-se um estudo peri e pós-natal. O fármaco é administrado durante o período de desenvolvimento fetal até o desmame. É avaliado nesse segmento, o desenvolvimento somático, neuromotor, sensorial e comportamental da prole. Todos os filhotes são examinados no mínimo uma vez ao dia para sinais de comportamento e aparência (abertura de olhos, descolamento de orelhas, etc.) anormal. As ninhadas são pesadas e a taxa de mortalidade é anotada todos os dias. Também é feito um teste de fertilidade desses filhotes (Neubert *et al.*,1996).

Dentro do segmento II, existem algumas diferenças nas recomendações para os testes de teratogenicidade. Geralmente a substância testada é administrada continuamente durante a organogênese, ou seja, do 6º ao 15º dia de prenhez em ratas. Mas segundo a EPA (*Environmental Protection Agency* ou Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, 1998), a droga deve ser administrada do dia da implantação até o 21º dia da gestação, que corresponde ao último dia da gestação, ou ainda, do dia da fertilização até o 21º dia da gestação (Neubert *et al.*, 1996).

A EPA desenvolveu um roteiro para testes de pesticidas e substâncias tóxicas, chamado OPPTS (*Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances*), a fim de harmonizar os protocolos de testes requeridos pelo *Office of Pollution Prevention and Toxics* (OPPT) presente no *Code of Federal Regulations* (CFR ou Código de Regulamentos Federais), o *Office of Pesticide Programs* (OPP), presente em publicações do *National*

Technical Information Service (NTIS), e os protocolos publicados pela *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) (EPA, 1998).

O propósito da harmonização desses testes em um único protocolo do OPPTS, é minimizar as variações entre os procedimentos exigidos pela EPA (EPA, 1998). O estudo de toxicidade pré-natal é conhecido como OPPTS 870.3700. Esse protocolo pretende avaliar os efeitos da exposição de animais prenhes a um medicamento, no desenvolvimento dos fetos. Como resultado pode haver morte, anormalidades estruturais ou crescimento alterado dos fetos. Os efeitos maternos também são avaliados (EPA, 1998).

Segundo o OPPTS 870.3700, a substância deve ser administrada a animais prenhes, do dia da implantação a um dia antes do dia esperado para o parto. No último dia útil as fêmeas são sacrificadas, os conteúdos uterinos examinados e os fetos processados para a avaliação visceral e esquelética (EPA, 1998).

Essas exigências, assim como as demais são similares àquelas apresentadas por Neubert *et al.* (1996). Em geral, os testes da EPA são menos dispendiosos e de menor duração do que aqueles requeridos pelo FDA. Os testes do FDA (segmentos I a III), são melhores para avaliar a toxicidade reprodutiva, e nenhuma dessas baterias pode substituir outra (Thomas, 1989).

Tanto a EPA como a FDA preferem o rato como espécie roedora, embora sejam exigidas 3 espécies animais, para liberação de medicamentos, sendo que uma delas deve ser não roedora. O rato de laboratório (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) é de fácil manutenção e observação, é possível usar um grande número de indivíduos, tem ciclo vital curto, alta prolificidade, padronização genética e do ambiente de laboratório (COBEA, 1996).

O tamanho médio das ninhadas é variável, mas mantendo uma média de 10 a 12 filhotes (Amann, 1982).

O peso médio dos filhotes está relacionado com o número de filhotes por ninhada (COBEA, 1996).

A gestação da rata pode durar de 20 a 23 dias, sendo mais comum 21 dias (COBEA, 1996). Segundo Bernardi (1999), na rata a gestação é dividida em:

- a) Implantação: 5º ao 6º dias;
- b) Organogênese: do 6º ao 15º dia;
- c) Desenvolvimento fetal: do 15º dia ao 21º.

O período de organogênese é marcado por uma seqüência de acontecimentos, que vão desde a proliferação, diferenciação e migração celular até a organogênese propriamente dita, ou seja, a formação de órgãos rudimentares. Os medicamentos administrados nessa fase da

gestação podem levar à teratogênese ou até mesmo causar embriofetalidade (Spinosa *et al.*, 1999).

É importante lembrar que cada sistema em formação tem seu próprio período crítico, ou suscetível, e quanto maior for esse período, mais suscetível esse sistema será. Por isso, nos testes de teratogênese são sempre estudadas as possíveis anomalias ósseas dos animais, pois o período de organogênese do esqueleto é bastante longo (Spinosa *et al.*, 1999).

O grau de lesão depende da correlação dose-resposta e do período de exposição, ou seja, se foi no período crítico, e quanto tempo foi. O perfil toxicocinético também pode ser determinante no tamanho da lesão (Spinosa *et al.*, 1999).

O tamanho da ninhada é afetado pelo número de oócitos disponíveis para fertilização, taxa de implantação e a proporção de embriões implantados que sobrevivem até o parto. O tamanho da ninhada deve incluir o número de fetos vivos e mortos (EPA, 1998).

A interação materno-fetal é muito importante, influenciando diretamente esses índices, pois os fetos estão expostos de uma forma conjunta com a mãe, às substâncias nocivas. E a interação materno-fetal pode ser influenciada, por exemplo, pelo tipo de placentação (Spinosa *et al.*, 1999).

As funções básicas da placenta são: transporte de alimentos, metabolização de substâncias endógenas e biotransformação de substâncias exógenas, atividade endócrina, manutenção da gestação, isolamento do feto/embrião do organismo materno para evitar rejeição, e proteção. Como barreira entende-se que ela tem as propriedades de uma barreira lipídica normal e, portanto, substâncias apolares atravessam facilmente e as polares não. Também possui sistemas de transporte ativo e difusão facilitada similares aos de outras barreiras celulares, o que possibilita que os medicamentos que atuam por esses mecanismos também penetrem a placenta. A função metabólica da placenta é consideravelmente menor do que a hepática, não tendo grande importância na detoxificação de medicamentos (Spinosa *et al.*, 1999).

A placenta da rata é do tipo hemoendotelial (ou hemocorial), esse tipo também é encontrado em primatas e outros roedores, nela o sangue materno entra em íntimo contato com o sangue fetal, sendo mais freqüente a passagem de medicamentos da mãe para o feto por esse tipo de placenta (Spinosa *et al.*, 1999).

Geralmente ela é impermeável a fármacos com peso molecular de 1000 Daltons (Da) ou mais. Muitos fármacos têm peso molecular de 500 Da ou menos. Portanto, o tamanho molecular raramente é um fator que impede a droga de atravessar a placenta e ir até o embrião/feto. A permeabilidade da placenta a um fármaco é afetada pelas suas características,

incluindo grossura/espessura, área de superfície, sistemas carregadores e concentração lipídica-proteica das membranas (Thomas, 1989).

As características inerentes da droga, tais como seu grau de ionização, solubilidade lipídica, habilidade de ligar-se a proteínas e peso molecular também afetam seu transporte através da placenta (Thomas, 1989). Em relação à polaridade das substâncias, as lipossolúveis e apolares atravessam mais facilmente a placenta (Bernardi, 1999). No geral, as partículas menores têm maior solubilidade, aumentando a absorção e a toxicidade de forma direta (Anderson & Coninng, 1993).

A via de administração deve ser de preferência a mesma usada para a forma farmacêutica que se está usando. A substância deve ser diluída em veículo geralmente aquoso (WHO, 1993).

Quanto às doses, segundo o protocolo EPA (1998), no mínimo 3 doses e um grupo controle devem ser usados. Os níveis das doses devem ser espaçados para que se possa produzir uma graduação dos efeitos tóxicos. A não ser que esteja limitada pela natureza física/química ou propriedade biológica da dose teste, a maior dosagem deve ser aquela com objetivo de induzir alguma toxicidade materna, mas não morte ou sofrimento severo. No caso de mortalidade maternal, não deve ser maior que 10%. As dosagens intermediárias devem produzir mínimos efeitos tóxicos observáveis. A menor dosagem não deve produzir qualquer evidência de toxicidade materna ou no desenvolvimento (ou seja, o nível *no-observed-adverse-effects* ou NOAEL). O intervalo entre as doses não deve ser maior do que 2 ou 4, mas se for necessário usar um intervalo com um fator maior que 10 entre as dosagens, é preferível adicionar mais um quarto grupo teste (EPA, 1998).

Segundo Larini (1997), 3 diferentes doses são administradas aos animais. A menor dose é estabelecida como sendo aquela considerada de exposição ao homem ou de uso terapêutico no caso de medicamentos. A maior dose é estabelecida em função da toxicidade do composto para as fêmeas. A terceira dose é a intermediária entre as citadas.

Segundo Neubert *et al.* (1996), devem ser formados quatro grupos, três deles devem receber a substância de interesse e o outro deve constituir o grupo controle.

Os fetos devem ser avaliados no dia do sacrifício das mães, ao serem retirados do útero. Primeiramente em vivos e mortos (através da presença de movimentos após estimulação), depois sua coloração geral e ausência de maceração. Um relato da posição intrauterina dos fetos machos e fêmeas, mortos e vivos, e dos sítios de reabsorção devem ser feitos. Os corpos lúteos nos ovários também devem ser contados. Os fetos são enxugados e pesados, então são examinados para anormalidades externamente visíveis. Após esse passo

são numerados conforme a posição no útero (do corno direito para o esquerdo) e fixados. Um terço dos fetos deve ser fixado em álcool 95% para subsequente clareamento e exame do esqueleto (Neubert *et al.*, 1996).

No segmento II, para Larini (1997), ao final da gestação as fêmeas são sacrificadas, e os fetos são retirados por histerectomia. Os registros do protocolo compreendem o sexo e o peso dos fetos, o peso da placenta, os pontos de reabsorção, a contagem de corpos lúteos e a ocorrência de mortalidade precoce ou tardia de embriões e fetos. Todos os fetos são examinados através de estereomicroscópio para identificação de anomalias externas. As alterações ósseas são identificadas pela análise do esqueleto dos filhotes, por diafanização e coloração com alizarina ou por radiografias.

É evidente que um número de testes estão disponíveis para avaliar o grau de alteração no sistema reprodutivo induzido por produtos farmacêuticos, substâncias químicas e aditivos alimentares. Alguns desses testes utilizam muitos animais e seguem por mais de uma geração, enquanto outros utilizam outros sistemas que podem ser feitos, como modelos de nível molecular para determinar o mecanismo da ação toxicológica (Thomas, 1989).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram usados ratos albinos Wistar, 30 machos e 80 fêmeas no total. Os animais estavam com idade de 120 dias no início do experimento. Todos eram provenientes do Centro de Criação e Experimentação de Animais de Laboratório da UFRGS (CREAL). Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), em condições constantes de umidade, temperatura ($21^{\circ}\text{C} \pm 2$) e ciclo de luz de 12 horas de claro e escuro (luz 9:00-21:00), recebendo dieta padronizada (Nuvilab CR 1, da Nuvital, Colombo/PR) e água *ad libitum* durante o experimento. Todos os animais foram adaptados a essas condições, durante 14 dias antes de iniciar o experimento.

4.2 Fármaco

Foi utilizado o medicamento Artroglycan[®], na sua apresentação oral, em comprimidos, produzido pelo Laboratório Syntex S.A. (Argentina), adquirido do distribuidor no Brasil, Tecnopec Consultoria Comercial e Representação Ltda.

Cada comprimido contém:

Sulfato de condroitina: 200 mg

Excipiente q.s.p.: 930 mg

Partida: 0107

Fabricação: 05/01

Validade: 2 anos após a data de fabricação

Licenciado pelo Ministério da Agricultura sob nº 6391 em 29/05/98.

4.3 Procedimentos de acasalamento

Os machos foram alojados individualmente em caixas plásticas (40x33x16,5 cm), com cama de maravalha. As fêmeas foram alojadas em grupos de 6 em caixas plásticas (40x33x16,5 cm) com cama de maravalha. Nos dias de acasalamento, nas últimas 2 horas de escuro, foram introduzidas a cada caixa de macho, três fêmeas virgens, que permaneceram por um período de 2 h por dia (7:00-9:00). Após esse período, procedeu-se a separação das fêmeas e foi realizado o procedimento de lavado vaginal para determinar a presença ou não de espermatozoides no lavado vaginal. O dia “um” de gestação foi considerado 24 horas após a constatação da lavado vaginal positivo (presença de espermatozoides). O lavado foi realizado com auxílio de pipeta, ponteira, água destilada, lâmina de vidro e microscópio (aumento de 40 vezes).

O procedimento de acasalamento foi repetido até que se obteve o número de 13 a 14 fêmeas prenhes para cada grupo. As fêmeas prenhes foram colocadas individualmente em caixas plásticas, com maravalha, medindo (29,5x18,8x15 cm). A ração e a água foram pesados e renovados todos os dias (para controle do consumo diário de ração e água, até o dia da histerectomia), esse procedimento era realizado pela manhã, após pesagem das fêmeas e tratamento.

