

PEDRO LUIZ RODRIGUES GUEDES

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DO CONDRITIM SULFATO NOS ESTÁGIOS
INICIAIS DE COLESTASE EXTRA-HEPÁTICA**

Juiz de Fora

2013

Pedro Luiz Rodrigues Guedes

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DO CONDROITIM SULFATO NOS ESTÁGIOS
INICIAIS DE COLESTASE EXTRA-HEPÁTICA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, da
Universidade Federal de Juiz de
Fora, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Dr. Jair Adriano Kopke de Aguiar

Juiz de Fora

2013

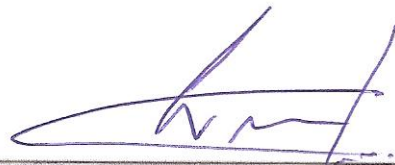
**ATIVIDADE BIOLÓGICA DO CONDROITIM SULFATO NOS ESTÁGIOS
INICIAIS DE COLESTASE EXTRA-HEPÁTICA**

Pedro Luiz Rodrigues Guedes

DR. JAIR ADRIANO KOPKE DE AGUIAR

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

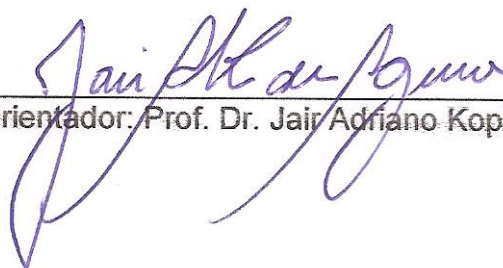
Aprovada em 30/07/2013



Prof. Dr. Ivarne Luis dos Santos Tersariol



Profa. Dra. Beatriz Julião Vieira Aarestrup



Orientador: Prof. Dr. Jair Adriano Kopke de Aguiar

Aos meus pais pelo exemplo
e pela dedicação na minha
educação.

AGRADECIMENTOS

Ao Jair pela amizade, confiança e ensinamentos nesses 6 anos de laboratório, sendo grande responsável pelo meu interesse científico;

À professora Doutora Márcia Regina Nagaoka por acreditar em nosso trabalho e possibilitar a realização do modelo, sempre com disposição e prontidão em nos ajudar. Estendo também a seus alunos pela colaboração nos experimentos;

À professora Doutora Christina Castañon pela disposição, nos ajudando na análise histopatológica dos tecidos;

À professora Doutora Valquíria pelas sugestões e experiência científica passada em nossa convivência;

Ao André por estar sempre à disposição para ajudar e pela conversa na hora certa;

Ao Gustavo pela amizade nos últimos anos e por ter ajudado no desenvolvimento de metodologias utilizadas no trabalho;

Ao Giovani pela presteza e auxílio em todas as vezes em que precisei ir a São Paulo;

Ao Edvaldo pelo auxílio na realização do trabalho;

A todos os colegas que passaram pelo laboratório nos últimos anos pelos momentos de trabalho e diversão que dividimos;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas;

Aos colegas de pós-graduação pela convivência e divisão de experiências;

À Nicole pela compreensão nos vários momentos de ausência e força e paciência durante estes 2 anos de pós-graduação;

Aos grandes amigos que sempre estiveram ao meu lado;

À minha família, sempre motivo de alegria, tornando cada etapa da minha vida mais fácil de ser realizada.

À CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

Condroitim sulfato (CS) é um glicosaminoglicano (GAG), presente na matriz extracelular (MEC) de vários tecidos de mamíferos, utilizado para o tratamento da osteoartrite e, recentemente, tem despertado grande interesse devido ao seu potencial anti-inflamatório. Vários modelos experimentais *in vivo* de inflamação são empregados para o estudo da atividade anti-inflamatória, entre eles o modelo de fibrose induzida por colestase extra-hepática. A colestase produz lesão hepatocelular com edema do trato portal, infiltrado leucocitário, proliferação de células epiteliais biliares e fibrose do trato portal. O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos do CS no modelo de colestase extra-hepática experimental induzido por laqueadura do ducto biliar (BDL) em ratos Wistar. Para isso foram utilizados animais (n = 82) de 6 a 8 semanas de idade eutanasiados 2, 7 ou 14 dias após o procedimento cirúrgico divididos nos grupos: BDL, BDL tratado com CS, *Sham* e *Sham* tratado com CS. Foram avaliados peso corporal e do fígado dos animais, concentrações séricas de bilirrubina direta (BD), globulinas, atividades de gama glutamil transpeptidase (Gama GT), fosfatase alcalina (FA), alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST), alterações morfológicas no tecido, atividade de mieloperoxidase (MPO), atividade de metaloproteases (MMP-9, MMP-2 e pró MMP-2) e conteúdo de GAGs no fígado dos animais, além da análise histopatológica do tecido hepático. O CS obtido para a realização do trabalho apresentou teores superiores a 92%, com peso molecular de aproximadamente 40 kDa e um conteúdo dissacarídico com predominância de Δ di4S (65%). BDL gerou vários sintomas relacionados à lesão celular e ao processo inflamatório como aumento dos níveis séricos de BD e globulinas, aumento das atividades de Gama GT, FA, ALT e AST, infiltrado inflamatório e modificação morfométrica, com proliferação ductular, e na MEC do fígado dos animais induzidos. CS levou a redução do aumento inicial das transaminases indicando proteção dos tecidos lesados no procedimento cirúrgico. O tratamento levou à redução do infiltrado inflamatório no tecido, expresso pela diminuição significativa da atividade de MPO no homogenato. A remodelação tecidual também foi reduzida, havendo diminuição da atividade de MMP-9, pró MMP-2 e MMP-2 e ainda dos níveis dos GAGs dermatam sulfato e heparam sulfato presentes, produzidos por células estreladas em resposta ao dano no tecido. Estes resultados mostram que o CS reduziu os efeitos da lesão hepática do modelo e foi capaz de retardar a fibrogênese hepática.

PALAVRAS-CHAVE: Condroitim sulfato. Inflamação. Matriz extracelular. Ligação do ducto biliar. Hepatoproteção.

ABSTRACT

Chondroitin sulfate (CS) is a glycosaminoglycan (GAG) present in the extracellular matrix (ECM) of many mammalian tissue, used for osteoarthritis treatment and, recently, has aroused great interest due to its anti-inflammatory potential. Several *in vivo* inflammation experimental models are employed to study anti-inflammatory activity, including extra-hepatic cholestasis induced fibrosis. Cholestasis produces hepatocellular injury with portal tract edema, leukocyte infiltration, biliary epithelial cells proliferation and portal tract fibrosis. The aim of this work was to analyze CS effects on an extra-hepatic cholestasis experimental model induced by bile duct ligation (BDL) on Wistar rats. For this purpose 6 to 8 weeks old animals (n = 82) were euthanized 2, 7 or 14 days after surgical procedure, previously divided into groups: BDL, CS treated BDL, Sham, CS treated Sham. To analyze disease evolution body and liver weight, serum concentrations of direct bilirubin (BD), globulins, activities of gamma glutamyl transferase (Gama GT), alkaline phosphatase (FA), alanine and aspartate aminotransferases (ALT and AST), morphological changes on tissue, mieloperoxidase (MPO) activity, matrix metalloproteinases (MMP-9, pró MMP-2 and MMP-2) activities and liver GAGs content, besides histopathological analysis of the tissue. CS acquired presented over 92% tenor, molecular weight of approximately 40 kDa and disaccharide content of Δ di4S predominantly (65%). BDL caused many symptoms related to cellular damage and inflammatory process such as increasing BD and globulins, elevation of Gama GT, FA, ALT and AST activities, inflammatory infiltrate and changes on liver morphometry, with ductular proliferation, and on the ECM. CS reduced initial burst on aminotransferases, indicating protection of tissues injured on surgery procedure. Treatment led to reduction of inflammatory infiltrate, showed by significant decreasing on MPO activity. Tissue remodeling was also reduced, with decrease of MMP-9, pro MMP-2 and MMP-2 activities and also of GAGs dermatam sulfate and heparam sulfate levels, produced by hepatic stellate cells in response of tissue damage. These results show that CS reduced cholestasis hepatic injury effects, being capable to slow down liver fibrogenesis.

KEY-WORDS: Chondroitin sulfate. Inflammation. Extracellular matrix. Bile duct ligation. Hepatoprotection.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Esquema da composição típica de diferentes famílias de glicosaminoglicanos. Adaptado de ESKO <i>et al.</i> (2009) | 18 |
| Figura 2. Estrutura dos dissacarídeos formadores dos diferentes tipos de condroitim sulfato. Adaptado de MIKAMI e KITAGAWA (2013). | 19 |
| Figura 3. Fluxo sanguíneo no lóbulo hepático. (A) Esquema do fluxo sanguíneo dentro de um lóbulo hepático - Adaptado de ARIAS <i>et al.</i> (2009); (B) Veia centrolobular e (C) Espaço porta corados com sistema Hematoxilina-Eosina, visualizados em aumento de 40x – Adaptado de JUNQUEIRA e CARNEIRO (2008) | 22 |
| Figura 4. Tipos celulares encontrados no tecido hepático. <i>Portal triad</i> : espaço porta (ducto biliar, vênula portal e arteríola hepática); KC: Células de Kupffer; HSC: Células estreladas hepáticas. Fonte: HERNANDEZ-GEA e FRIEDMAN (2011). | 24 |
| Figura 5. Cascata de regulação do processo inflamatório. Adaptado de: VALLIERES e DU SOUICH (2010) | 29 |
| Figura 6. Eletroforese em gel de agarose em tampão PDA 0,05 M (pH 9,0) de condroitim sulfato comercial (CS_{com}). 1 – Padrão de Glicosaminoglicanos; 2 - 1 μ g da base seca de CS_{com} ; 3 - 2 μ g da base seca de CS_{com} ; 4 - 3 μ g da base seca de CS_{com} ; 5 - 4 μ g da base seca de CS_{com} ; 6 - 5 μ g da base seca de CS_{com} ; 7 - 5 μ g da base seca de CSS1. CS - Condroitim Sulfato; DS - Dermatom Sulfato; HS - Heparom Sulfato; O - origem. | 43 |
| Figura 7. Linearidade das amostras de concentrações diferentes aplicadas na eletroforese em gel de agarose em tampão PDA..... | 43 |
| Figura 8. Gel de Poliacrilamida para Peso Molecular. Amostras (20 μ g) foram analisadas em gel de poliacrilamida 7,5% corado com azul de toluidina 0,1%. 1 – Dextram sulfato (8kDa); 2 – Condroitim 4-sulfato (26 kDa); 3 – Condroitim 6-sulfato (67 kDa); 4, - CS_{com} ; 5 – CS_{com} β -eliminado. | 44 |
| Figura 9. Espectro de absorção do CS_{com} , CSS1 e CSS2 na região do ultravioleta (1 mL, 1 mg/mL). Varredura realizada em faixa de comprimento de onda de 190 a 400 nm (600 nm/s). Os números representam os picos de cada um dos espectros (nm)..... | 45 |