4.4 Tratamento

O fármaco foi triturado e diluído em água destilada, com auxílio de ultra-som, de forma que as diferentes concentrações pudessem ser administradas em volume de 10 ml/kg.

As fêmeas foram tratadas do 6^o ao 15^o dia de gestação, por *gavagem* com auxílio de sonda oro-gástrica. Os animais do grupo I receberam dosagem de 200 mg.kg⁻¹ (diluição de 200 mg de sulfato de condroitina em 10 ml de água destilada), os animais do grupo II receberam dosagem de 400 mg.kg⁻¹ (diluição de 400 mg de sulfato de condroitina em 10 ml de água destilada) e os animais do grupo III dosagem de 600 mg.kg⁻¹ (diluição de 600 mg do sulfato de condroitina em 10 ml de água destilada). O grupo controle recebeu água destilada em volume idêntico aos demais grupos e mesma via.

O tratamento foi realizado sempre na parte da manhã.

4.5 Variáveis avaliadas nas fêmeas durante a gestação

Todas as fêmeas foram avaliadas quanto ao consumo diário de ração e água, desenvolvimento ponderal (ganho de massa corporal), mortalidade e sinais de toxicidade (alteração dos parâmetros fisiológicos).

4.6 Avaliação dos fetos e órgãos das fêmeas

No 21^o dia de gestação, as fêmeas foram mortas por decapitação. Após procedimento de histerectomia, o útero gravídico foi pesado com o seu conteúdo, os ovários e ovidutos foram pesados separadamente. O número de corpos lúteos foi anotado. Depois de aberto o útero, foram contados os implantes uterinos, as reabsorções (se existente), os fetos mortos e vivos. Todos os fetos foram secados, pesados, marcados e sexados individualmente, conforme sua ordem no útero (da direita para esquerda), nesse momento foram observados se havia presença de malformações macroscópicas e sua vitalidade. Os fetos foram fixados (por ninhada) em solução de formalina 10% tamponada.

Os fetos foram analisados tanto para malformações macroscópicas, quanto para anormalidades do esqueleto, após serem processados pela técnica da coloração com alizarina como descrito por Taylor e Van Dike (1985).

4.7 Método de coloração

4.7.1 Coloração de alizarina

A técnica de coloração usada nesse experimento foi a coloração com solução de vermelho alizarina, de acordo com o protocolo de Taylor & Van Dike modificado (Taylor; Van Dike, 1985). Essa técnica permite corar os ossos em vermelho, deixando a musculatura translúcida. Esse método foi desenvolvido para ser aplicado a todas as espécies de vertebrados. Entretanto existem limitações, porque o tecido de embriões e adultos difere

marcantemente. A técnica produz resultados melhores quando aplicada em amostras pequenas e jovens. Certas membranas, pele e tecido conectivo fibroso formam barreiras ao redor de algumas estruturas ósseas e cartilaginosas em adultos ou vertebrados de sangue quente, o que dificulta a coloração. Já em recém-nascidos essas estruturas são facilmente coradas. O excesso de acidez na fixação pode desmineralizar os tecidos, algumas vezes não corando as estruturas ósseas com o vermelho alizarina. Possivelmente a fixação de amostras em formaldeído é melhor em pH neutro, como 6,5 e 7,2. A descrição da técnica modificada está a seguir.

O vermelho de alizarina liga-se à estruturas de cálcio em pH médio, alcalino (Gavaia *et al.*, 1999).

Técnica de coloração com vermelho de alizarina:

- 1- Fixação dos fetos em solução de formalina 10% tamponada (mínimo de 7 dias) em recipiente de vidro. Agitações eventuais no primeiro dia.
- 2- Para desidratação, descarta-se a solução de formalina. Coloca-se as ninhadas em cuba de vidro, com divisão individual de inox vazada, fechada com tampa de vidro transparente ou recipientes de plástico com divisórias individuais e com tampa de plástico. Colocam-se as soluções de 50 e 70 % de álcool, e depois a solução de álcool absoluto. As diferentes concentrações de soluções devem ser preparadas com álcool absoluto e água destilada. Os fetos ficam em cada solução por 24-48 horas ou mais dependendo do tamanho da amostra.
- 3- Abertura da cavidade abdominal dos fetos, próximo à cartilagem xifóide, com auxílio de uma lâmina de bisturi, através dessa abertura são removidas as vísceras das cavidades torácica e abdominal. É retirada uma pequena camada de tecido adiposo, localizada sobre a região dorsal das vértebras cervicais. Os fetos são colocados mais 1 a 2 dias no álcool absoluto, para melhor desidratação.
- 4- Os fetos são colocados em solução de hidróxido de potássio 1,5% (1000 ml de água destilada, 15 g de KOH), ou solução tamponada (300 ml de solução saturada de Bórax, 700 ml de água destilada), para neutralizar o pH ácido. Os fetos são deixados por 1 a 2 dias e a solução é renovada após o primeiro dia.

- 5- Colocam-se os fetos em solução digestiva (ou solução clarificadora) até o músculo ficar transparente. Solução digestiva: solução tamponada (7 partes de água destilada, 3 partes de solução saturada de Bórax) adicionada de tripsina (1 g por litro). A temperatura da solução foi elevada até 37°C aproximadamente, utilizando-se uma estufa, no mínimo uma vez ao dia. A solução foi trocada por uma nova sempre que apresentou turbidez, o que levava de 2 a 5 dias. Os fetos permanecem nessa solução, até que somente um décimo a um quarto do tecido muscular continue reconhecível, o que permite a visualização da calota craniana e das demais estruturas ósseas do corpo.

- 6- Os fetos são transferidos para uma solução aquosa de hidróxido de potássio 1,5% já com adição de uma pitada de alizarina (a alizarina deve ser colocada, até que a solução fique com uma coloração roxa com mínima transparência). Nessa solução os fetos permanecem por 24 horas, ou até que os ossos estejam adequadamente corados. Quando os músculos ficam muito corados, o passo 5 deve ser repetido, para clarear a musculatura deixando somente os ossos corados.

- 7- Para armazenagem dos fetos corados, é realizada a série de glicerina, em que os fetos permanecem 2 dias em cada concentração. A glicerina é diluída com solução aquosa de hidróxido de potássio 1% (1000 ml água destilada, 1 g de KOH), nas seguintes concentrações:
 - a) 40% de glicerina (400 ml de glicerina e 600 ml de solução de KOH 1%)
 - b) 70% de glicerina (700 ml de glicerina e 300 ml de solução de KOH 1%)
 - c) 100% de glicerina.

Após esses passos, os fetos foram avaliados.

4.8 Diagnóstico das alterações ósseas

Para avaliar a estrutura esquelética dos fetos, utilizou-se uma lupa com aumento de 0,7 a 4 vezes.

A avaliação dos fetos diafanizados, como são chamados os fetos processados pela técnica de coloração com vermelho alizarina, foi realizada seguindo-se o Atlas de Anomalias Externas e Esqueléticas em Ratos, produzido pelo Instituto de Farmacologia e Toxicologia Clínica da *Freie Universität Berlin* (Chahoud & Faqi, 1997). A classificação das anomalias segue o Segundo Workshop de Terminologia em Toxicologia Desenvolvemental ocorrido em Berlin em agosto de 1998 (Chahoud *et al.*, 1999) e o Terceiro Workshop de Terminologia em Toxicologia Desenvolvemental ocorrido em setembro de 2000 em Berlin (Solecki, 2001).

Os fetos foram armazenados novamente, após avaliação, em frascos com glicerina 100%.

4.9 Taxas avaliadas

- **Taxa de teratogenia**

Calculada através do quociente entre o número total dos filhotes com malformações e o número total de filhotes multiplicado por cem.

$$\left[\frac{\text{N}^\circ \text{ de filhotes com malformações}}{\text{N}^\circ \text{ total de filhotes}} \times 100 \right]$$

- **Taxa de perdas pós-implantação**

Calculada através do número de sítios de implantação menos o número de fetos nascidos, dividido pelo número total de sítios de implantação, multiplicado por cem.

$$\left[\frac{\text{N}^\circ \text{ de sítios de implantação} - \text{N}^\circ \text{ de fetos aos 21 dias de gestação}}{\text{N}^\circ \text{ de sítios de implantação}} \times 100 \right]$$

4.10 Variáveis avaliadas

- ❖ **Fêmeas:**

- Massa corporal diária (g), durante a gestação;
- Consumo diário de ração (g) durante a gestação;

- Consumo diário de água (ml) durante a gestação;
- Peso relativo dos órgãos (%), ao final da gestação (fígado, rins, baço, coração, ovários, ovidutos e útero);
- Sinais de aborto;
- Número de implantes uterinos;
- Número de corpos lúteos;
- Sinais de toxicidade sistêmica como perda de peso progressiva e redução da ingestão de água e ração;
- Taxa de perda pós-implantação.

❖ **Filhotes:**

- Alterações macroscópicas externas em todos os filhotes;
- Número de filhotes por ninhada;
- Número de machos e de fêmeas;
- Número de filhotes vivos;
- Número de filhotes mortos;
- Peso individual dos filhotes;
- Percentual e tipo de alterações ósseas nos fetos corados;
- Taxa de teratogenia;

4.11 Análise estatística

Os dados foram avaliados estatisticamente utilizando-se a análise de variância (ANOVA). As diferenças foram consideradas significativas, com confiança de 95% ($p < 0,05$).

As variáveis quantitativas referentes à influência das diferentes doses do SC, sobre o desenvolvimento ponderal dos animais de cada grupo, consumo de água e de ração, massa relativa dos órgãos das fêmeas, e ainda, as variáveis reprodutivas referentes às fêmeas foram comparadas através da análise de variância (ANOVA).

As variáveis qualitativas referentes ao percentual de malformações dos fetos foram calculadas através do teste do Qui-quadrado.

O programa utilizado para efetuar essas análises foi o EXCEL (Lapponi, 2000).

5. RESULTADOS

5.1 Desenvolvimento ponderal das ratas durante a gestação

A Figura 1 mostra o ganho relativo de massa corporal (1º dia = 100%) durante os 21 dias de gestação, calculado a partir da mensuração diária da massa corporal (g) das ratas tratadas, por via oral, com o SC em 3 diferentes dosagens e o grupo controle tratado com água destilada 10 ml/kg. Verifica-se que todos os grupos apresentaram um desenvolvimento ponderal e um ganho relativo de massa corporal semelhante durante esse período sem diferença estatisticamente significativa. Análise de variância $p = 0,968$. O ganho relativo médio dos grupos foi de 41,1%.

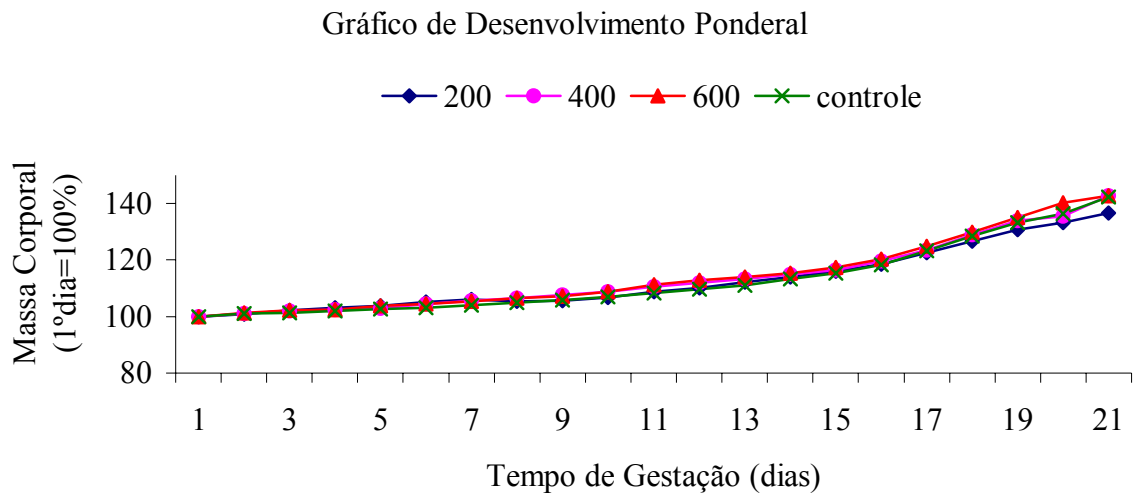


FIGURA 1. Desenvolvimento ponderal das ratas (1º dia = 100%) durante os 21 dias de gestação. As ratas foram tratadas com SC, do 6º ao 15º dia da gestação, nas dosagens 200 mg/kg (n=13), 400 mg/kg (n=14), 600 mg/kg (n=14) e um grupo controle (n=14) tratado com água destilada (10 ml/kg). Os valores representam a média dos animais por grupo (Porto Alegre/RS, 06/03).

5.2 Consumo de ração das ratas durante a gestação

A Figura 2 mostra o consumo de ração em relação à massa corporal (%), avaliado durante os 21 dias de gestação. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de ração (g), relacionado à massa corporal diária (g), de ratas tratadas com SC e as ratas do grupo controle, por via oral. Verifica-se que tanto as ratas tratadas com o SC, quanto às ratas do grupo controle, apresentaram um consumo relativo de ração (%) semelhante, apesar das variações características da fase gestacional. Análise de variância $p = 0,895$.

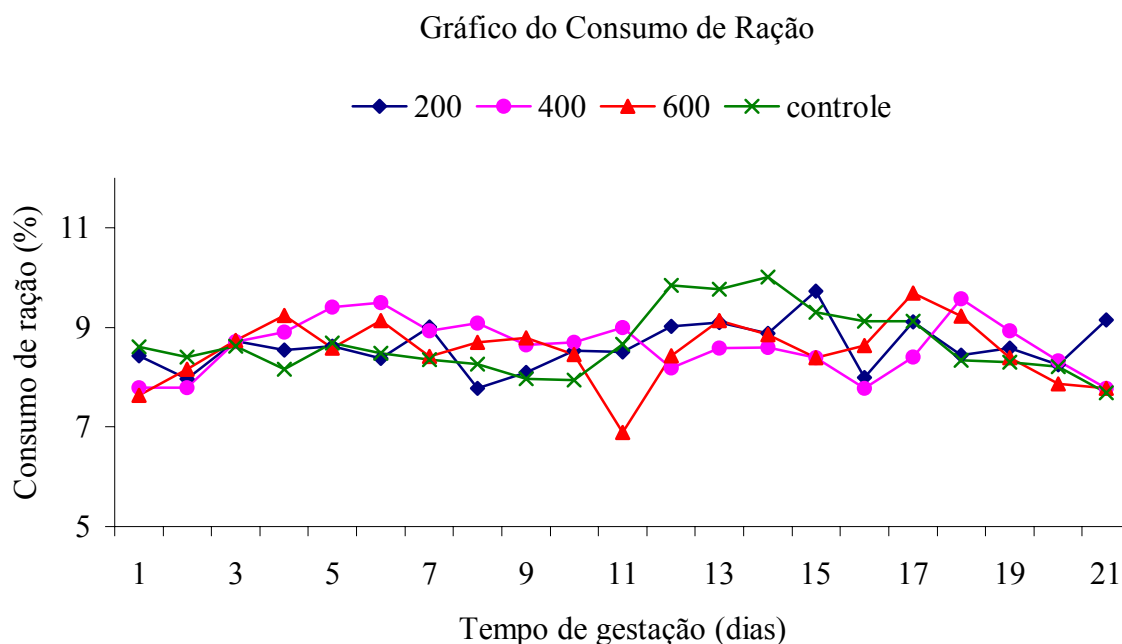


FIGURA 2. Consumo percentual de ração (%) em relação à massa corporal durante os 21 dias de gestação. As ratas foram tratadas com SC, do 6º ao 15º dia da gestação, nas dosagens 200 mg/kg (n=13), 400 mg/kg (n=14), 600 mg/kg (n=14) e um grupo controle (n=14) tratado com água destilada (10 ml/kg). Os valores apresentam a média dos animais por grupo (Porto Alegre/RS, 06/03).

5.3 Consumo de água das ratas durante a gestação

A Figura 3 mostra o consumo de água em relação à massa corporal (%), avaliado durante os 21 dias de gestação. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de água (ml), relacionado à massa corporal diária (g), de ratas dos grupos SC e controle, tratadas por

via oral. Verifica-se que tanto as ratas tratadas com SC, quanto as ratas do grupo controle, apresentaram um consumo relativo de água (%) semelhante, apesar das variações existentes na gestação. Análise de variância $p = 0,310$.

Gráfico do Consumo de Água

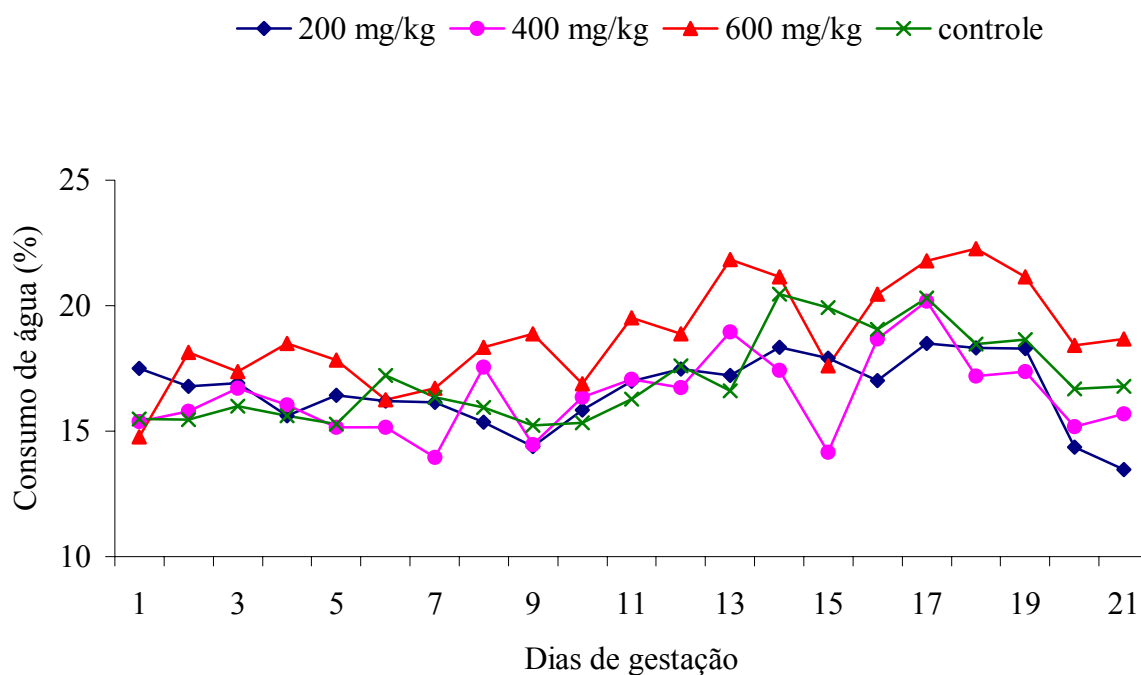


FIGURA 3. Consumo percentual de água (%) em relação à massa corporal durante os 21 dias de gestação. As ratas foram tratadas com SC, do 6º ao 15º dia da gestação, nas dosagens 200 mg/kg (n=13), 400 mg/kg (n=14), 600 mg/kg (n=14) e um grupo controle (n=14) tratado com água destilada (10 ml/kg). Os valores representam a média dos animais por grupo (Porto Alegre/RS, 06/03).

5.4 Massa relativa dos órgãos das fêmeas ao final da gestação

A Tabela 1 apresenta a massa relativa dos órgãos das fêmeas tratadas com SC nas doses 200, 400, 600 mg/kg e grupo controle que recebeu água destilada (10 ml/kg), durante a gestação (fase de embriogênese). Observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos, com relação à massa relativa dos órgãos sexuais, coração, baço, fígado e rins. A análise de variância calculada foi: coração $p = 0,707$; fígado $p = 0,160$; baço $p = 0,055$; rim direito $p = 0,407$; rim esquerdo $p = 0,789$; ovário direito $p = 0,072$; ovário esquerdo $p = 0,761$; útero $p = 0,152$.

TABELA 1. Massa relativa dos órgãos (%) das fêmeas tratadas com SC. As ratas foram tratadas do 6° ao 15° dia da gestação, nas dosagens 200 mg/kg (n=13), 400 mg/kg (n=14), 600 mg/kg (n=14) e um grupo controle (n=14) tratado com água destilada (10 ml/kg). São apresentados os valores médios e \pm epm (Porto Alegre/RS, 06/03).

Órgãos	Controle (N=14)	200 mg/kg (N=13)	400 mg/kg (N=14)	600 mg/kg (N=14)
Coração	0,33 \pm 0,009	0,34 \pm 0,01	0,35 \pm 0,005	0,34 \pm 0,01
Baço	0,21 \pm 0,008	0,22 \pm 0,01	0,27 \pm 0,02	0,25 \pm 0,01
Fígado	4,35 \pm 0,06	4,54 \pm 0,13	4,64 \pm 0,11	4,34 \pm 0,11
Rim Direito	0,30 \pm 0,009	0,33 \pm 0,02	0,30 \pm 0,007	0,29 \pm 0,003
Rim Esquerdo	0,30 \pm 0,009	0,30 \pm 0,01	0,30 \pm 0,009	0,29 \pm 0,004
Ovário Direito	0,017 \pm 0,001	0,017 \pm 0,001	0,019 \pm 0,001	0,022 \pm 0,001
Ovário Esquerdo	0,017 \pm 0,001	0,018 \pm 0,001	0,016 \pm 0,001	0,017 \pm 0,001
Útero	1,32 \pm 0,06	1,32 \pm 0,10	1,50 \pm 0,06	1,48 \pm 0,05

5.5 Variáveis reprodutivas das ratas

A Tabela 2 apresenta as variáveis reprodutivas referentes às ratas tratadas por via oral com SC nas doses de 200, 400 e 600 mg/kg e grupo controle que recebeu água destilada (10 ml/kg). Verifica-se que não houve diferença significativamente estatística ($p < 0,05$) entre os grupos com relação às variáveis avaliadas. A análise de variância para massa do útero grávido teve $p = 0,093$; a média da massa do útero foi de 3,696. Análise de variância para número de fetos por ninhada, $p = 0,430$; a média do número de fetos por ninhada foi de 10,44. Análise de variância da massa corporal dos fetos teve $p = 0,586$ e a média foi de 4,789. Análise de variância das alterações macroscópicas externas dos fetos teve $p = 0,928$ e média de 1,75. A taxa de perdas pós-implantação não teve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos grupos tratados e controle. Análise de variância $p = 0,514$.

TABELA 2. Variáveis reprodutivas das ratas tratadas com SC. As ratas foram tratadas com SC, do 6º ao 15º dia da gestação, nas dosagens 200 mg/kg (n=13), 400 mg/kg (n=14), 600 mg/kg (n=14) e um grupo controle (n=14) tratado com água destilada (10 ml/kg). São apresentados os valores médios das observações indicadas (\pm epm) e as taxas de perdas pós-implantação (Porto Alegre/RS, 06/03).

Índices Reprodutivos	Controle	200 mg/kg	400 mg/kg	600 mg/kg
Nº de fetos (mães)	147(14)	132(13)	154(14)	150(14)
Massa do útero grávido (g)	3,597 \pm 0,14	3,396 \pm 0,24	3,857 \pm 0,11	3,933 \pm 0,11
Número de fetos/ninhada	10,5 \pm 0,54	10,15 \pm 0,89	11 \pm 0,36	10,71 \pm 0,42
Massa corporal dos fetos (g)	4,818 \pm 0,09	4,675 \pm 0,12	4,770 \pm 0,09	4,892 \pm 0,13
Taxa de perdas pós-implantação (%)	6,96	4,63	4,34	3,22

5.6 Taxa de teratogenia

Na Tabela 3 são apresentadas as taxas de alterações ósseas encontradas nos fetos examinados em cada grupo. Os grupos receberam respectivamente 200, 400 e 600 mg/kg de SC, comparados ao grupo controle que recebeu água destilada (10 ml/kg). As alterações ósseas estão discriminadas por região anatômica e tipo de alteração, e há um total de malformações. Verifica-se que o número de alterações ósseas, encontradas nos fetos não diferem estatisticamente entre os grupos avaliados (Teste Qui-quadrado: $p < 0,05$).

TABELA 3. Ocorrência de alterações ósseas nos fetos de fêmeas tratadas por via oral com SC. As ratas foram tratadas com SC, do 6º ao 15º dia da gestação, nas dosagens 200 mg/kg (n=13), 400 mg/kg (n=14), 600 mg/kg (n=14) e um grupo controle (n=14) tratado com água destilada (10 ml/kg). Valores expressos em percentual.