Figura 10. Degradação e análise enzimática de amostra de CS_{com}. (A) Eletroforese em gel de agarose em tampão PDA 0,05 M (pH 9,0) de incubação de Chase AC e CS_{com}. 1 – Mistura de padrões de GAGs; 2 – CS_{com}; 3 – CS_{com} incubado com Chase AC. (B) Eletroforese de Carboidratos Assistida por Fluoróforos (FACE) em tampão Tris-Glicina (pH 8,8). 1 – Padrão de dissacarídeos; 2 – CS_{com}; 3 – CS_{com} incubado com Chase AC..... 47

Figura 11. Alteração do peso dos animais BDL sem tratamento. (A) Variação de peso dos animais falso-operados (*Sham*) e operados (BDL) nos diversos dias de experimento. (B) Razão peso do fígado/peso do corpo do animal em cada grupo estudado. 50

Figura 12. Alteração do peso dos animais *Sham* tratados. (A) Variação de peso dos animais falso-operados tratados (*Sham*_{CScom}) e não tratados (*Sham*) nos diversos dias de experimento. (B) Razão peso do fígado/peso do corpo do animal em cada grupo estudado. 51

Figura 13. Alteração no peso dos animais BDL tratados. (A) Variação de peso dos animais operados tratados (BDL_{CScom}) e não tratados (BDL) nos diversos dias de experimento. (B) Razão peso do fígado/peso do corpo do animal em cada grupo estudado. 52

Figura 14. Dosagens bioquímicas no soro dos animais dos grupos *Sham* e BDL. Níveis séricos de diversos parâmetros relacionados à lesão hepática, como: (A) Bilirrubina Direta; (B) Alanina Aminotransferase; (C) Aspartato Aminotransferase; (D) Fosfatase Alcalina; (E) Gama glutamil transpeptidase; (F) Globulinas..... 54

Figura 15. Dosagens bioquímicas no soro dos animais dos grupos *Sham* e *Sham*_{CScom}. Níveis séricos de diversos parâmetros relacionados à lesão hepática, como: (A) Bilirrubina Direta; (B) Alanina Aminotransferase; (C) Aspartato Aminotransferase; (D) Fosfatase Alcalina; (E) Gama glutamil transpeptidase; (F) Globulinas. 56

Figura 16. Dosagens bioquímicas no soro dos animais dos grupos BDL e BDL_{CScom}. Níveis séricos de diversos parâmetros relacionados à lesão hepática, como: (A) Bilirrubina Direta; (B) Alanina Aminotransferase; (C) Aspartato Aminotransferase; (D) Fosfatase Alcalina; (E) Gama glutamil transpeptidase; (F) Globulinas..... 57

| | |
|--|----|
| Figura 17. Cortes histológicos do fígado dos animais dos diferentes grupos do trabalho (H&E - 200x). As setas indicam pontos característicos de proliferação ductular no tecido. | 59 |
| Figura 18. Cortes histológicos do fígado dos animais dos diferentes grupos do trabalho (H&E - 400x). Cada corte mostra um espaço porta do fígado do animal, sendo possível a visualização da vênula portal, artéria hepática e ductos biliares. As setas indicam a presença de infiltrado neutrofílico no tecido. | 60 |
| Figura 19. Atividade específica de mieloperoxidase no fígado de animais após 2 dias. | 63 |
| Figura 20. Atividade específica de mieloperoxidase no fígado de animais após 7 dias. | 63 |
| Figura 21. Atividade específica de mieloperoxidase no fígado de animais após 14 dias. | 64 |
| Figura 22. Atividade de metaloproteases (MMPs) nos animais com 2 dias de experimento. | 66 |
| Figura 23. Atividade de metaloproteases (MMPs) nos animais com 7 dias de experimento. | 67 |
| Figura 24. Atividade de metaloproteases (MMPs) nos animais com 14 dias de experimento. | 69 |
| Figura 25. Glicosaminoglicanos presentes no fígado dos animais com 2 dias. | 70 |
| Figura 26. Glicosaminoglicanos presentes no fígado dos animais com 7 dias. | 71 |
| Figura 27. Glicosaminoglicanos presentes no fígado dos animais com 14 dias. | 72 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Classificação dos achados histológicos em lâmina corada por H&E..... | 38 |
| Tabela 2. Determinação do Teor de Condroitim Sulfato por Ácido Urônico..... | 42 |
| Tabela 3. Dados descritivos dos animais utilizados no trabalho..... | 49 |
| Tabela 4. Análise histopatológica semi-quantitativa de fígado nos diferentes grupos do trabalho..... | 58 |
| Tabela 5. Atividade específica de mieloperoxidase (MPO)..... | 62 |
| Tabela 6. Atividade de metaloproteases de matriz (MMPs)..... | 65 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|--|
| μ | Micra |
| Abs | Absorbância |
| ALT | Alanina aminotransferase |
| AMAC | 2-aminoacridona |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| AST | Aspartato aminotransferase |
| BD | Bilirrubina direta (fração conjugada) |
| BDL | Laqueadura do ducto biliar comum |
| BDL _{CS} | Grupo BDL tratado |
| BI | Bilirrubina indireta (fração não-conjugada) |
| Cl | Cloro ou cloreto |
| cm | Centímetro |
| COX | Ciclooxigenase |
| CS | Condroitim sulfato |
| CS _{com} | Condroitim sulfato comercial |
| CSS1 | Condroitim sulfato padrão Sigma 1 |
| CSS2 | Condroitim sulfato padrão Sigma 2 |
| CTAB | Brometo de cetil trimetil amônio |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DS | Dermatam sulfato |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| ERK ½ | Quinase extracelular ½ regulada por sinal |
| ϵ | Coeficiente de extinção molar |
| FA | Fosfatase alcalina |
| FACE | <i>Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis</i> |
| GAG | Glicosaminoglicano |
| GalNAc | N-acetil galactosamina |
| Gama GT | Gama glutamil transpeptidase |
| GlcA | Ácido glucurônico |
| h | Hora |
| H&E | Hematoxilina-Eosina |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrogênio |
| HA | Ácido hialurônico |
| HS | Heparam sulfato |

| | |
|-----------------------|---|
| i.p. | Intraperitoneal |
| II | Infiltrado inflamatório |
| IKK | Quinase do inibidor I κ B α |
| IL | Interleucina |
| I κ B α | Inibidor de translocação do NF- κ B |
| JNK | Quinase c-Jun NH ₂ -terminal |
| kDa | Quilodalton |
| kg | Quilograma |
| kHz | Quilohertz |
| L | Litro |
| ln | Logaritmo natural |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| M | Mol/L |
| mA | Miliampère |
| MEC | Matriz extracelular |
| mg | Miligrama |
| min | Minuto |
| mM | Milimol/L |
| mm | Milímetros |
| MMP | Metaloprotease de matriz |
| MPO | Mieloperoxidase |
| Na | Sódio |
| NF- κ B | Fator de transcrição nuclear <i>kappa</i> B |
| nm | Nanômetro |
| NOS2 | Óxido nítrico sintase |
| OA | Osteoartrite |
| P38MAPK | Quinase p38 ativada por mitógeno |
| PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida |
| PD | Proliferação ductular |
| PDA | Tampão 1,3-diaminopropano acetato |
| PG | Proteoglicano |
| PGCS | Proteoglicano de condroitim sulfato |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| PLA2 | Fosfolipase A2 |
| PMN | Polimorfonuclear |
| PRR | Receptores reconhecedores de padrão |