Variações	Controle	200 mg/kg	400 mg/kg	600 mg/kg
Fetos com malformações (%)	12,76	25,45	19,44	11,84
Membros posteriores pobremente ossificados	4,25	9,09	zero	6,57
Interparietais com ossificação incompleta	1,06	1,81	5,55	zero
Interparietais bipartidos	zero	3,63	zero	zero
Parietais com ossificação incompleta	zero	zero	2,77	zero
Supraoccipitais com ossificação incompleta	1,06	zero	2,77	zero
Supraoccipitais bipartidos	1,06	zero	zero	1,31
Frontais com ossificação incompleta	zero	zero	1,38	zero
Esterno com ossificação incompleta	6,38	7,27	zero	5,26
Vértebra com ossificação incompleta	zero	zero	2,77	zero
Malformações				
Interparietais com centro de ossificação adicional	1,06	zero	1,38	zero
Supraoccipitais de forma irregular	7,44	5,45	2,77	1,31
Supraoccipitais com centro de ossificação adicional	1,06	zero	1,38	zero
Fontanela aumentada	1,06	3,63	zero	zero
Palato fendido	zero	zero	1,38	zero
Basióide com fissura	1,06	zero	zero	zero
Esterno de forma irregular	2,12	5,45	5,55	2,63
Esterno com duplo centro de ossificação	2,12	zero	1,38	zero
Costela rudimentar (14º par)	9,57	zero	6,94	5,26
Vértebra com duplo centro de ossificação	zero	5,45	1,38	zero
Costelas onduladas	zero	1,81	1,38	zero
Agnesia de costelas	1,06	5,45	1,38	zero
Vértebra com centro de ossificação adicional	zero	zero	1,38	1,31
Exoccipital de forma irregular	zero	zero	1,38	zero
Vértebra de forma irregular	zero	zero	zero	1,31
Costelas com centro de ossificação adicional	zero	zero	zero	1,31



FIGURA 4 – Feto processado pela técnica de coloração de alizarina de Taylor e Van Dyke (1985). Os ossos estão corados de púrpura, a massa muscular está translúcida. A seta indica uma 14ª costela rudimentar. O feto pertence ao grupo 400 mg/kg (Porto Alegre/RS, 06/03).

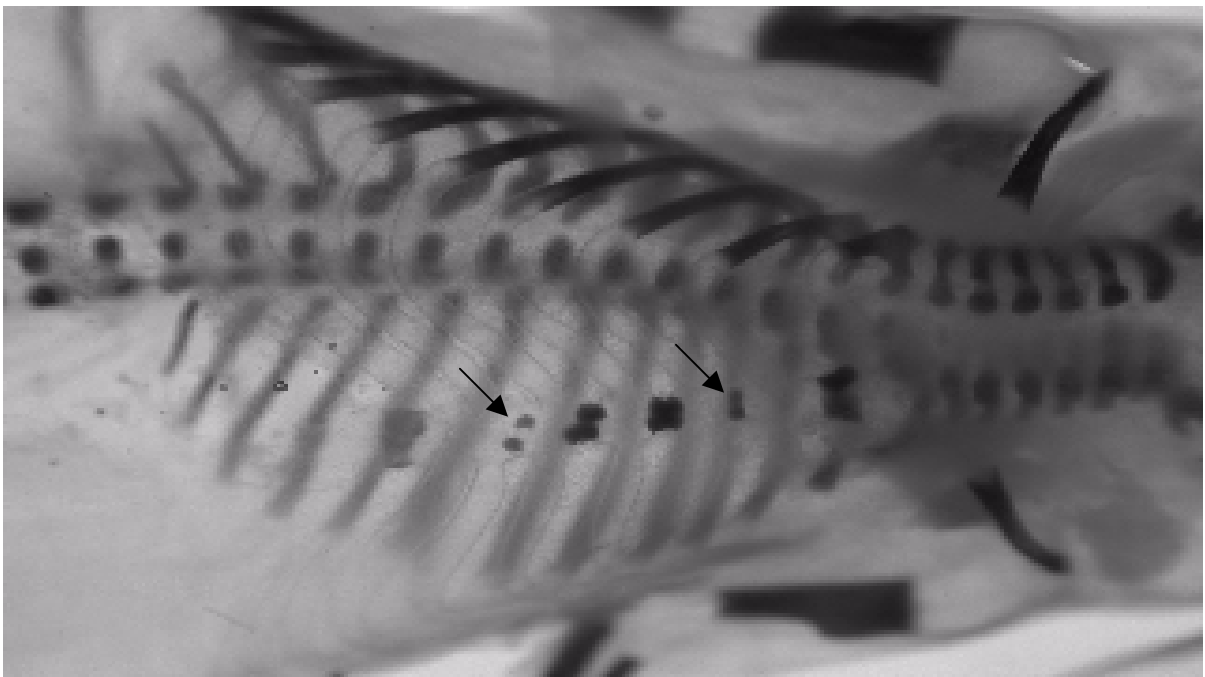


FIGURA 5 – Feto processado pela técnica de coloração de alizarina de Taylor e Van Dyke (1985). Os ossos estão corados, a massa muscular está translúcida. Pode-se notar que os ossos do esterno estão pouco ossificados, e verifica-se o duplo centro de ossificação em duas porções indicadas pelas setas. O feto pertence ao grupo 400 mg/kg (Porto Alegre/RS, 06/03).

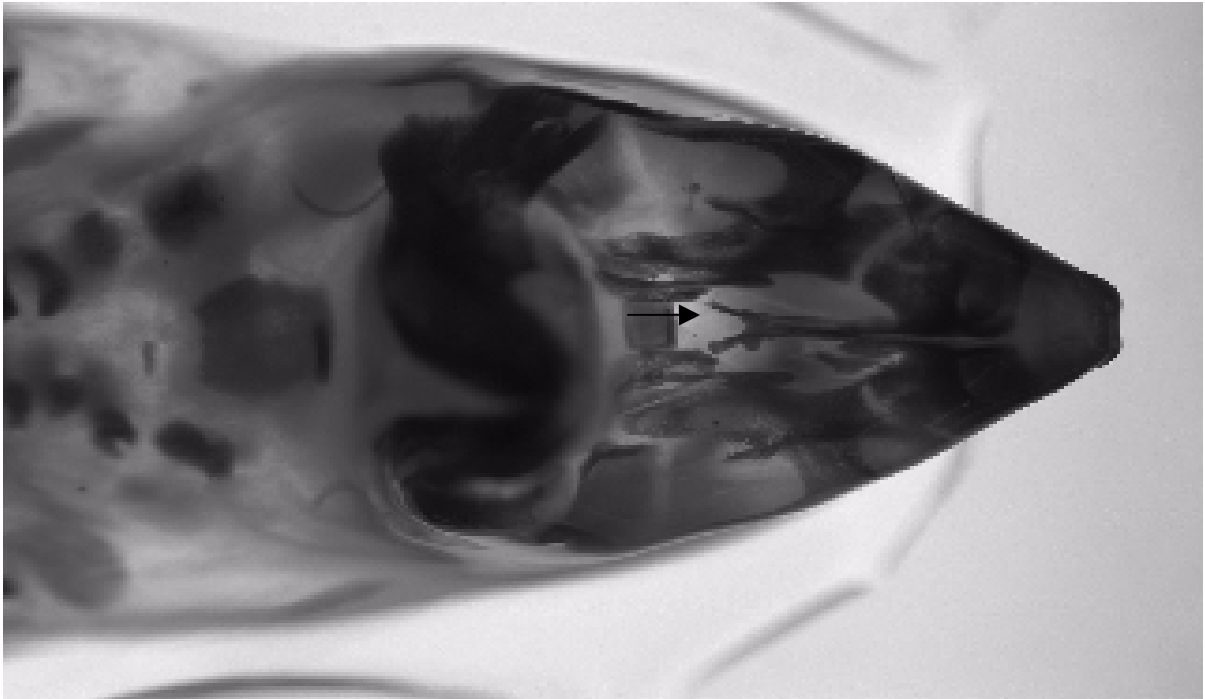


FIGURA 6 – Feto processado pela técnica de coloração de alizarina de Taylor e Van Dyke (1985). Os ossos estão corados, a massa muscular está translúcida. A seta indica a malformação denominada palato fendido. O feto pertence ao grupo 400 mg/kg (Porto Alegre/RS, 06/03).

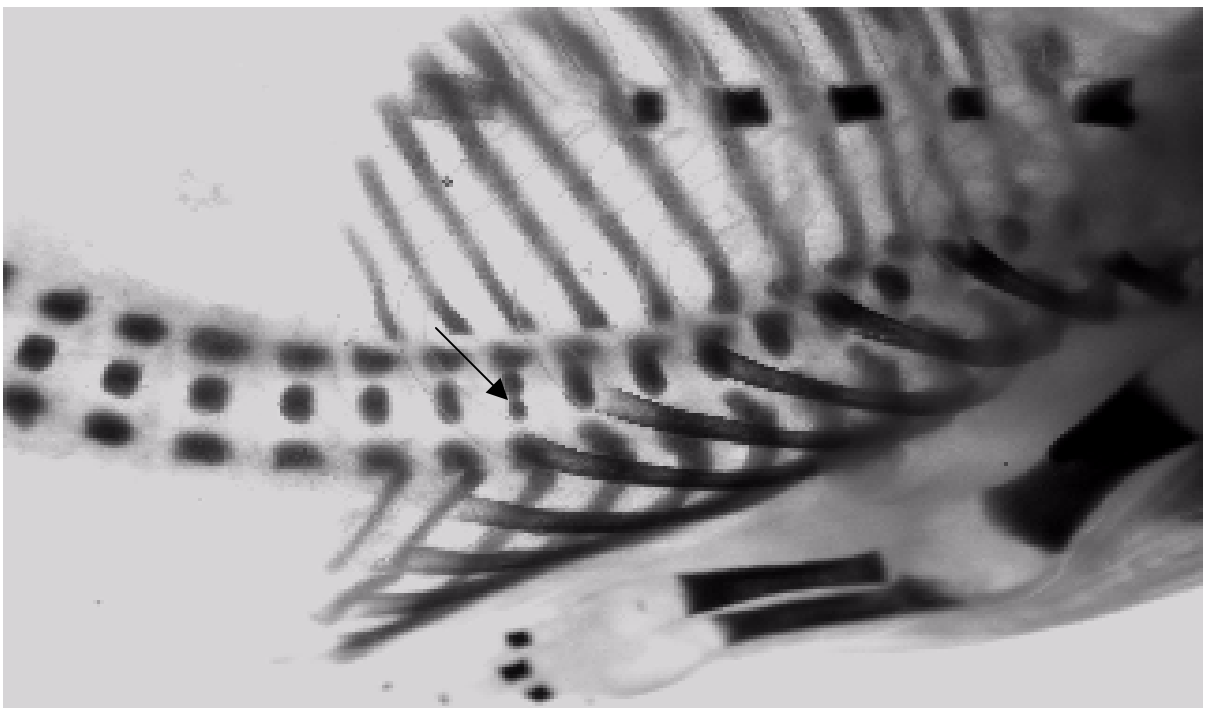


FIGURA 7 – Feto processado pela técnica de coloração de alizarina de Taylor e Van Dyke (1985). Os ossos estão corados, a massa muscular está translúcida. A seta indica o duplo centro de ossificação em uma das vértebras torácicas. O feto pertence ao grupo 400 mg/kg (Porto Alegre/RS, 06/03).

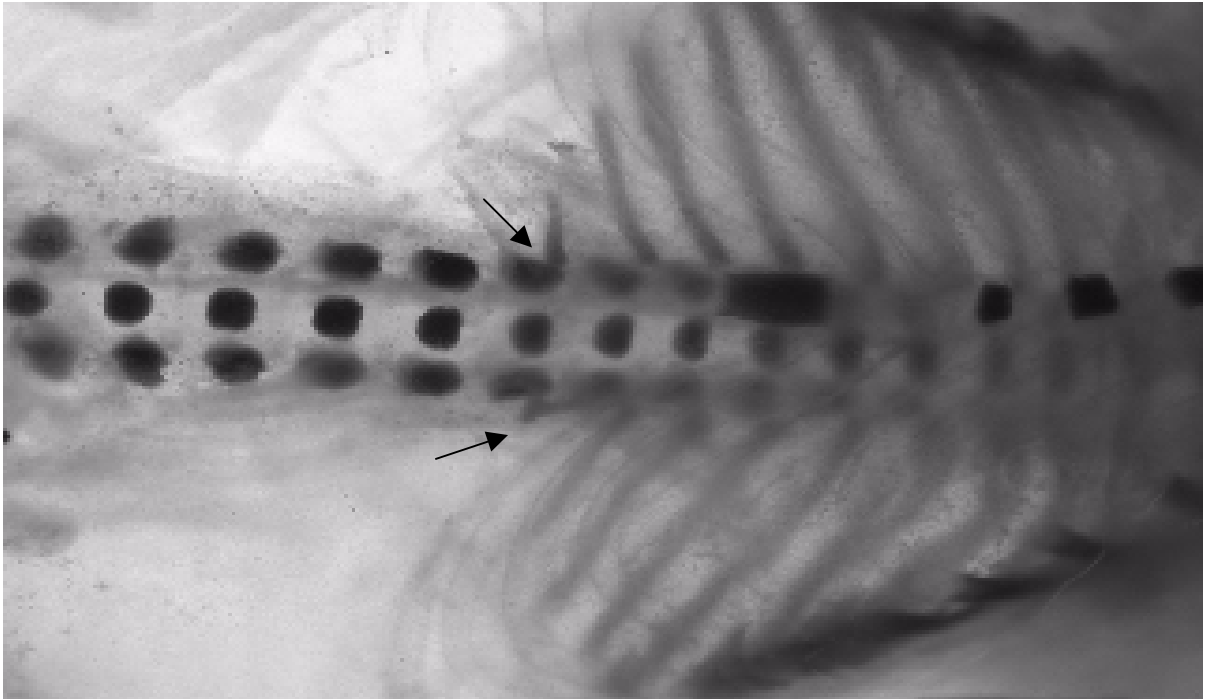


FIGURA 8 – Feto processado pela técnica de coloração de alizarina de Taylor e Van Dyke (1985). Os ossos estão corados, a massa muscular está translúcida. As setas indicam o 14º par de costelas rudimentares. O feto pertence ao grupo 400 mg/kg (Porto Alegre/RS, 06/03).

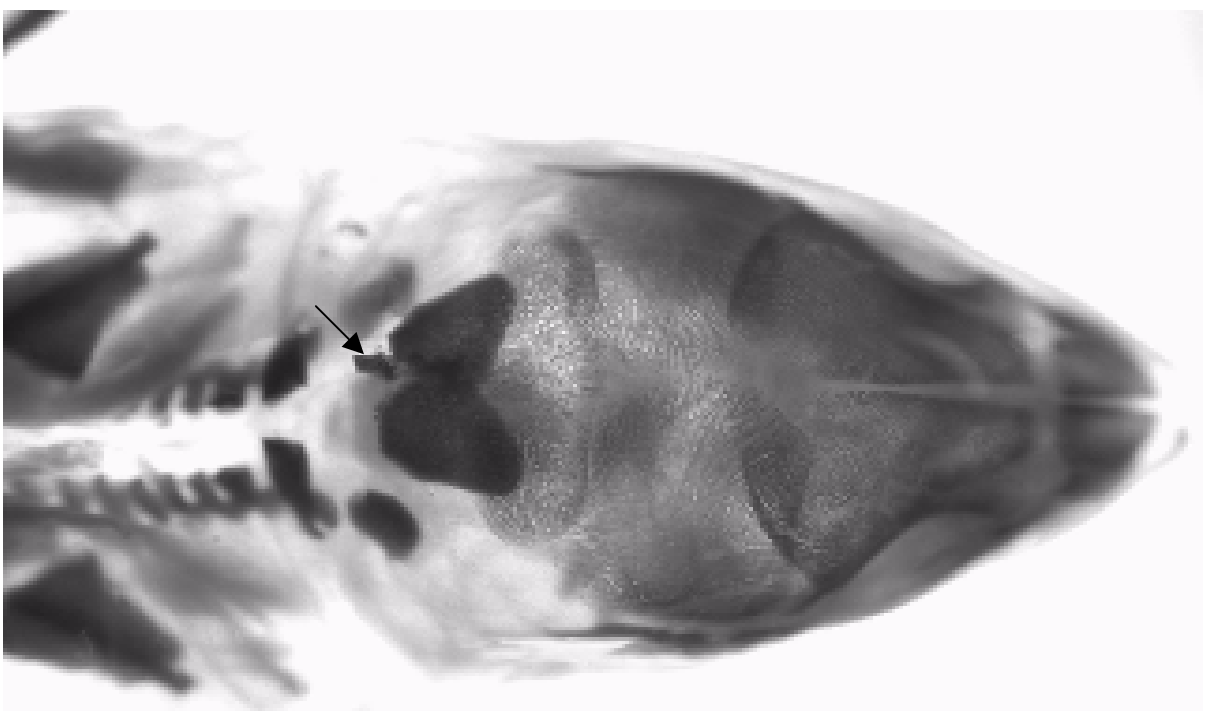


FIGURA 9 – Feto processado pela técnica de coloração de alizarina de Taylor e Van Dyke (1985). Os ossos estão corados, a massa muscular está translúcida. A seta indica uma ossificação adicional na base inferior do supraoccipital. O feto pertence ao grupo controle (Porto Alegre/RS, 06/03).

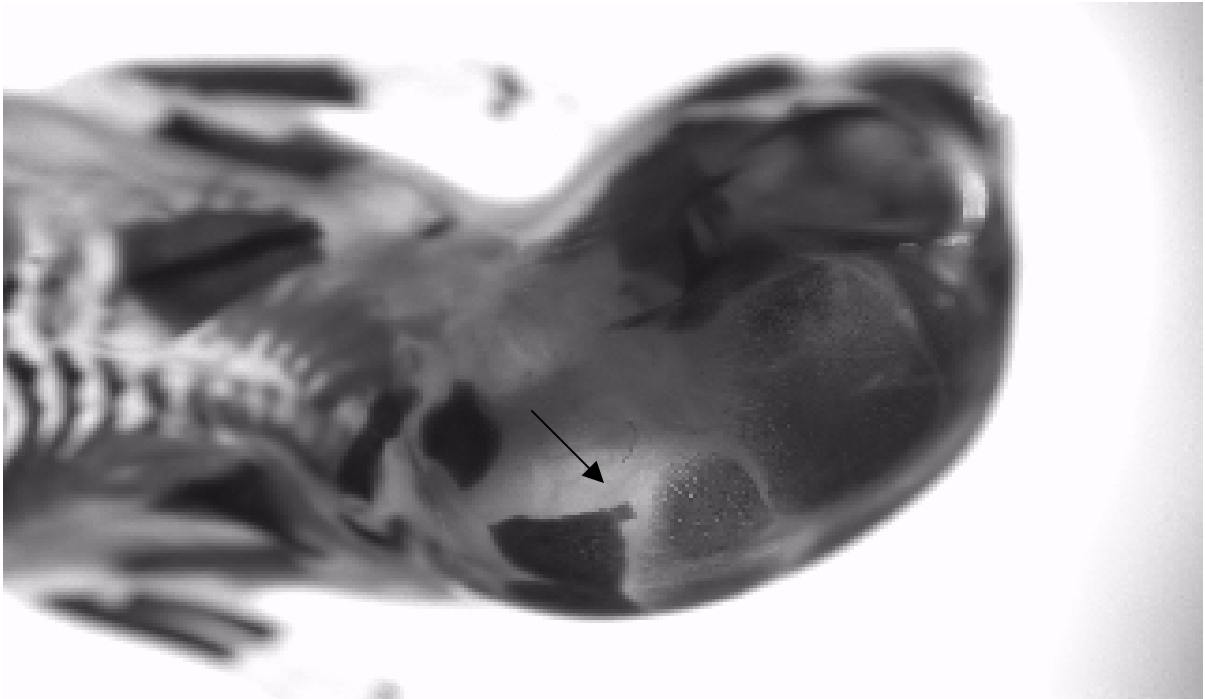


FIGURA 10 – Feto processado pela técnica de coloração de alizarina de Taylor e Van Dyke (1985). Os ossos estão de púrpura, a massa muscular está translúcida. A seta indica a ossificação adicional na base superior esquerda do supraoccipital. O feto pertence ao grupo controle (Porto Alegre/RS, 06/03).

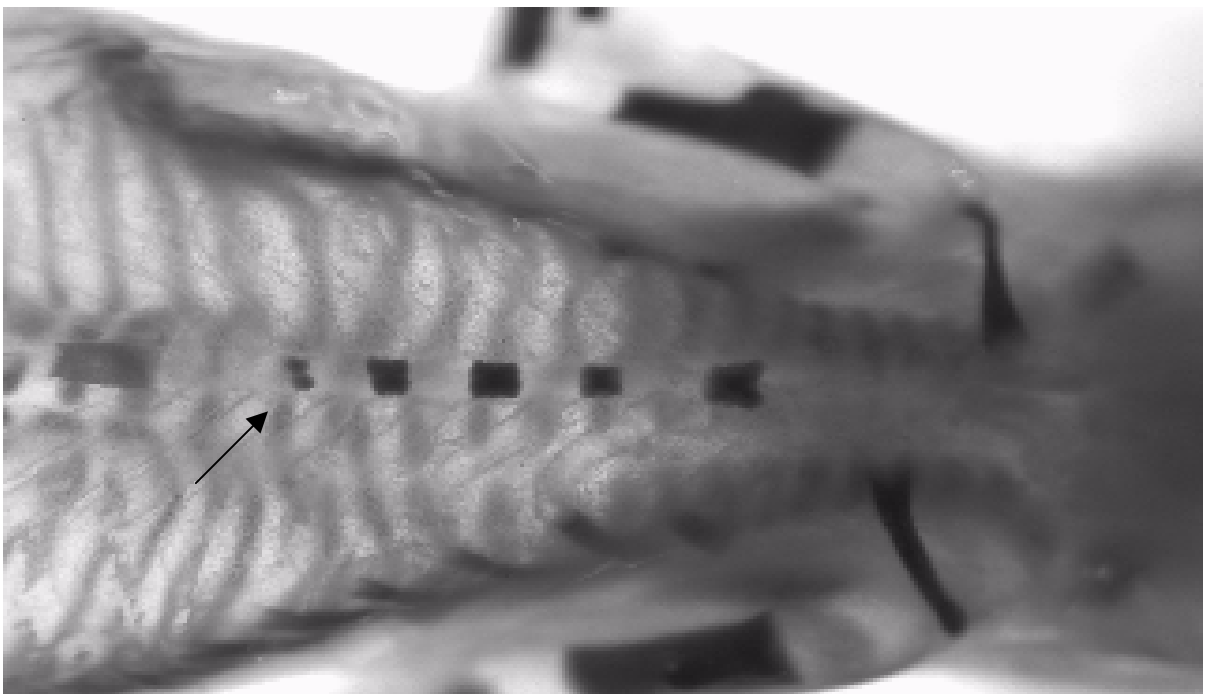


FIGURA 11 – Feto processado pela técnica de coloração de alizarina de Taylor e Van Dyke (1985). Os ossos estão corados, a massa muscular está translúcida. A seta indica o duplo centro de ossificação em um dos ossos do esterno. O feto pertence ao grupo controle (Porto Alegre/RS, 06/03).



FIGURA 12– Feto processado pela técnica de coloração de alizarina de Taylor e Van Dyke (1985). Os ossos estão corados, a massa muscular está translúcida. É possível notar a pobre coloração dos ossos do esterno, embora o esqueleto geral esteja bem corado. O feto pertence ao grupo controle (Porto Alegre/RS, 06/03).



FIGURA 13 - Feto corado pela técnica de alizarina de Taylor e Van Dyke (1985). Os ossos estão corados de púrpura, a massa muscular está translúcida. Esse feto foi escolhido por estar dentro dos padrões de normalidade na avaliação da estrutura esquelética, pertence ao grupo controle (Porto Alegre/RS, 06/03).

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho nos permitem afirmar que o SC administrado a ratas Wistar no período de embriogênese, que vai do 6º ao 15º dia da gestação, nas doses de 200, 400 e 600 mg/kg, por via oral, não originou aumento do número de alterações ósseas nos fetos avaliados após a coloração de alizarina. Também não houve influência sobre as variáveis reprodutivas, consumo de água e ração e desenvolvimento ponderal das ratas.

As ratas submetidas ao SC nas dosagens determinadas nesse trabalho, não apresentaram sinais de toxicidade.

Para Camus (1972), tecnicamente a DL_{50} não foi definida para o SC. Testes de toxicidade com doses de 1 a 2 g/kg (VO ou IV em camundongos), 159 mg/kg (IM em camundongo) e 1,5 g/kg em ratos não constataram conseqüências tóxicas.

Mas no RTECS (*Registry of Toxic Effects of Chemical Substances* - Registro de Efeitos Tóxicos de Substâncias Químicas), o SC tem algumas informações sobre toxicidade avaliadas. A DL_{50} está estabelecida em 2.340 mg/kg IV em camundongos (Rinsho, 1960). A menor dose tóxica IV publicada é de 1.680 mg/kg/14 dias, em ratos. Nessa dose podem ser observadas alterações no peso do fígado, perda de peso ou redução do ganho de peso (Rinsho, 1960). A menor dose tóxica VO publicada é de 445 mg/kg/26 semanas. Nessa dose observou-se redução da quantidade de alimento ingerido, perda de peso ou diminuição do ganho de peso (Rinsho, 1960).

Em pesquisa realizada pela internet em julho de 2003, de acordo com a ANVISA, vários medicamentos contendo SC, como Ostiflex[®], Osteo Flex[®] e Osteo Plus[®], tiveram seus pedidos de registro indeferidos por estarem em desacordo com a legislação vigente no país. Mas outros já tiveram parecer favorável pela Câmara Técnica de Medicamentos – CATEME, como Artrolive[®] e Condrolflex[®]. Nada consta sobre a toxicidade desses produtos.

No presente trabalho, o peso dos órgãos assim como as demais variáveis não tiveram alteração estatisticamente significativa. Não há nenhuma referência bibliográfica que indique hepatotoxicidade do SC, e somente os testes de toxicidade realizados por Rinsho (1960) com

ratos e camundongos indicaram diminuição de peso do fígado em altas doses administradas (1.680 mg/kg/14 dias, IV, em ratos e 2.340 mg/kg, IV, em camundongos).