| | |
|---------------------------|--|
| QS | Queratam sulfato |
| R _f | Fator de retenção |
| RPM | Rotações por minuto |
| s | Segundo |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| <i>Sham</i> _{CS} | Grupo <i>Sham</i> tratado |
| TCA | Ácido tricloro-acético |
| TGI | Trato gastrintestinal |
| TNF | Fator de necrose tumoral |
| UD | Unidade densitométrica |
| UE | Unidade enzimática |
| UV | Ultravioleta |
| V | Volts |
| Zn | Zinco |
| Δdi0S | 2-acetamido-2-deoxi-3-O-(ácido β-D-gluco-4-enepiranosil urônico)-Dgalactose, ou dissacarídeo insaturado não sulfatado |
| Δdi4S | 2-acetamido-2-deoxi-3-O-(ácido β-D-gluco-4-enepiranosil urônico)-4-O-sulfo-D-galactose, ou dissacarídeo insaturado 4-sulfatado |
| Δdi6S | 2-acetamido-2-deoxi-3-O-(ácido β-D-gluco-4-enepiranosil urônico)-6-O-sulfo-D-galactose, ou dissacarídeo insaturado 6-sulfatado |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 17 |
| 1.1 | GLICOSAMINOGLICANOS E PROTEOGLICANOS | 17 |
| 1.1.1 | Condroitim Sulfato | 19 |
| 1.2 | FÍGADO | 21 |
| 1.2.1 | Testes de Função Hepática | 25 |
| 1.2.2 | Doenças Hepáticas | 27 |
| 1.3 | INFLAMAÇÃO E PROCESSO INFLAMATÓRIO | 28 |
| 1.3.1 | Metaloproteases de Matriz | 30 |
| 1.3.2 | Mieloperoxidase | 30 |
| 2 | OBJETIVO | 32 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 33 |
| 3.1 | CONDROITIM SULFATO | 33 |
| 3.1.1 | Caracterização do Condroitim Sulfato | 33 |
| 3.2 | ANIMAIS | 36 |
| 3.2.1 | Delineamento Experimental e BDL | 36 |
| 3.2.2 | Avaliação de Parâmetros Bioquímicos | 38 |
| 3.2.3 | Análise Histológica | 38 |
| 3.2.4 | Extração e Análise de Glicosaminoglicanos | 38 |
| 3.2.5 | Atividade das Metaloproteases | 39 |
| 3.2.6 | Atividade de Mieloperoxidase | 40 |
| 4 | RESULTADOS | 41 |
| 4.1 | CARACTERIZAÇÃO DO CONDROITIM SULFATO COMERCIAL | 41 |
| 4.1.1 | Teor de Condroitim Sulfato | 42 |
| 4.1.2 | Eletroforese em Gel de Agarose em Tampão PDA | 42 |
| 4.1.3 | Eletroforese para Peso Molecular | 44 |
| 4.1.4 | Espectro de Absorção em Ultravioleta | 45 |
| 4.1.5 | Degradação Enzimática | 46 |
| 4.2 | EFEITO BIOLÓGICO DO CONDROITIM SULFATO | 48 |
| 4.2.1 | Caracterização do Modelo Experimental | 48 |
| 4.2.2 | Dosagens Bioquímicas | 53 |
| 4.2.3 | Análise Histológica | 58 |

| | | |
|-------|---------------------------------------|----|
| 4.2.4 | Atividade de Mieloperoxidase..... | 61 |
| 4.2.5 | Atividade de Metaloproteases | 64 |
| 4.2.6 | Conteúdo de Glicosaminoglicanos | 70 |
| 5 | DISCUSSÃO..... | 73 |
| 6 | CONCLUSÃO | 81 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 82 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 GLICOSAMINOGLICANOS E PROTEOGLICANOS

Glicosaminoglicanos (GAGs) são heteropolissacarídeos lineares com unidades dissacarídicas repetitivas, constituídas por uma hexosamina e por um açúcar não nitrogenado (ácido D-glucurônico, ácido L-idurônico ou D-galactose), unidos entre si por ligações glicosídicas. As unidades dissacarídicas podem estar esterificadas por grupos sulfatos, que juntamente com os grupamentos carboxílicos dos ácidos urônicos (açúcar não nitrogenado), conferem alta densidade de cargas negativas a esses polímeros (JACKSON *et al.*, 1991).

De acordo com o tipo de hexosamina, os GAGs podem ser divididos em galactosaminoglicanos, que incluem condroitim sulfato e dermatam sulfato, e em glucosaminoglicanos, a exemplo de heparam sulfato, heparina, queratam sulfato e ácido hialurônico. A hexosamina é sempre *N*-acetilada em condroitim sulfato, dermatam sulfato, ácido hialurônico e queratam sulfato, enquanto na heparina a glucosamina é geralmente *N*-sulfatada, e em heparam sulfato as duas substituições podem ocorrer. Além da classificação de acordo com o tipo de hexosamina, os GAGs ainda podem ser distinguidos de acordo com o açúcar não nitrogenado. Ácido D-glucurônico é o único encontrado em condroitim sulfato e ácido hialurônico; em dermatam sulfato, heparam sulfato e heparina, ácido D-glucurônico e ácido L-idurônico coexistem em proporções variadas; em queratam sulfato apresenta galactose. A presença de grupamentos sulfato em diferentes posições, bem como o tipo de ligação glicosídica intradissacarídica e interdissacarídica aumentam ainda mais a complexidade destas moléculas (SAMPAIO e NADER, 2006).

Os GAGs são formados por dois ou mais tipos de unidades dissacarídicas. Diferentes proporções entre esses dissacarídeos são encontradas nos GAGs de diferentes origens e, por isso, cada um deles se constitui numa família. A Figura 1 mostra as unidades mais frequentes de cada uma dessas famílias (ESKO *et al.*, 2009)

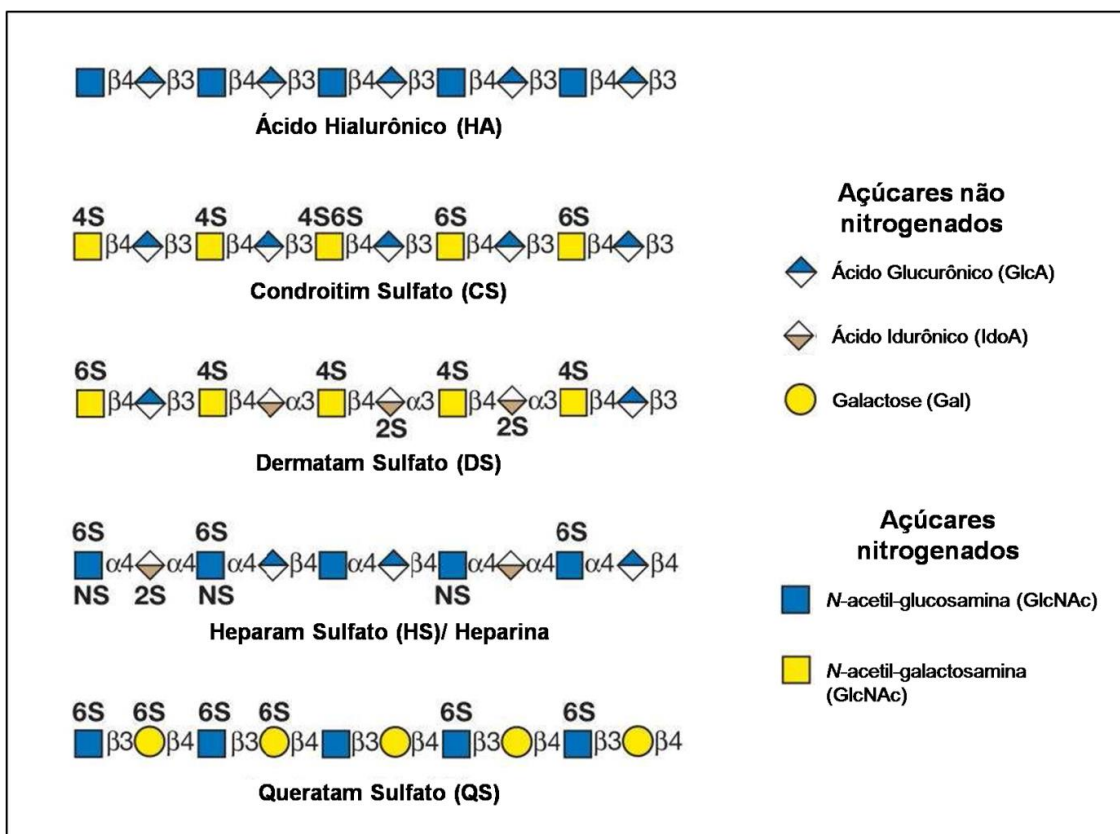


Figura 1. Esquema da composição típica de diferentes famílias de glicosaminoglicanos. Adaptado de ESKO *et al.* (2009)

Com exceção do ácido hialurônico, que ocorre nos tecidos como cadeia polissacarídica livre, os GAGs encontram-se covalentemente ligados a um esqueleto proteico, formando os proteoglicanos (PGs), os quais ainda podem conter oligossacarídeos *N*- e/ou *O*-ligados (LOHMANDER *et al.*, 1980).

Os PGs encontram-se largamente distribuídos nos tecido animais e podem ser classificados de acordo com o esqueleto proteico. São localizados na superfície celular compreendem as famílias do sindecam e glicicam, enquanto serglicim é encontrado em grânulos. Na matriz extracelular são encontrados vários tipos de PGs, como agrecam, versicam, decorim, biglicam, perlecam e agrim (IOZZO, 1998).

A ligação dos GAGs sulfatados ao esqueleto proteico, com exceção do queratam sulfato, se faz por meio do tetrassacarídeo ácido glucurônico-galactosil-galactosil-xilose (GlcA-Gal-Gal-Xil), onde a extremidade redutora se une à proteína por uma ligação do tipo *O*-glicosídica entre a xilose do tetrassacarídeo e a hidroxila de um resíduo de serina. A extremidade não redutora se liga à cadeia de GAG (SAMPAIO e NADER, 2006).

1.1.1 Condroitim Sulfato

Condroitim sulfato (CS) é um GAG encontrado em superfícies celulares e em matrizes extra e pericelulares na forma de PGs (PGCSs). Este polissacarídeo possui unidades dissacarídicas características $[(-4\text{GlcA}\beta 1 - 3\text{GalNAc}\beta 1-)_n]$, onde GlcA e GalNAc representam o ácido glucurônico e a *N*-acetilgalactosamina, respectivamente, sendo classificado como um galactosaminoglicano.