No presente trabalho, a diferença entre o número de alterações ósseas nos fetos entre os grupos, não foi estatisticamente significativa. Esse fato pode ser devido à não teratogenicidade da substância, ou à resultado falso-negativo (ausência de efeito no experimento quando na verdade o medicamento possui potencial teratogênico).

Em um estudo de Camus (1972), não foram observadas malformações nos fetos ou filhotes de ratas e coelhas alimentadas com 0,1 a 1 g/kg de SC.

Para Pipitone (1991), baseado em ensaios clínicos, o SC não produz efeitos tóxicos ou teratogênicos em humanos.

Em pesquisa com ratos, realizada por Halstead & Roe (1981), o grau de sulfatação dos GAGs do esqueleto fetal, afetou sua calcificação.

Apesar dos resultados desse trabalho indicarem que não houve mudança entre os grupos tratados e o controle, nas variáveis avaliadas, devemos ter o cuidado de descartar a possibilidade de falso-negativo.

Os resultados falso-negativo ou falso-positivo podem ser obtidos pelo uso da espécie animal errada. Algumas espécies são mais suscetíveis que outras para certos medicamentos (Neubert *et al.*, 1996).

Os resultados falso-negativos também podem ser originados pela falta de preparo técnico no momento de preparar a coloração dos fetos, e também na avaliação das anormalidades esqueléticas. A avaliação das alterações encontradas nos fetos segue uma terminologia padronizada. Nesse trabalho as alterações esqueléticas foram avaliadas conforme o Atlas de Alterações Esqueléticas e Externas em Ratos (Chahoud & Faqi, 1997), e também outras fontes como os artigos publicados após o segundo e terceiro encontros de Terminologia em Toxicologia Desenvolvemental, ocorridos em 1998 e 2000 respectivamente (Chahoud *et al.*, 1999; Solecki *et al.*, 2001), e o livro de Métodos em Toxicologia Pré-natal (Neubert *et al.*, 1996).

Segundo essas bibliografias, duas categorias devem ser adotadas, malformação e variação. O problema é que não existem protocolos que indiquem o que é malformação ou o que é variação, existem sugestões.

Conforme o segundo encontro de Harmonização em Terminologia da Toxicologia Desenvolvemental, como malformação entende-se a mudança de estrutura permanente, que é semelhante ao efeito adverso à sobrevivência ou à saúde das espécies sob investigação. Como variação entende-se a mudança que ocorre dentro da população normal sob investigação, e

que não é semelhante ao efeito adverso à sobrevivência ou à saúde. Isso inclui um atraso no crescimento ou morfogênese, que pode seguir um padrão normal de desenvolvimento (Chahoud *et al.*, 1999).

De acordo com Solecki (2001), a terminologia usada para descrever anomalias nos estudos de toxicologia desenvolvimental possui ambigüidades e inconsistências. As anormalidades que não adaptam-se bem a uma de duas categorias (malformação ou variação), podem ter um impacto maior no estabelecimento da toxicidade pré-natal e ainda, entre os pesquisadores, gerar incertezas e discordâncias sobre sua importância.

O presente trabalho utilizou os termos variação e malformação para classificar as anormalidades encontradas nas ninhadas sob investigação. As definições do terceiro encontro em Terminologia da Toxicologia Desenvolvimental foram as mais utilizadas para essa classificação.

As maiores dificuldades surgem durante o processo de classificação das anomalias, principalmente porque existem anormalidades que ocorrem a uma determinada taxa. Essas anormalidades precisam ser classificadas como **variação** quando ocorrem em baixa quantidade e **malformação** quando ocorrem a elevada quantidade, como exemplo : fusões esternais e ventrículos cerebrais. Segundo Solecki (2001), “novas” anormalidades são relatadas quando a equipe envolvida na avaliação fetal é alterada.

Foi consenso geral do terceiro encontro (Solecki, 2001) que o termo supranumerário indica uma malformação. O que contraria o proposto por Neubert *et al.*(1996), em que costelas supranumerárias em ratos são consideradas uma variação (considerando formas vestigiais, podem chegar a 20% nas ninhadas). Nesse trabalho, as costelas supranumerárias foram consideradas malformação, sendo encontrados até 9% de 14º par de costelas, a maior frequência no grupo controle. Alguns laboratórios usam critérios mais restritos, de que costelas extras precisem ter no mínimo 1/2 ou 1/3 do tamanho da costela precedente, a incidência nesses fica em torno de 1%. Mas ainda assim as formas vestigiais precisam ser anotadas (Neubert *et al.*, 1996).

Sobre ossificação incompleta no rato, geralmente ela indica atraso independente da estrutura afetada. Mas isso pode ser perigoso já que a ossificação incompleta de uma única estrutura, quando o resto do esqueleto é normalmente ossificado, é mais importante do que uma ossificação incompleta acompanhada por baixo peso ou outros sinais de imaturidade no esqueleto (Solecki, 2001). No quesito membros posteriores com ossificação incompleta, os percentuais variaram de 4 a 9%, sendo o maior valor encontrado no grupo 200 mg/kg.

A maioria dos especialistas classificou estruturas não ossificadas como variação, se o mesmo ocorrer em amostras controle de mesma idade. O termo não ossificado foi considerado uma forma extrema de ossificação incompleta (Solecki, 2001). No presente trabalho, vários ossos do crânio em algumas ninhadas estavam não ossificados, e foram classificados como ossificação incompleta (variação).

Muitos laboratoristas concordaram que para ratos e camundongos, não é realmente possível contar cada elemento caudal sem a coloração da cartilagem (Solecki, 2001). Esse conceito foi adotado nesse trabalho.

O método da dupla coloração relatado por Webb & Byrd (1994), alerta que a deficiência em avaliar as porções cartilaginosas do esqueleto pode resultar na insuficiência em identificar alterações toxicologicamente importantes na morfologia do esqueleto. Como o esqueleto da fase final da gestação em fetos de roedores não é ossificado como um animal adulto, uma grande porção do esqueleto fetal (isto é, a cartilagem) permanece não corada com vermelho alizarina, tornando a avaliação difícil. Usando um método para corar cartilagem e ossos, Kimmel *et al.* (1982), demonstrou importantes anormalidades do esqueleto cartilaginoso nos fetos de ratos expostos pré-natalmente à cafeína. Essas anormalidades esqueléticas ocorreram sempre na menor dose de cafeína testada, enquanto que anormalidades esqueléticas não foram aparentes na mesma dose quando a solução vermelho alizarina foi usada sozinha. Para maior segurança dos resultados obtidos no presente trabalho, seria importante avaliar também as cartilagens dos fetos após dupla coloração com vermelho alizarina e azul de alcian.

A razão pela qual o SC não tenha gerado aumento no número de defeitos nos fetos de ratas tratadas poderia estar ainda, no tipo de placenta. Geralmente a placenta é impermeável a drogas com peso molecular de 1000 Da ou mais (Thomas, 1989). A molécula de SC é grande, com peso molecular entre 25 a 40 kDa (Reyes *et al.*, 2000), o que impediria sua penetração pelo simples gradiente de concentração através da placenta e acesso ao embrião.

Além disso é importante lembrar que ocorrem interferências na passagem das substâncias através da placenta. Entre elas, estão a lipossolubilidade, o grau de ionização e a ligação com as proteínas plasmáticas. As drogas atravessam a placenta principalmente por difusão lipídica, mas algumas também passam por difusão facilitada, transporte ativo ou pinocitose (Lemonica, 1996).

Em estudos animais, dois critérios precisam ser avaliados. Se os metabólitos que a droga forma nos animais são os mesmos que forma nos humanos, e se a farmacocinética expõe os embriões aos mesmos metabólitos em homens e animais. Na prática, a exposição

embriônica é difícil de determinar, e os níveis no sangue materno são usados como um marcador sugestivo. Se esses critérios são atendidos, é provável que a droga segura em animais de laboratório prenhes, também seja segura em humanos (Webster & Freeman, 2001). No caso do SC, não foi determinado se ele atinge ou não a circulação fetal, e se atinge, o faz em que concentração? Mas até o momento, os testes de biodisponibilidade da substância apontam que ela é a mesma para humanos e animais (Conte *et al.*, 1995).

Segundo o OPPTS 870.3700 da EPA, de 1998, em qualquer estudo que demonstra uma ausência de efeitos tóxicos, deve ser considerada uma investigação posterior para estabelecer a absorção e a biodisponibilidade da substância teste.

Pesquisa de Conte *et al.* (1991), determinou que a absorção intestinal confirmou outras pesquisas em homens e animais experimentais, ambos com SC e outros GAGs com baixo grau de sulfatação. Esse estudo demonstrou que cerca de 10% da droga oralmente administrada foi absorvido como componentes de alto peso molecular. Ele também mostrou que a maior quantidade de SC administrada (cerca de 20%), é absorvida como derivados de baixo peso molecular. Por fim, a biodisponibilidade absoluta do SC administrado oralmente é de 13,2% no plasma de homens e animais. Ou seja, para o SC, a taxa metabólica do SC exógeno no homem e em animais experimentais é semelhante.

Isso não significa que em animais e humanos prenhes, a farmacocinética seja semelhante, pois ocorrem mudanças fisiológicas durante a prenhez, alterando a farmacocinética das drogas: absorção, distribuição, metabolismo e excreção das drogas e seus metabólitos. Existem poucos estudos sobre a farmacocinética das drogas na prenhez (Hansen, 2002).

Ainda é importante considerar a permeabilidade da placenta a um fármaco, que pode ser afetada pelas características da placenta, incluindo espessura, área de superfície, sistemas carreadores e concentração lipídica-proteica das membranas (Thomas, 1989).

Segundo Webster & Freeman (2001), é geralmente aceito que cerca de 2 - 4 % de neonatos tenham um defeito ao nascimento. Pouco mais de 1 % dos defeitos ao nascimento podem ser atribuídos à prescrição de medicamentos à mãe. Dos 99 % restantes, 9 % são atribuídos à condições maternas, tais como diabetes, infecções ou abuso de álcool, 20 – 25 % tem base genética e cerca de 65 % tem origem desconhecida. Para eles os medicamentos não podem ser considerados teratogênicos apenas baseando-se em estudos animais, pois as dosagens podem ser muito altas, tendo pequena ou nenhuma relevância para humanos.

Para avaliar uma droga corretamente quanto à sua segurança na prenhez, precisamos considerar 3 critérios. Primeiro, a droga foi exposta a estágios críticos apropriados da prenhez.

Geralmente o estágio mais crítico é o primeiro trimestre, por compreender a fase de embriogênese. Segundo, uma mesma dose foi usada em todos os casos, ou pelo menos a dose era conhecida. Se cada animal prenhe recebe uma certa dose, a informação não seria diluída? Terceiro, os filhos foram apropriadamente examinados para que todos os defeitos fossem identificados? Assumindo que todos esses critérios foram alcançados, então nós teríamos maior segurança para aplicar um teste estatístico sobre os estudos teratológicos e afirmar se a droga é ou não segura (Webster & Freeman, 2001). Nesses aspectos o presente trabalho preenchia todos os requisitos requeridos, diminuindo a chance de erro.

Um achado comum em estudos animais é um pequeno aumento em uma malformação estrutural particular, tal como microftalmia. Na ausência de evidência de uma dose-efeito, o achado é geralmente rejeitado, principalmente se há evidência que a malformação é vista em taxas variáveis no histórico do grupo controle. Entretanto a droga poderá ser categorizada como mostrando efeitos adversos em estudos animais (Webster & Freeman, 2001). No caso das malformações registradas no presente estudo, o maior percentual encontrou-se no grupo com a menor dose da substância, o que desclassifica-a segundo o critério de dose-efeito, de ter potencial teratogênico. Além disso, esse aumento verificado no grupo com a menor dose não teve efeito estatisticamente significativo em relação aos demais grupos.

O mais sério achado animal e também raro, é um aumento na incidência de um ou mais defeitos ao nascimento, em duas espécies animais (exemplo: Ribavirina), e evidência de uma dose-efeito (Webster & Freeman, 2001).

Para Lemonica (1996), um conceito válido para todos os testes de teratogenicidade é a dose limite e a dose dependência. Geralmente para cada teratógeno existe uma dose limite abaixo da qual não se manifesta nenhum efeito embriotóxico ou dismorfogênico e a partir da qual o percentual de indivíduos malformados aumenta em função da dose. Não houve evidência alguma no presente trabalho de que o SC aumentasse o nível de um tipo de anormalidade e, portanto, não houve avaliação da possível interação dose-efeito.

Outro motivo pelo qual não se detectou aumento no número de alterações poderia ser o tamanho da amostra analisada. Foram analisadas aproximadamente 14 ninhadas. Como o SC é bem tolerado tanto oral como parenteralmente, seria necessário submeter um número maior de animais ao experimento para detectar um leve aumento no número de malformações.