Apesar da composição de unidades constantes o CS apresenta heterogeneidade estrutural devido a várias enzimas biossintéticas como as glicosiltransferases GlcA transferase II e GalNAc transferase II, responsáveis pela adição de novos monossacarídeos e, conseqüentemente, pelo alongamento da cadeia, e sulfotransferases que adicionam grupos sulfato em diversas posições, principalmente C-2 dos resíduos de GlcA e C-4 e/ou C-6, formando estruturas com diferentes combinações de unidades dissacarídicas características. (Figura 2) (SILVA, 2006; MIKAMI e KITAGAWA, 2013).

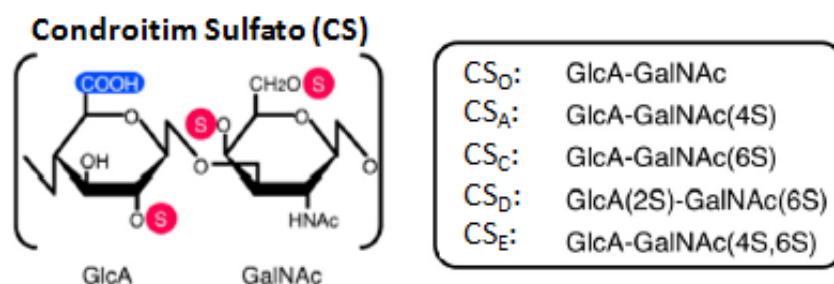


Figura 2. Estrutura dos dissacarídeos formadores dos diferentes tipos de condroitim sulfato. Adaptado de MIKAMI e KITAGAWA (2013).

A proporção dissacarídica da cadeia de CS varia de acordo com o tecido e a espécie estudada. Enquanto o CS extraído de plaquetas e tecidos cerebrais apresenta mais de 90% de unidades 4-sulfatadas (DIETRICH, C. P. *et al.*, 1978; NADER, 1991), a cartilagem de humanos adultos e de tubarão apresentam maior proporção (cerca de 85%) de dissacarídeos 6-sulfatados (MICHELACCI *et al.*, 1979; MICHELACCI e HORTON, 1989). Dissacarídeos com maiores graus de sulfatação podem ainda ser encontrados em outros animais de origem marinha. A produção comercial de CS assim como de outros

polissacarídeos naturais é proveniente de processos de extração e purificação de cartilagem de bovinos, suínos, aves e peixes cartilaginosos (SUZUKI *et al.*, 1968; VOLPI, 2007).

Diversas evidências indicam que, devido a esta variabilidade estrutural do CS, os PGCSs têm papel importante não somente em funções biológicas na inflamação, citocinese, proliferação celular, diferenciação, migração, morfogênese de tecidos, organogênese, mas também em processos patológicos incluindo desordens ósseas, formação de cicatrizes gliais após lesões cerebrais, infecções virais e bacterianas e reparo tecidual. (SUGAHARA e KITAGAWA, 2000; SUGAHARA *et al.*, 2003; VOLPI, 2011).

Na cartilagem articular, por exemplo, o agregam (importante PGCS presente neste tecido) é o maior responsável por retenção de água no tecido, o que pode ser atribuído às cargas negativas distribuídas na molécula. Esta função está diretamente associada ao grau de sulfatação dos dissacarídeos e ao tamanho da molécula (STYLIANOU *et al.*, 2006; MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2008).

Estas atividades se dão pela capacidade do CS de interagir com moléculas de matriz, fatores de crescimento, inibidores de protease, citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e fatores de virulência (VOLPI, 2011).

O CS é atualmente recomendado pela EULAR (*European League Against Rheumatism*) para o tratamento de OA de joelho e de mão, com base em metanálises de diversos estudos clínicos. Na Europa, as recomendações da EULAR para tratamento de OA de joelho classificaram o CS como evidência 1A, onde A representa o nível mais elevado para uma estratégia terapêutica (JORDAN, 2003). Estudos clínicos recentes demonstram que o CS pode apresentar efeitos que provocam a modificação do curso da doença, sendo capaz de parar sua progressão, e não apenas agir positivamente nos sintomas e déficit de mobilidade. (UEBELHART *et al.*, 2006; UEBELHART, 2008; KAHAN *et al.*, 2009).

Estes sacarídeos vêm sendo muito utilizados como suplementos nutricionais principalmente nos Estados Unidos, enquanto em países da Europa, Ásia e América Latina, seu uso como medicamento tem ganhado importância (ZHANG, W. *et al.*, 2008; ZHANG, Y. X. *et al.*, 2010). No Brasil o

CS é um medicamento registrado pela ANVISA, onde é denominado condroitina (DCB 02596) ou sulfato de condroitina (DCB 02597), sendo amplamente manipulado e comercializado no país por farmácias magistrais (MORETTO e DIAS, 2005).

Vários modelos *in vitro* e *in vivo* vêm sendo utilizados para o estudo da atividade do CS devido a sua potencial atividade anti-inflamatória. Um tecido muito utilizado para este fim é o fígado.

1.2 FÍGADO

Em humanos o fígado é o segundo maior órgão e a maior glândula, pesando entre 1,0 kg e 1,5 kg e situando-se no quadrante superior direito da cavidade abdominal, abaixo do diafragma. É o órgão no qual os nutrientes absorvidos no trato gastrointestinal (TGI) são processados e armazenados para utilização por outros órgãos sendo, portanto, uma interface entre o sistema digestivo e o sangue. O fígado recebe sangue de duas fontes; aproximadamente 20% é rico em oxigênio vindo da artéria hepática e 80% é rico em nutrientes e chega ao fígado pela veia porta, vindo do estômago, intestinos, pâncreas e baço (KASPER *et al.*, 2005; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

Por microscopia óptica o fígado está organizado em lóbulos, que são estrutura hexagonais em cuja periferia são encontradas tríades porta, constituídas de uma vênula porta, uma arteríola hepática e um ou dois ductos biliares, e no centro a veia centrolobular (Figura 3).

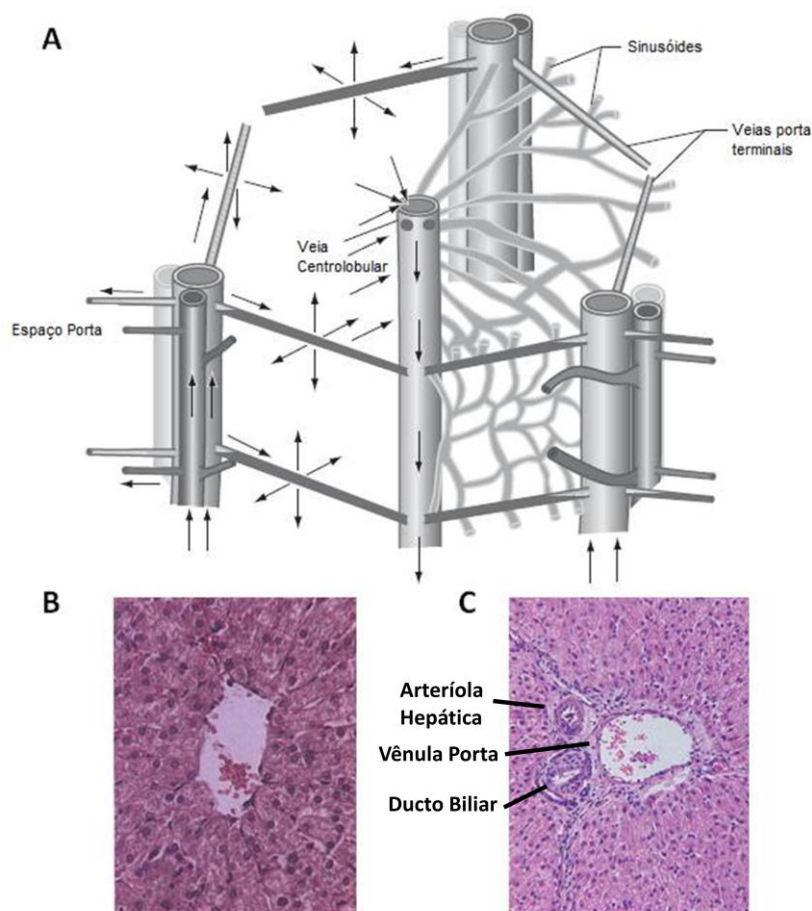


Figura 3. Fluxo sanguíneo no lóbulo hepático. (A) Esquema do fluxo sanguíneo dentro de um lóbulo hepático - Adaptado de ARIAS *et al.* (2009); (B) Veia centrolobular e (C) Espaço porta corados com sistema Hematoxilina-Eosina, visualizados em aumento de 40x – Adaptado de JUNQUEIRA e CARNEIRO (2008)

Funcionalmente, entretanto, este órgão está organizado em ácinos, onde cada ácino corresponde a uma porção de parênquima contendo um espaço porta como eixo. De acordo com a proximidade ao eixo porta o ácino é dividido em três zonas: zona 1, periportal; zona 2, mediozonal; zona 3 perivenular e devido ao afastamento progressivo das zonas em relação ao suprimento sanguíneo e ao mesmo tempo com aproximação das vênulas hepáticas, são encontradas características próprias em cada região (OHNO *et al.*, 2008).

A zona 1 é a região mais próxima da veia porta e da artéria hepática, e portanto mais agredida em situações de estresse; zona 2 está situada numa posição intermediária e a zona 3 em contato com as vênulas hepáticas, apresentando menor quantidade de oxigênio, porém, maiores quantidades de substâncias endógenas. As células sinusoidais também apresentam variação

zonal em relação à morfologia. As células encontradas na zona 1 são menores e tortuosas, com diâmetro maior e com forma mais alongada do que nas demais regiões. A perda desta heterogeneidade ocorre somente em situações patológicas, como a cirrose. Neste caso, o fígado em resposta à agressão crônica desenvolverá fibrose, formação de cicatrizes, distorção da arquitetura tecidual e alterações na vascularização, finalizando com a formação de nódulos de hepatócitos circundados por tecido fibroso (ARIAS *et al.*, 2009).