Segundo o OPPTS 870.3700 da EPA, de 1998, o número de animais por grupo é 20, contando animais com sítios de implantação à necropsia.

Tipicamente os estudos teratológicos têm somente 20 ninhadas por grupo, e se a ninhada é considerada a unidade experimental, a força estatística para detectar um aumento na

incidência de defeitos ao nascer é particularmente baixa. Mas isso pode ser neutralizado pelo regime de dosagem, em que os animais são dosados próximos ao nível de toxicidade materna, que resultará em exposição sistêmica muitas vezes maior do que a esperada no humano (Webster & Freeman, 2001).

Para Lemonica (1996), uma das razões para que existam respostas diversas na interação mãe-feto-droga, é que a resposta ao agente teratogênico é amplamente dependente do genótipo do embrião, e dentro da mesma espécie, pode-se encontrar sensibilidade diferente a um mesmo teratogênico. Essa diferença inter e intra espécie faz com que apesar das inúmeras pesquisas na área, poucas substâncias tenham sido reconhecidas até o momento como teratogênicas para o homem. Outro fato que determina o aparecimento de efeito embriofetotóxico de uma substância química é a interação entre essa substância e outros fatores que incidem sobre o organismo materno tais como estado nutricional, fatores ambientais, idade materna, estresse, etc.

No presente trabalho, foi utilizada somente uma espécie animal, o rato. É importante lembrar que os testes de teratogenicidade devem testar duas espécies animais. Ratos são reconhecidamente mais suscetíveis à acetazolamida, ácido retinóico, metotrexano, 5-fluorouracil, hidroxuréia e vincristina. Já macacos Rhesus são mais suscetíveis à talidomida (e também o homem). Ratos mostraram ser pouco suscetíveis à cortisona, talidomida e azatioprina. Essas diferenças podem estar relacionadas ao metabolismo. Embora existam exceções. Um caso interessante é o do metotrexano, que é altamente teratogênico para ratos (0,3 mg/kg). Em macacos Rhesus não foram observados efeitos com 3 mg/kg e doses maiores. A sua biodisponibilidade poderia explicar essas diferenças na embriofetotoxicidade, mas o metotrexano tem a mesma distribuição e excreção tanto para ratos como para macacos (Neubert *et al.*, 1996). Todas essas informações demonstram a importância do uso de diferentes espécies animais para testar a toxicidade reprodutiva de qualquer substância, para que se evite o resultado falso-negativo pelo uso da espécie animal errada.

São necessários mais trabalhos com SC e seu envolvimento na reprodução. Pois pior do que estudar uma substância considerada atóxica, é desconhecer a sua toxicidade. Existem as etapas Segmento I e III, e ainda outra espécie que não ratos deve ser testada para que se possa ter melhor definição do SC quanto à sua inocuidade na reprodução.

7. CONCLUSÕES

- A administração de SC (VO) nas doses de 200, 400 e 600 mg/kg, à ratas Wistar durante a fase de embriogênese, não altera significativamente ($p < 0,05$) o número de fetos com anomalias ósseas.
- A administração de SC (VO) nas doses de 200, 400 e 600 mg/kg, à ratas Wistar, durante a gestação (fase de embriogênese), não altera o desenvolvimento ponderal e o consumo de água ou ração das fêmeas gestantes.
- Os índices reprodutivos não são modificados significativamente pela administração de SC nas doses administradas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANN, R.P. **Use of animal models for detecting specific alterations in reproduction.** Fundamental and Applied Toxicology, vol. 2, 1982, 13-25.
- ANDERSON, D.; CONNING, D.M.. **Experimental toxicology – The basic issue.** 2 ed., Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1993, 566p.
- BAICI, A.; HORLER, D.; MOSER, B.; HOFER, A.; FEHR, K.; WAGENHAUSER, F. **Rheumatology Int.** 12, 81, 1992.
- BALI, J.; COUSSE, H.; NEUZIL, E. **Biochemical Basis of the Pharmacologic Action of Chondroitin Sulfates on the Osteoarticular System.** Seminars in Arthritis and Rheumatism, Vol 31, Nº 1 (August), 2001: p 58-68.
- BASSLER, C.; HENROTIN, y.; FRANCHIMENT, P. **In Vitro Evaluation of Drugs Proposed as Chondroprotective Agents.** Int. J. Tissue React 1992, 14: 231-241.
- BENNETT, D. **Joint disease.** In: CHANDLER, E., A.; SUTTON, J., B.; THOMPSON, D., J., eds. **Canine Medicine and Therapeutics** 2nd ed. Oxford England. Blackwell, 1985; 167-205.
- BENTON, H.P. **Similar regulation of chondrocyte functions by cellular stimulants of unknown mechanism. Retinoids, cytokines and bacterial lipopolysaccharide.** Biochem Pharmacology. 1990, 39: 1-6.
- BERNARDI, M.M. **Exposição aos medicamentos durante o período perinatal.** In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.M., BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária.** 2 ed, Guanabara Koogan, 1999, 566-574.
- BIFFONI, M. V.; PAROLI, E. **Drugs Exptl. Clin. Res.** 17, 9, 1991. In: **Glucosamine and chondroitin sulfates in the treatment of osteoarthritis: a survey.** De los REYES, G.C.; KODA, R. T.; LIEN, E.J. Progress in Drug Research, vol 55, 2000. Birkhäuser Verlag, Basel (Switzerland).
- BOURGEOIS, P.; CHALES, G.; DEHAIS, J.; DELCARNBRE, B.; DREYFUS, P.; KUNTZ, J.; ROSENBERG, S. **Osteoarthritis Cartilage** 69, 25 (1998). In: **Glucosamine and chondroitin sulfates in the treatment of osteoarthritis: a survey.** De los REYES, G.C.; KODA, R. T.; LIEN, E.J. Progress in Drug Research, vol 55, 2000. Birkhäuser Verlag, Basel (Switzerland).

- BUCCI, L., R. **Chondroprotective agents: glucosamine salts and chondroitin sulfates.** Townsend Lett Doctors, 1994, 52-54.
- BUSCI, L.; POOR, G. **Osteoarthritis Cartilage**, 6, 39, 1998. In: **Glucosamine and chondroitin sulfates in the treatment of osteoarthritis: a survey.** De los REYES, G.C.; KODA, R. T.; LIEN, E.J. Progress in Drug Research, vol 55, 2000. Birkhäuser Verlag, Basel (Switzerland).
- CAMUS, J. **Verificacion de l'action de l'acid chondroisine sulfurique chez des malades arthrosiques.** Laboratoires Gremmy-Longuet, Paris, 1972. In: **Glucosamine and chondroitin sulfates in the treatment of osteoarthritis: a survey.** De los REYES, G.C.; KODA, R. T.; LIEN, E.J. Progress in Drug Research, vol 55, 2000. Birkhäuser Verlag, Basel (Switzerland).
- CHAHOUD, I.; FAQI, A., S. **Atlas of External and Skeletal Anomalies in Rats.** Institute for Clinical Pharmacology and Toxicology Berlin. Produced by PR & C Agentur Berlin/Leipzig v 1.20. 1997.
- CHAHOUD, I. **Classification terms in developmental toxicology: need for harmonisation.** Reproductive Toxicology, vol. 13, n°1, 77-82, 1999.
- COBEA- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. **Manual para técnicos em bioterismo.** 2 ed, São Paulo, H. A. Rothschild, 1996, 259 p.
- CONTE, A.; VOLPI, N.; PALMIERI, L.; BAHONS, I.; RONCA, G. **Biochemical and Pharmacokinetic Aspects of Oral Treatment with Chondroitin Sulfate.** *Arzneim. Forsch.* 45 (II), 918, 1995.
- CONTE, A.; BERNARDI, M.; PALMIERI, L.; LUALDI, P.; MAUTONE, G.; RONCA, G. **Metabolic Fate of Exogenous Chondroitin Sulfate in Man.** *Arzneim. Forsch./Drug Research.* 41 (II), n° 7, 1991.
- CREAMER, P.; HOCHBERG, M. C. **Osteoarthritis.** *Lancet*, 350:503-509, 1997.
- Da CAMARA, C.; DOWLESS, G.; **Rheumatology.** 32, 580 (1998). In: **Glucosamine and chondroitin sulfates in the treatment of osteoarthritis: a survey.** De los REYES, G.C.; KODA, R. T.; LIEN, E.J. Progress in Drug Research, vol 55, 2000. Birkhäuser Verlag, Basel (Switzerland)
- DANAO-CAMARA, T. **Potential side effects of treatment with glucosamine and chondroitin.** *Arthritis & Rheumatism*, vol. 43, n° 12, December 2000, 2853.
- DOMOWICZ, M.; MANGOURA, D.; SCHWARTZ, N., B. **Cell specific-chondroitin sulfate proteoglycan expression during CNS morphogenesis in the chick embryo.** *International Journal of Developmental Neuroscience.* Vol.18, issue 7, November 2000, 629-641.
- EPA- Environmental Protection Agency. **Health effects test guidelines – OPPTS 870.3800.** Reproduction and Fertility. 1998.

- FLEISH, A.; MERLIN, C.; IMHOFF, A. **Osteoarthritis Cartilage**, 5, 70, 1997. In: **Glucosamine and chondroitin sulfates in the treatment of osteoarthritis: a survey**. De los REYES, G.C.; KODA, R. T.; LIEN, E.J. Progress in Drug Research, vol 55, 2000. Birkhäuser Verlag, Basel (Switzerland).
- FROHBERG, H., 1977. **Was lehren toxikologische kurz-und Langzeittests sowie Prüfungen auf Kanzerogenität, Teratogenität und Mutagenität?**, *Arzneim.-Forsch. (Drug Research)*, 27, 228-241. In: *Methods in Prenatal Toxicology*, NEUBERT, D., MERKER, H. J., KWASIGROCH, T. E., 1977, Berlin.
- GARNIER, P.; GIBBS, R.V.; RIDER, C.C. **A role for chondroitin sulphate B in the activity of interleukin 12 in stimulating γ -interferon secretion**. *Immunology Letters*, 2002, 00, 1-6.
- GAVAIA, P.J.; SARASQUETE, C.; CANCELA, M.L. **Detection of mineralized structures in early stages of developmental of marine *Teleostei* using a modified technique for bone and cartilage**. *Biotechnic & Histochemistry*, vol. 75, n^o2, 1999, 79-84.
- GHOSH, P.; SMITH, M.; WELLS, C. **Second-line Agents in the Treatment of Rheumatic Diseases**. New York: Marcel Dekker, Inc, 1992, 363.
- GIRARDI, N.; FREITAS, S.H. **Artropatia séptica traumática em equino**. Trabalho vencedor do III Prêmio de Pesquisa Clínica Schering-Plough Veterinária, 2001.
- GLADE, M., J. **Polysulfated glycosaminoglycan accelerates net synthesis of collagen and glycosaminoglycans by arthritic equine cartilage tissues and chondrocytes**. *Am. J. Vet. Research*. Vol 51, n 5, 779-785, May 1990.
- GROSS, D. *Therapiewoche* 33,4238, 1983. In: **Glucosamine and chondroitin sulfates in the treatment of osteoarthritis: a survey**. De los REYES, G.C.; KODA, R. T.; LIEN, E.J. Progress in Drug Research, vol 55, 2000. Birkhäuser Verlag, Basel (Switzerland).
- HALSTEAD, P., K.; ROE, D., A. **Effect of salicylamide on skeletal glycosaminoglycan sulfation and calcification in fetal rat limbs**. *Drug Nutr. Interact.* 1981, 1(1), 75-86.
- HANNAN, N.; GOSH, P.; BELLENGER, C.; et al. **Systemic Administration of Glycosaminolican Polysulfate (Arteparon) Provides Partial Protection of Articular Cartilage from Damage Produced by meniscectomy in the canine**. *J. Orthop. Res.* 1987, 5: 47-59.
- HANSEN, W., F. **Pharmacologic Therapy for Medical Disorders During Pregnancy**. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, vol.45 (1), Mar 2002, 136-152.
- HATA, R.I.; NAGAI, Y. **A low-sulfated chondroitin sulphate in rat blood: na acidic glycosaminoglycan with a high metabolic rate**. In: BALI, J.; COUSSE, H.; NEUZIL, E. **Biochemical Basis of the Pharmacologic Actino of Chondroitin Sulfates on the Osteoarticular System**. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, vol. 31, n^o1 (August), 2001, 58-68.