Além da heterogeneidade de função essas três zonas são acometidas de modo diverso nas diferentes lesões. Três ou mais ácinos simples formam os ácinos complexos, que agrupados formam o aglomerado acinar (KASPER *et al.*, 2005; BRASILEIRO FILHO, 2011).

O parênquima hepático é formado por hepatócitos, que constituem cerca de dois terços da massa desse órgão, organizando-se em cordões radiais com um ou dois hepatócitos de espessura, sustentados predominantemente por colágeno tipo IV. A estrutura do sinusóide hepático permite contato íntimo do sangue com os hepatócitos e as células sinusoidais. Entre o revestimento sinusoidal e os hepatócitos encontra-se o espaço de Disse, fazendo com que as microvilosidades do polo sinusoidal dos hepatócitos tenham acesso a metabólitos.

Outros importantes tipos celulares encontrados no tecido são as células de Kupffer e as células estreladas. As células de Kupffer são macrófagos residentes capazes de endocitar endotoxinas. Células estreladas (ou de Ito) estão localizadas no espaço de Disse e quando no estado quiescente servem como estoque de vitamina A, mas após sua ativação são responsáveis pela síntese e manutenção da MEC. Podem ser encontradas ainda *pit cells*, NK (*natural killers*) hepáticas fagocitárias de células lesadas, parasitas e células tumorais. Podem ainda ser encontradas células endoteliais; células dos vasos sanguíneos e células do ducto biliar (Figura 4) (KASPER *et al.*, 2005; BRASILEIRO FILHO, 2011).

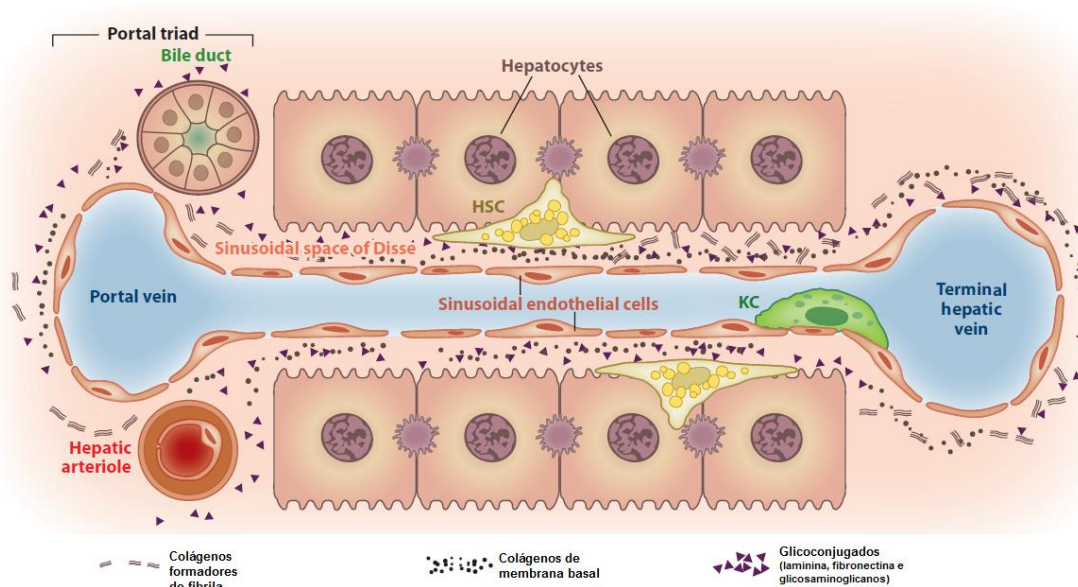


Figura 4. Tipos celulares encontrados no tecido hepático. *Portal triad*: espaço porta (ducto biliar, vênula portal e arteríola hepática); KC: Células de Kupffer; HSC: Células esteladas hepáticas. Fonte: HERNANDEZ-GEA e FRIEDMAN (2011).

Todos os nutrientes absorvidos pelo intestino chegam ao fígado pela veia porta, exceto os lipídeos complexos (quilomícrons), que são advindos da artéria hepática. A posição do fígado no sistema circulatório é ideal para captar, transformar e acumular metabólitos e para a neutralização e eliminação de substâncias tóxicas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

A eliminação ocorre na bile, que consiste principalmente de água, sais biliares, colesterol, um fosfolípido denominado lecitina, pigmentos biliares e vários íons, sendo uma secreção exócrina do fígado, importante para a digestão de lipídios por emulsificação. A bile entra nos ductos hepáticos direito e esquerdo que se unem para deixar o fígado como ducto hepático comum. O ducto hepático comum então se une ao ducto cístico da vesícula biliar e os dois formam o ducto colédoco. Este se une ao ducto pancreático, constituindo a ampola hepatopancreática que se abre no duodeno. Esta secreção é produzida no fígado, mas armazenada na vesícula biliar (TORTORA e GRABOWSKI, 2007).

A vesícula biliar é um saco em forma de pera localizada em uma depressão sob o fígado e sua túnica muscular consiste de fibras musculares lisas que se contraem após estímulos hormonais para ejetar o conteúdo no ducto cístico. Ela concentra e armazena a bile até que ela seja necessária no

intestino delgado, para onde ela vai pelo colédoco. Quando o intestino delgado está vazio um esfíncter em torno da ampola hepatopancreática se fecha e a bile retorna ao ducto cístico e à vesícula biliar para armazenamento. Quando os triglicerídeos penetram o intestino delgado, a colecistocina é liberada para estimular a contração da túnica muscular da vesícula biliar. A bile então é esvaziada no ducto colédoco para fluir no intestino delgado (KASPER *et al.*, 2005; TORTORA e GRABOWSKI, 2007).

O fígado de rato é constituído por três lobos (esquerdo, direito e caudado). Os lobos esquerdo e direito estão subdivididos num lobo medial e num lobo lateral. Entre os lobos hepáticos direito e esquerdo localiza-se dorsalmente um pequeno lobo caudado que se subdivide no processo papilar e no processo caudado. Ao contrário da maior parte dos mamíferos domésticos estes animais não possuem lobo quadrado nem vesícula biliar (TEIXEIRA, 2010).

Os hepatócitos desempenham numerosas funções vitais na manutenção da homeostase incluindo a síntese da maioria das proteínas séricas (albumina, proteínas carreadoras, fatores de coagulação, muitos fatores hormonais e de crescimento), produção de bile e seus carreadores (ácidos biliares, colesterol, lecitina, fosfolípidios), regulação de nutrientes (glicose, glicogênio, lipídeos, colesterol, aminoácidos) e metabolismo e conjugação de compostos lipofílicos (bilirrubina, ânions, cátions, drogas) para excreção na bile ou na urina. A avaliação dessas atividades é complicada devido à multiplicidade e variabilidade das funções, sendo necessárias outras análises para estudar a função hepática de um paciente (KASPER *et al.*, 2005).

1.2.1 Testes de Função Hepática

Vários testes bioquímicos são úteis na avaliação da função hepática, podendo ser utilizados para detectar a presença de uma doença, diferenciar os tipos de desordens, medir a extensão de uma patologia já conhecida e seguir a resposta ao tratamento do paciente. Estes testes do fígado geralmente sugerem a categoria da doença hepática, como hepatocelular ou colestática por exemplo direcionando assim as avaliações seguintes.

O fígado realiza milhares de funções bioquímicas, mas a maioria não pode ser medida facilmente por testes sanguíneos, portanto os testes laboratoriais podem medir apenas um número limitado destas funções. De fato, muitos testes como as aminotransferases e a fosfatase alcalina não medem a função renal, mas sim o dano celular e a interferência no fluxo biliar. Assim, nenhum teste permite o acesso adequado à capacidade funcional total do fígado, sendo necessária a realização de testes em bateria incluindo bilirrubina, aminotransferases, fosfatase alcalina, albumina e testes de tempo de protrombina (KASPER *et al.*, 2005).

A bilirrubina é um produto da quebra do anel porfirínico do heme, sendo encontrada no sangue em duas frações, conjugada e não-conjugada. A fração não-conjugada, também conhecida como bilirrubina indireta (BI), é insolúvel em água e está ligada à albumina sérica. A bilirrubina direta (BD - conjugada) é solúvel em água e pode, portanto, ser excretada pelos rins. A elevação da BI raramente está relacionada à doenças hepáticas, enquanto a elevação da BD quase sempre implica em doença do fígado ou do trato biliar. O passo limitante do metabolismo na bilirrubina não está relacionado à conjugação, mas sim ao transporte da bilirrubina conjugada pelos canalículos biliares. Na maioria dos casos, ambas as frações estão elevadas em doença hepática, sendo raro o fracionamento possibilitar a determinação da causa da icterícia (KASPER *et al.*, 2005; ARIAS *et al.*, 2009).

As alterações nas enzimas séricas podem refletir o dano a hepatócitos ou a colestase. As aminotransferases, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), são indicadores sensíveis de lesão das células hepáticas e muito úteis para a descoberta de doenças hepatocelulares agudas como a hepatite. A AST é encontrada no fígado, musculatura cardíaca, musculatura esquelética, rins, cérebro, pâncreas, pulmões, leucócitos e eritrócitos, em ordem decrescente de concentração. A ALT é encontrada principalmente no fígado. O aumento nos níveis séricos destas aminotransferases indica presença de dano na membrana celular hepática resultando em um aumento da permeabilidade, havendo, entretanto uma fraca correlação deste aumento com o grau de lesão (KASPER *et al.*, 2005).

As atividades da fosfatase alcalina (FA), 5'-nucleotidase e gama glutamil transpeptidase (Gama GT) estão geralmente elevadas na colestase. As duas primeiras são encontradas dentro ou próximas à membrana dos canalículos biliares, enquanto a última está localizada no retículo endoplasmático e nas células epiteliais do ducto biliar. Por ter uma distribuição mais difusa no fígado, a elevação da Gama GT é menos específica para a colestase.

A albumina sérica é sintetizada exclusivamente por hepatócitos e devido ao seu lento *turnover* ela não é um bom indicador de disfunção hepática aguda ou média, sendo observadas apenas pequenas alterações em condições agudas como hepatite viral, hepatotoxicidade relacionada a medicamentos ou icterícia obstrutiva.

As globulinas são um grupo de proteínas constituídas por gama globulinas produzidas por linfócitos B e alfa e beta globulinas produzidas principalmente por hepatócitos. As gama globulinas estão aumentadas em doenças hepáticas crônicas, como hepatite crônica e cirrose.

Quando alguns destes testes mostram anormalidades ou quando são encontradas anormalidades recorrentes a probabilidade de doença hepática é grande (KASPER *et al.*, 2005).

1.2.2 Doenças Hepáticas

No Brasil, entre janeiro de 2012 e janeiro de 2013, as doenças hepáticas foram responsáveis por quase 250 mil internações, levando a mais de 2 mil óbitos, o que gerou gastos superiores a 500 milhões de reais aos cofres públicos (BRASIL).

A fibrose hepática é uma cicatrização anormal em resposta a lesões persistentes no fígado iniciadas por diversos estímulos, como danos tóxicos, infecção viral, desordens metabólicas e abuso de álcool (LEE, U. E. e FRIEDMAN, 2011). Dentre os principais fatores que podem contribuir com a fibrogênese, a inflamação e o acúmulo MEC são reconhecidamente os agentes mais importantes.

Diversos agentes podem estar envolvidos na etiopatogênese da doença hepática como por exemplo a obstrução do trato biliar, que com uma

consequente colestase produz lesão hepatocelular e resposta inflamatória. Graus variáveis deste processo ocorrem em pacientes com doença hepática crônica (NAGAOKA *et al.*, 2011).

O acúmulo de sais biliares produz apoptose e necrose de hepatócitos. O fígado pode regenerar-se de uma grande perda celular, entretanto em muitas doenças crônicas a regeneração não consegue compensar a morte hepatocelular levando a cicatrizes fibróticas originadas pelas células estreladas, que substituem hepatócitos funcionais, comprometendo suas funções e eventualmente levando à falência hepática. Várias doenças hepáticas demonstram uma patofisiologia colestática como atresia biliar, cirrose biliar primária, hepatite B, hepatite alcoólica e hepatite autoimune. (MALHI *et al.*, 2006; LEE, S. *et al.*, 2008).

1.3 INFLAMAÇÃO E PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é uma resposta protetora iniciada pelo organismo após injúrias causadas por danos físicos ou por infecções por microrganismos. Consiste de respostas locais ou sistêmicas, sendo processo essencial com as funções de eliminar fatores nocivos, promovendo o reparo tecidual e a cicatrização (VOLPI, 2011).

Tanto em infecções causadas por bactérias, protozoários, fungos ou vírus, quanto nos casos de danos teciduais, ocorre a ativação de receptores reconhecedores de padrão (PRRs). Após ativados estes receptores levam a fosforilação e ativação de diversas enzimas como quinases extracelulares 1/2 reguladas por sinal (ERK 1/2), proteínas quinase p38 ativadas por mitógenos (p38MAPK) e quinases c-Jun NH₂-terminais (JNK) (Figura 5) (BRADLEY, J. R., 2008; CINEL e OPAL, 2009).

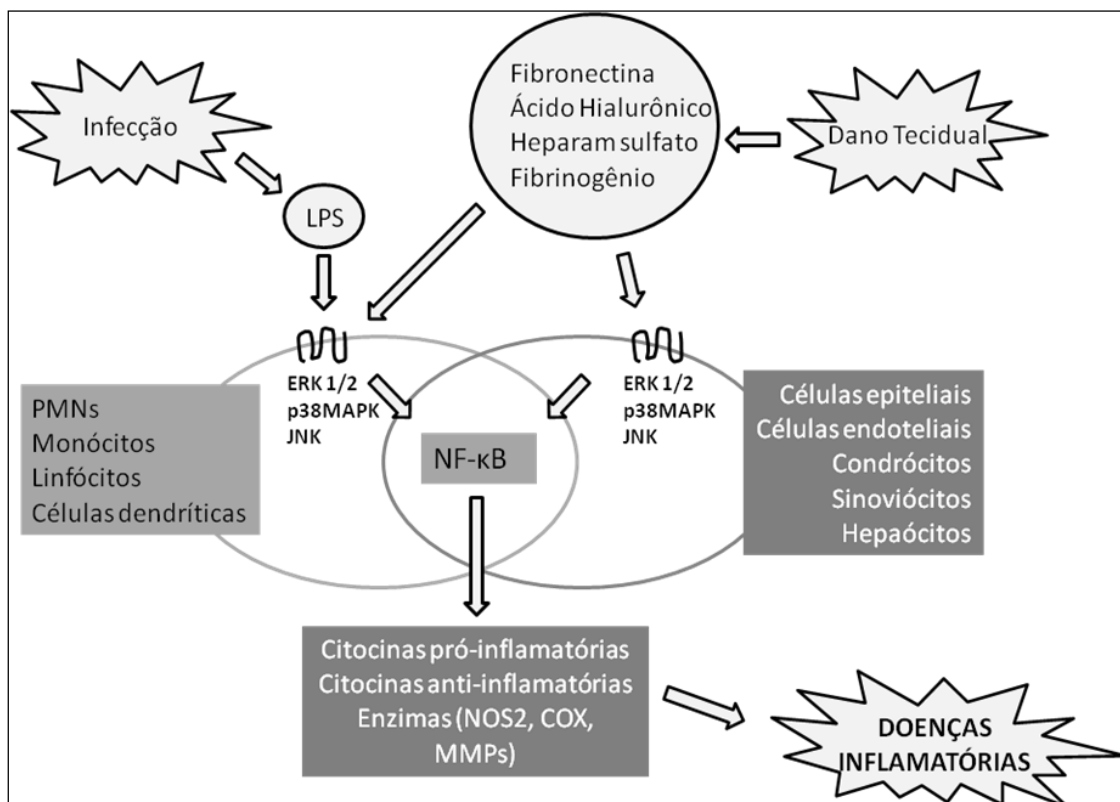


Figura 5. Cascata de regulação do processo inflamatório. Adaptado de: VALLIERES e DU SOUICH (2010)

Quando ativadas, essas enzimas fosforilam a quinase IκB (IKK) que por sua vez fosforila o inibidor κBα (IκBα). O IκBα forma um complexo com o heterodímero p65/p50 do NF-κB, impedindo sua movimentação para o núcleo. Quando fosforilado este inibidor é inativado o que libera a translocação nuclear do fator transcrricional onde é responsável pela regulação da transcrição de genes envolvidos na inflamação, imunidade, apoptose e proliferação e diferenciação celular (ZHONG e KYRIAKIS, 2007).

Como resultado da ligação do NF-κB aos genes, há um aumento na expressão de diversas proteínas como interleucina-1β (IL-1β), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral TNF-α e enzimas como óxido nítrico sintase (NOS2), ciclooxigenase 2 (COX-2), fosfolipase A2 (PLA2), metaloproteases de matriz extracelular (MMP-3 e MMP-9, por exemplo), e outros fatores que serão responsáveis pela reação inflamatória.

1.3.1 Metaloproteases de Matriz

As MMPs são endopeptidases dependentes de cálcio e zinco consideradas as principais enzimas envolvidas no controle da homeostase de todas as proteínas da MEC em vários níveis incluindo regulação da função, crescimento e divisão celular, regulação da resposta imune e controle da síntese de elementos da MEC. Elas são proteinases capazes de degradar quase todos os componentes da matriz como colágeno, proteoglicanos (PGs), fibronectina, elastina, e laminina, podendo estar ancoradas a membranas ou ser secretadas (MEDINA e RADOMSKI, 2006; RAVI *et al.*, 2007).

As MMPs são expressas como zimogênios, contendo um pró-domínio que as mantém em estado inativo e um domínio catalítico que atua em amplo espectro nos componentes da matriz (RAVI *et al.*, 2007).

A latência da MMP é mantida por um resíduo de cisteína presente no pró-domínio, que interage covalentemente com um átomo de zinco no centro ativo do domínio catalítico, bloqueando assim o acesso do sítio catalítico ao substrato (RA e PARKS, 2007). Algumas MMPs possuem também um domínio hemopexina que está ligada ao domínio catalítico, que determina a especificidade ao substrato, atividade proteolítica, e regula a interação de MMPs com seus inibidores teciduais (TIMPs) (RAVI *et al.*, 2007).

1.3.2 Mieloperoxidase

Mieloperoxidase (MPO) é uma proteína composta por dois heterodímeros idênticos, sendo cada um deles formado pela modificação pós-traducional de um único polipeptídeo precursor. As duas metades simétricas são unidas por ponte dissulfeto entre as duas cadeias pesadas (FIEDLER *et al.*, 2000).