- HÄUSELMANN, H.J. **Nutripharmaceutical for osteoarthritis**. Best Practice & Research Clinical Rheumatology, vol. 15, nº4, 595-607, 2001.
- HOLTSINGER, R. H.; PARKER, R. B.; BEALE, B. S., et al. **The therapeutic efficacy of carprofen (Rimadyl-V) in 209 clinical cases of canine degenerative joint disease**. Vet. Comp. Orthop. Trauma, 5:140-144, 1992.
- HULSE, D. **Treatment methods for pain in the osteoarthritic patient**. Vet. Clin. North. Am. 1998, 28: 361-374.
- JOHNSTON, S., A. **Osteoartrite: Fisiologia e Expectativas Relacionadas ao Tratamento**. Topics, 2001, ano 2, vol. 3: 16-25.
- KIMMEL, C., A.; LaBORDE, J., B.; TRAMMELL, C., T. **Evaluation of cartilage and bone in whole mount preparations of mammalian fetuses and small vertebrates**. Stain Technology, 58: 131-134, 1982.
- LAPPONI, J.C. **Estatística Usando Excel**. São Paulo: Lipponi Treinamento e Editora, 2000. 451p.
- LARINI, L. **Avaliação Toxicológica**. Toxicologia. Ed. Manole. São Paulo. 1997, 43-58.
- LEEB, B.F.; SCHWEITZER, H.; MONTAG, K.; SMOLEN, J.S. **A meta-analysis of chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis**. Arzneimittel-Forsch, 1998, 41, S198 (993).
- LEMONICA, I., P. **Embriofetotoxicidade**. Fundamentos de Toxicologia. Ed. Ateneu. São Paulo. 1996, 86-94.
- LUST, G.; WILLIAMS, A., J.; BURTON-WURSTER, N., et al. **Effects of intramuscular administration of glycosaminoglycan polysulfates on signs of incipient hip dysplasia in growing pups**. Am J Vet Research. 1992, 53: 1836-1843.
- MAHAFFEY, E., A.; MOORE, J., N.; **Erithrocyte agglutination associated with heparin treatment in three horses**. Journal American Veterinarians Med. Assoc. 1986; 189: 1478-1480.
- MANLEY, P., A. **Treatment of degenerative joint disease**. In: BONAGUA, J., D.; KIRK, R., W.; eds. **Kirk's Current Veterinary Therapy XII**. Philadelphia: W. B. Saunders Co, 1995, 1196-1199.
- MAZIERES, B.; LOYAU, G.; MENKES, C.; VALAT, J.; DREISIER, R.; CHARLOT, A.; MASOUNABLE-PUYANNE, A. **Revist Rheum. Mal. Osteoartic**. 59,466, 1992. In: **Glucosamine and chondroitin sulfates in the treatment of osteoarthritis: a survey**. De los REYES, G.C.; KODA, R. T.; LIEN, E.J. Progress in Drug Research, vol 55, 2000. Birkhäuser Verlag, Basel (Switzerland)

- McALINDON, T.E.; GULIN, J.; FELSON, D.T. **Glucosamine (GL) and chondroitin (CH) treatment for osteoarthritis (OA) of the knee or hip: meta-analysis and quality assessment of clinical trials.** *Arzneim-Forsch.*, 1998, 41, S198 (994).
- McNAMARA, P.S.; STEPHEN, C.B.; HOLLINS, N.E. **American Journal Veterinary Research**, vol 57, n° 9, 1390-1394, September 1996.
- McDONALD, M.H.; STOVER, S.M.; WILLITS, N.H., et al. **Regulation of matrix metabolism in equine cartilage explant cultures by interleukin-1.** *American Journal Veterinary Research*. 1992, 53: 2278-2285.
- MORREALE, P.; MANOPULO, R.; GALATI, M.; BOCCANERA, L.; SAPONATI, G.; BOCCHI, L. **Journal Rheumatology**, 23, 1385, 1996. In: **Glucosamine and chondroitin sulfates in the treatment of osteoarthritis: a survey.** De los REYES, G.C.; KODA, R. T.; LIEN, E.J. *Progress in Drug Research*, vol 55, 2000. Birkhäuser Verlag, Basel (Switzerland).
- NEUBERT, D.; KAVLOCK, R.J.; MERKER, H.J.; KLEIN, J. **Risk assesement of prenatally – induced adverse health effects.** Berlin; Springer – Verlag, 1996. 565p.
- OLIVIERO, U.; SORRENTINO, H.; DE PAOLA, P.; TRANFAGLIA, E.; D'ALESSANDRO, A.; CARIFI, S.; PORFIDO, F.; CERIO, R.; GRASSO, A.; POLICICCHIO, D. **Drugs Expl. Clinical Research**. 17,45, 1991.
- PALMIERI, L.; CONTE, A.; GIOVANNI, L.; LUALDI, P.; RONCA, G. **Metabolic fate of exogenous chondroitin sulfate in the experimental animal.** *Arzneim. Forsch.* 40 (I), 319, 1990.
- PALMOSKI, M.; BRANDT, K.; **Arthritis Rheumatology**. 23, 1010 (1980).
- PAROLI, E.; ANTONILLI, L.; BIFFONI, M. **Drugs Exptl. Clin. Res.** 17, 9 (1991). In: **Glucosamine and chondroitin sulfates in the treatment of osteoarthritis: a survey.** De los REYES, G.C.; KODA, R. T.; LIEN, E.J. *Progress in Drug Research*, vol 55, 2000. Birkhäuser Verlag, Basel (Switzerland).
- PIERRE, P. **Rapport d'expertise pharmacologique de la spécialité pharmaceutique LG 337 (dénomination provisoire).** In: **Biochemical Basis of the Pharmacologic Actino of Chondroitin Sulfates on the Osteoarticular System.** *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, vol. 31, n°1 (August), 2001, 58-68.
- PIPITONE, V., R. **Chondroprotection with chondroitin sulfate.** *Drugs Expl. Clinical Research*. 1991. 17(1) 3-7.
- REDDY, G.K.; DHAR, S.C. **Metabolism of glycosaminoglycans in tissues of adjuvant arthritic rat.** *Molecular and Cellular Biochemistry*, 106: 117-124, 1991.
- REYES, G., C.; KODA, R., T.; LIEN, E., J. **Glucosamine and chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis: a survey.** *Progress in Drug Research*. Vol 55, 81-103, 2000. Birkhäuser Verlag, Basel (Switzerland).

- RINSHO, K. **Clinical Report**. Vol. 1. 1960.
- ROBENS, J. F., 1968. **Teratogenic effects of carbaryl and other pesticides in the hamster, the rabbit, and the guinea pig**. *Toxicology Applied Pharmacology*, 12, 294. In: *Methods in Prenatal Toxicology*, NEUBERT, D., MERKER, H. J., KWASIGROCH, T. E., 1977, Berlin.
- ROVETTA, G. **Drugs Explt. Clin. Res.** 17, 53, 1991. In: **Glucosamine and chondroitin sulfates in the treatment of osteoarthritis: a survey**. De los REYES, G.C.; KODA, R. T.; LIEN, E.J. *Progress in Drug Research*, vol 55, 2000. Birkhäuser Verlag, Basel (Switzerland).
- SAKAI, S.; AKIYAMA, H.; HARIKAI, N.; TOYODA, H.; TOIDA, T.; MAITANI, T.; IMANARI, T. **Effect of chondroitin sulfate on murine splenocytes sensitized with ovalbumin**. *Immunology Letters*, vol. 84, issue 3, 3 December 2002, 211-216.
- SHAW, D.; IHLE, S., L. **Medicina interna de pequenos animais**. Editora Artmed, Porto Alegre, 1999, 483-494.
- SHEN, B.; SHIMMON, S.; SMITH, M.M.; GHOSH, P. **Biosensor analysis of the molecular interactions of pentosan polysulfate and of sulfated glycosaminoglycans with immobilized elastase, hyaluronidase and lysozyme using surface plasmon resonance (SPR) technology**. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Article in Press. Disponível on line, 19 December 2002 (<http://www.sciencedirect.com/science>).
- SMALLEY, H. E., CURTIS, J. M., EARL, F. L., 1968. **Teratogenic action of carbaryl in beagle dogs**, *Toxicology Applied Pharmacology*, 13, 392-403. In: *Methods in Prenatal Toxicology*, NEUBERT, D., MERKER, H. J., KWASIGROCH, T. E., 1977, Berlin.
- SOLECKI, R. **Harmonisation of rat fetal skeletal terminology and classification report of the third workshop on the terminology in developmental toxicology**. *Reproductive Toxicology*. Vol 15, issue 6, November-december 2001, 713-721.
- SOUZA, C.A.M.; CARVALHO, R.R.; KURIYAMA, S.N.; ARAUJO, R.P.; VOLLMER, R.S.; ALVES, E.N.; PAMGARTTEN, F.J.R. **Study of the embryofeto-toxicity of crow-of-thorns (*Euphorbia milii*) latex, a natural molluscicide**. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, vol. 30, 1325-1332, 1997.
- SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.M., BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2 ed, Guanabara Koogan, 1999, 566-574.
- SUE, T. In: N. M. Mc DUFFIE (ed): **Heparin: Structure, cellular functions and clinical applications**, Academi Press, New York, 1979.
- TAYLOR; W. R.; VAN DIKE; G. C.; **Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study**, *Cybian* v.9 (2), p.107-119, 1985.
- THOMAS, J.A. **Toxic responses of the reproductive system**. In: KLASSEN, C.D., 5 ed. *Toxicology- The Basic Science of Poisons*. New York, 1989.

- TODHUNTER, R., J.; LUST, G. **Polysulfated glycosaminoglycan in the treatment of osteoarthritis.** J. Am. Vet. Med. Assoc. 1994, 204: 1245-1251
- TOWHEED, T.; McALINDON, T.; GULI, J.; FELSON, D. **Arthrit. Rheum.** 41, S198 (1998).
- UEBELHART, D.; THONAR, E.; DELMAS, P.; CHANTRAINE, A.; VIGNON, E. **Osteoarthritis Cartilage**, 6 S39-46, 1998. In: **Glucosamine and chondroitin sulfates in the treatment of osteoarthritis: a survey.** De los REYES, G.C.; KODA, R. T.; LIEN, E.J. Progress in Drug Research, vol 55, 2000. Birkhäuser Verlag, Basel (Switzerland).
- VASSEUR, P. B.; JOHNSON, A. L.; BUDSBERG, S. C.; **Randomized, controlled trial of the efficacy of carprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in the treatment of osteoarthritis in dogs.** JAVMA.. 206:807-811, 1995.
- VERBRUGGEN, G; GOEMAERE, S.; VEYS, E. **Osteoarthritis Cartilage**, 6, 37-38, 1998. In: **Glucosamine and chondroitin sulfates in the treatment of osteoarthritis: a survey.** De los REYES, G.C.; KODA, R. T.; LIEN, E.J. Progress in Drug Research, vol 55, 2000. Birkhäuser Verlag, Basel (Switzerland).
- WEBB, G.N.; BYRD, R.A. **Simultaneous differential staining of cartilage and bone in rodent fetuses: an alcian blue and alizarin red S procedure without glacial acetic acid.** Biotechnic & Histochemistry, vol. 69, n^o4, 181-185, 1994.
- WEBSTER, W., S.; FREEMAN, J., A., D. **Is this drug safe in pregnancy?** Reproductive Toxicology. Vol. 15, issue 6, November-december, 2001, 619-629.
- WEIL, C. S., WOODSIDE, M. D., BERNARD, J. B., CONDRA, N. I., CARPENTER, S. P., 1972. **Studies on rat reproduction and guinea pig teratology of carbaryl fed in the diet vs. stomach intubation.** Toxicology and Applied Pharmacology, 22, 318. In: **Methods in Prenatal Toxicology**, NEUBERT, D., MERKER, H. J., KWASIGROCH, T. E., 1977, Berlim.
- WHO – World Health Organization. **Guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines**, 1993.
- WILSON, J. G., 1971. **Use of rhesus monkeys in teratological studies.** Fed. Proc. 30, 104-109. In: **Methods in Prenatal Toxicology**, NEUBERT, D., MERKER, H. J., KWASIGROCH, T. E., 1977, Berlim.
- WILSON, J. G., FRADKIN, R., 1969. **Comparison of teratogenic sensitivity of rats and rhesus monkeys.** Teratology, 2, 272. In: **Methods in Prenatal Toxicology**, NEUBERT, D., MERKER, H. J., KWASIGROCH, T. E., 1977, Berlim.
- WOESSNER, J., F., Jr.; HOWELL, D., S.; eds. **Joint cartilage degradation: basic and clinical aspects.** New York: Marcel Dekker Inc., 1993.

WOLF, H.; NOWAK, H.; WICK, G. **Detection of antibodies interacting with glycosaminoglycan polysulfate in patients treated with heparin or other polysulfate glycosaminoglycans.** Int Arch Allergy Appl Immunol. 1983, 70:157-163.

www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/doc008.pdf (acessado 06/03)

www.meadjohnson.com.br/enfanews/01/nutra.asp (acessado 06/03)

www.fisterra.com/guias2/medicamentos/embarazo.htm (acessado 06/03)