Esta enzima constitui cerca de 5% do total de proteínas nos neutrófilos e está presente em altas concentrações em grânulos citoplasmáticos, atingindo concentrações de cerca de 1mM no vacúolo. Cataliza a oxidação H_2O_2 -

dependente de haletos que pode reagir e matar micro-organismos (SEGAL, 2005).

Por estar sempre presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos a MPO é um marcador para o conteúdo neutrofílico de um tecido, com relação direta com o número de células que invadiu um tecido, representando assim o infiltrado leucocitário em processos inflamatórios (BRADLEY, P. P. *et al.*, 1982).

Segundo Vallieres e outros há evidências de que a ativação do NF- κ B, com a transcrição dos diversos fatores responsáveis pela inflamação, tem papel fundamental na patogênese de inúmeras doenças, se tornando assim um alvo de interesse para remissão do processo inflamatório. Um importante composto que vem sendo utilizado para este fim é o CS.

2 OBJETIVO

Avaliar os efeitos do CS nos efeitos iniciais da colestase extra-hepática induzida por ligação do ducto biliar comum.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CONDROITIM SULFATO

Condroitim sulfato (CS) foi adquirido da empresa Galena® (CS_{com}) para o tratamento dos animais utilizados no trabalho.

3.1.1 Caracterização do Condroitim Sulfato

3.1.1.1 Eletroforese em Gel de Agarose em Tampão PDA

Alíquotas (5 µL, 1 mg/mL) de CS foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (0,5%), tampão 1,3-diaminopropano (PDA) 0,05 M, pH 9,0 (DIETRICH, C. P. e DIETRICH, 1976). Uma mistura padrão de GAGs (5 µL), contendo CS, DS e HS, na concentração de 1 mg/ml cada, foi aplicada às lâminas como controle. Em seguida, os compostos foram submetidos à eletroforese (5 V/cm), em cuba refrigerada em gelo, por aproximadamente uma hora. O corante vermelho de cresol foi utilizado como indicador da distância percorrida pelos glicosaminoglicanos, pois migra próximo ao condroitim sulfato.

Após a eletroforese, os glicosaminoglicanos foram fixados no gel por solução de CTAB 0,1% (brometo de cetiltrimetilamônio), por 2 horas. A seguir o gel foi seco em corrente de ar quente e os glicosaminoglicanos corados por azul de toluidina 0,1% e etanol 50%, por 15 minutos. O excesso de corante foi removido e os glicosaminoglicanos quantificados por densitometria.

3.1.1.2 Dosagem de Ácido Urônico

Foi realizado o método de Di Ferrante (1956) para dosagem de ácido urônico nas amostras. Em um tubo contendo 100 µg de matéria-prima (volume final de 250 µL) foram adicionados 100 µL de solução de carbazol 0,1% em

etanol, seguido de 2,5 mL do reagente borato (tetraborato de sódio 0,4% em ácido sulfúrico). Os tubos foram então agitados em vórtex e aquecidos em banho fervente por 15 minutos. A leitura da absorbância das amostras foi realizada a 525 nm e os valores de ácido urônico foram calculados por meio de curva de calibração com ácido D-glucurônico.

3.1.1.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Análise de peso molecular em amostras de condroitim sulfato foi realizada por adaptação do método de eletroforese em gel de poliacrilamida descrito por Hilborn e Anastassiadis (1971) e modificado por Dietrich e Nader (1974).

Alíquotas (20 µg) foram ressuspensas em 10 µL de tampão de amostra (Tris 40 mM, NaCl 20 mM, EDTA 2 mM, glicerol 40%, vermelho de cresol 0,05%) e aplicadas em gel de poliacrilamida 7,5%, em tampão Tris-HCl 20 mM. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida contendo Tris 40 mM, NaCl 20 mM, EDTA 2 mM (100 V), e após 1 hora de corrida o gel foi removido das placas e corado com azul de toluidina 0,1% em ácido acético 1%, por 5 minutos. O excesso de corante foi removido com solução de ácido acético 1%, e o gel foi digitalizado e submetido à análise densitométrica pelo programa TotalLab TL120 1D v2009 (Nonlinear Dynamics Ltd.).

3.1.1.4 Espectro de Absorção em Ultravioleta

Espectroscopia de varredura no ultravioleta (190-400 nm) foi realizada em espectrofotômetro Evolution 160, equipado com células termoestabilizadas, com solução 1mg/mL de cada material. O gráfico de Absorbância (Abs) vs Comprimento de onda de cada amostra foi comparado com o padrão de referência.

3.1.1.5 Digestão Enzimática e FACE

Para a purificação das mucopolissacaridases bacterianas específicas foi feito um extrato bruto de *Flavobacterium heparinum* em caldo tripton de soja sem dextrose suplementado com CS, e após disruptura das células por ultrassom (30 KHz, 4 pulsos de 30 segundos, 4°C) foi realizado o fracionamento em cromatografia de interação hidrofóbica em resina *Phenyl Sepharose High Performance* (HP) em tampão Tris-acetato 0,05 M, pH 8,0 com eluição por *stepwise* em concentrações decrescentes de sulfato de amônio (1 a 0 M) conforme descrito por Aguiar e outros (2003).

Foi realizada a digestão enzimática de 20 µg de material com 2 mU de condroitinase AC de *Flavobacterium heparinum* em tampão etilenodiamino acetato, 0,5 M, pH 8,0, mantidos a 30°C por 24h. Após esse tempo 5 µg do composto foram submetidos à eletroforese em gel de agarose em tampão PDA como descrito em anteriormente (3.1.1.1) e o material restante derivado com AMAC para análise do perfil dissacarídico.

Alíquotas contendo 20 nmol do material degradado foram secas a vácuo e derivatizadas com 5 µL de solução de AMAC 50 mM (250 nmol) em DMSO:ácido acético (85:15). Após 15 minutos em temperatura ambiente foram adicionados 5 µL de solução recém-preparada de cianoborohidreto de sódio 1M. Essa mistura de derivatização foi mantida em banho a 37°C por 16 horas, quando foram adicionados 30 µL de glicerol 60%. As amostras derivatizadas (2 µL) foram então analisadas imediatamente por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) ou congeladas a -80°C para posterior análise.

As amostras derivatizadas foram aplicadas em gel de poliacrilamida 25%, em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0). A eletroforese foi realizada em tampão de corrida contendo Tris-glicina (25 mM/192 mM), pH 8,3, a uma diferença de potencial de 100 V, que após cerca de 20 minutos foi aumentada para 220 V. A migração dos sacarídeos derivatizados foi acompanhada durante a corrida utilizando luz UV $_{320-400\text{nm}}$ (luz negra). Após a corrida as imagens foram digitalizadas em *GelDoc-It Imaging System* (transiluminador UV com filtro em 365 nm e Câmera *scientific grade CCD GelCam 310*) e a análise

densitométrica foi realizada pelo programa TotalLab TL120 1D v2009 (Nonlinear Dynamics Ltd.) (OONUKEI *et al.*, 2005).

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), entre 6-8 semanas de vida, provenientes do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora e ambientados por ao menos uma semana no biotério do Laboratório de Glicoconjugados, no Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas, onde foram mantidos durante todo experimento com 4 animais por caixa, forrada com maravalha, em ciclo de 12 horas claro/escuro e temperatura entre 20 e 25°C. Água filtrada e a ração Nuvilab® foram administradas *ad libitum*.

Os procedimentos que foram realizados com os animais estão de acordo com os preconizados pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora. (069/2012-CEA UFJF)

3.2.1 Delineamento Experimental e BDL

Um total de 82 ratos foi utilizado no experimento. Para a indução da colestase extra-hepática os animais foram submetidos à ligação do ducto biliar comum (BDL). Sob efeito de anestesia foi realizada a laparotomia 2 (dois) centímetros abaixo do processo xifoide, sendo então isolado o ducto biliar comum, que foi duplamente ligado com fios de seda 5-0 sendo então seccionado entre esses pontos. Em seguida foi realizada uma cuidadosa sutura do peritônio e das camadas musculares, assim como da pele dos animais. Nos animais do grupo *Sham* foi realizada apenas a laparotomia e o isolamento do ducto biliar, sem realização da ligação. Detalhes do processo cirúrgico e dos cuidados pós-cirúrgicos já foram reportados previamente (CHANG e OHARA, 1992). Todo o procedimento cirúrgico foi realizado sob anestesia (Cetamina 90 mg/kg e Xilazina 10 mg/kg).

Os animais foram divididos em 12 (doze) grupos de estudo de acordo com o procedimento cirúrgico utilizado, tipo de tratamento e duração do experimento (número de dias em que cada animal foi tratado entre a cirurgia e a eutanásia):

- (1) Animais BDL 2 dias tratados com CS_{com};
- (2) Animais *BDL* 2 dias não tratados;
- (3) Animais *sham* 2 dias tratados com CS_{com};
- (4) Animais *sham* 2 dias não tratados;
- (5) Animais BDL 7 dias tratados com CS_{com};
- (6) Animais BDL 7 dias não tratados;
- (7) Animais *sham* 7 dias tratados com CS_{com};
- (8) Animais *sham* 7 dias não tratados;
- (9) Animais BDL 14 dias tratados com CS_{com};
- (10) Animais BDL 14 dias não tratados;
- (11) Animais *sham* 14 dias tratados com CS_{com};
- (12) Animais *sham* 14 dias não tratados.

Para os grupos (1), (3), (5), (7), (9), (11) foi administrado nos animais condroitim sulfato comercial via intraperitoneal (i.p.) um dia antes, no dia da cirurgia e nas primeiras 48 horas uma vez ao dia pela manhã, em uma dose de 120 mg/kg do animal. Após este período os animais foram tratados a cada 48 horas

Para os grupos (2), (4), (6), (8), (10), (12) foi administrado nos animais salina (solução de NaCl 0,9%) via intraperitoneal (i.p.) um dia antes, no dia da cirurgia e nas primeiras 48 horas uma vez ao dia pela manhã. Após este período os animais foram tratados a cada 48 horas

Ao final dos experimentos, os animais foram eutanasiados por aprofundamento de anestesia com administração de cetamina 180 mg/kg por via intraperitoneal com posterior exsanguinação. Foi coletado o soro dos animais por punção na aorta descendente e o fígado, obtido por dissecação cirúrgica, foi pesado e submetido a análises histopatológicas, bioquímicas, enzimáticas e a extração de glicosaminoglicanos.

3.2.2 Avaliação de Parâmetros Bioquímicos

O sangue de cada animal foi coletado da aorta descendente em tubo seco no momento da eutanásia para análise de alguns fatores bioquímicos. No soro dos animais foram avaliados os seguintes parâmetros: bilirrubinas, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamil transpeptidase (Gama GT), fosfatase alcalina (FA) e proteínas totais e frações conforme seus respectivos kits de dosagem. As análises foram realizadas utilizando analisador bioquímico automático Labmax Progress (Labtest).

3.2.3 Análise Histopatológica

Após a eutanásia um corte do fígado foi fixado com solução de paraformaldeído a 10% em tampão fosfato 0,05M, pH 7,4, processado e incluído em parafina para realização de cortes com 5 µm de espessura e corados por hematoxilina-eosina (H&E). Este material foi analisado com auxílio de um patologista e os itens proliferação ductular (PD) e infiltrado inflamatório (II) foram classificados como descrito abaixo:

Tabela 1. Classificação dos achados histológicos em lâmina corada por H&E

| Grau | Significado |
|------|-------------|
| ∅ | Ausente |
| + | Leve |
| ++ | Moderado |
| +++ | Intenso |

3.2.4 Extração e Análise de Glicosaminoglicanos

Os tecidos obtidos foram secos com acetona e então submetidos à degradação proteolítica com papaína (1mg/mL) em tampão fosfato-cisteína

0,05M, pH 6,5, na proporção de 1 mL de solução por 100 mg de tecido. Após incubação de 18-24 horas a 60°C, proteínas ainda presentes na solução foram precipitados pela adição de ácido tricloroacético (TCA 10%, concentração final), em presença de NaCl 1 M (concentração final). Após 10 minutos em banho de gelo o precipitado formado foi removido por centrifugação (3.000 RPM, 15 minutos). Para a precipitação dos GAGs foi adicionado 2,5 volumes de etanol sobrenadante, lentamente e sob agitação.

Após 18 horas a -20°C, o precipitado formado foi coletado por centrifugação (1300 X g, 20 minutos), seco a vácuo, ressuspenso em água destilada (3 mL) e submetido à cromatografia de troca aniônica em resina *Q-sepharose fast-flow*, sendo eluído com NaCl 2,0 M e precipitado com 2,5 volumes de Metanol.

Após incubação do precipitado com DNase foi analisado o conteúdo de GAGs por eletroforese em gel de agarose em tampão PDA 0,05M, pH 9,0 (3.1.1.1).

3.2.5 Atividade das Metaloproteases

A atividade das MMPs foi analisada por zimografia ou eletroforese em gel de poliácridamida com substratos. Fragmentos do fígado foram macerados em nitrogênio líquido e, em seguida, adicionado 1 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4, contendo CaCl₂ 100 mM e 1 ml de Triton X-100 0,2% (v/v) para extração das enzimas. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 15000 RPM a 4°C e no sobrenadante aliquoteado para a realização dos zimogramas foi dosado proteína com o *kit Pierce BCA Protein Assay*.

Géis de 0,75 mm de espessura contendo 10% de poliácridamida foram preparados e as amostras aplicadas para migração eletroforética (30 mA a 4°C por 90 minutos) em tampão Tris-glicina (25mM/192mM) pH 8,3 contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1%. Para a análise das gelatinases foi acrescentado gelatina 2,5% como substrato ao gel (Sigma-Aldrich — Seelze, Alemanha), antes de sua polimerização.

Após a migração, foram realizadas três lavagens do gel sob agitação em 100 mL de Triton X-100 2% (15 minutos cada), para remoção do SDS e

renaturação das enzimas, e incubação em 50 mL de tampão (50 mM Tris-HCl, pH 8,2, contendo 5 mM CaCl_2 e 1 μM ZnCl_2) por 24h a 37°C. Os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250* (0,5% corante, 30% metanol, 10% ácido acético) e descorados em solução descorante (30% metanol, 10% ácido acético). A atividade das gelatinases foi evidenciada como regiões claras (descoloradas) no gel (MIURA *et al.*, 1995; SHAPIRO *et al.*, 2001).

3.2.6 Atividade de Mieloperoxidase

A atividade de MPO no tecido foi medida de acordo com a técnica descrita por Bradley e outros (1982). A enzima foi extraída do fígado pela homogeneização do tecido em nitrogênio e o material suspenso em 0,5% CTAB em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,0. Essa solução de CTAB funciona como detergente agindo nos grânulos intracelulares dos neutrófilos e liberando a enzima. Em seguida a solução foi sonicada com potência de 80% por 20 segundos, congelada e descongelada, sendo o processo repetido três vezes. Esta suspensão foi então centrifugada a 15000 RPM a 4°C por 15 minutos sendo o sobrenadante recolhido para análise e dosagem de proteína com o *kit Pierce BCA Protein Assay* e congelado a -80°C.

Em microplaca de 96 poços, foi realizada uma diluição seriada de cada amostra em triplicata sendo adicionados cloridrato de *o*-dianisidina 2 mg/mL e peróxido de hidrogênio 10 mM em tampão fosfato de potássio 0,2 M (pH 6,0) para o disparo da reação. Foram realizadas 20 leituras a 492 nm com um intervalo de 30 segundos entre elas e a atividade de MPO foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 11,48 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), sendo 1UE de mieloperoxidase considerada como aquela que degrada 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de peróxido de hidrogênio a 25°C. Os resultados foram expressos como atividade enzimática específica (UE/mg proteína).

4 RESULTADOS

CS, em associação ou não à glucosamina, vem sendo amplamente empregado na terapêutica humana e veterinária como adjuvante no tratamento da OA. Diversos estudos demonstraram que este composto é capaz de modificar o curso da doença retardando sua progressão e não apenas agindo positivamente nos sintomas. Estes trabalhos destacam atividade anti-inflamatória em diversos modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

Para avaliarmos a atividade anti-inflamatória do CS em modelo experimental de colestase extra-hepática, condroitim sulfato comercial (CS_{com}) foi submetido a análises para determinação de teor e de suas características estruturais.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO CONDRITIM SULFATO COMERCIAL

Amostras de CS_{com} e de dois padrões de condroitim sulfato de traqueia bovina obtidos da Sigma (CSS1 e CSS2), usados como referência, foram submetidas à dessecação por 4 (quatro) horas em estufa a 95°C. Ao final deste tempo, o pó seco obtido foi pesado e a perda de umidade calculada foi inferior a 10% do peso inicial (CSS1 – 9,75%; CSS2 – 9,70 e CS_{com} - 9,69%).

Para caracterização destes compostos foram realizadas análises para determinação de teor por dosagem de ácido urônico e também por eletroforese em gel de agarose em tampão propilenodiamino acetato (PDA), determinação de peso molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida e conteúdo dissacarídico por degradação com mucopolissacaridasas bacterianas específicas. Foi também avaliado o espectro de absorção por varredura na região UV.

4.1.1 Teor de Condroitím Sulfato

A dosagem de ácido urônico de amostras de CS_{com} (100 μ g) e de CSS1 (base seca) foi realizada como descrito em Métodos (3.1.1.2). Os dados obtidos são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Determinação do Teor de Condroitím Sulfato por Ácido Urônico.

| Amostra | Ác. Urônico (μg) | CS (μg) |
|------------------------------|--|-------------------------------|
| CSS1 | 36,47 | 94,56 |
| CS_{com} | 35,62 | 92,36 |

Os valores obtidos estão relacionados a 100 μ g de material

Como podemos observar o teor de condroitim sulfato na amostra comercial foi de aproximadamente 92,36%, enquanto para o condroitim sulfato de referência foi de 94,56%.

4.1.2 Eletroforese em Gel de Agarose em Tampão PDA

Alíquotas (1 a 5 μ L) de soluções da base seca (1mg/mL) de CS_{com} e CSS1 foram então submetidas à eletroforese em gel de agarose em tampão PDA, 0,05 M, pH 9,0 (Figura 6).

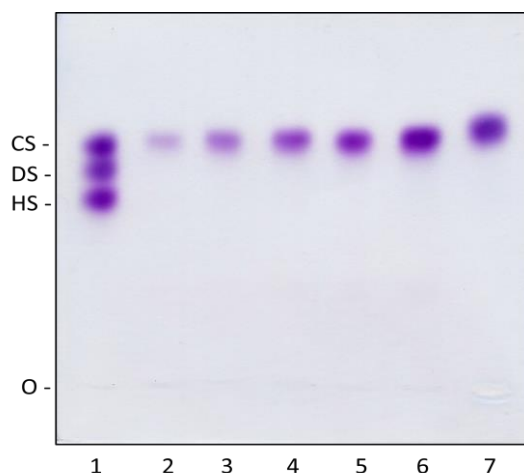


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose em tampão PDA 0,05 M (pH 9,0) de condroitim sulfato comercial (CS_{com}). 1 – Padrão de Glicosaminoglicanos; 2 - 1 μ g da base seca de CS_{com} ; 3 - 2 μ g da base seca de CS_{com} ; 4 - 3 μ g da base seca de CS_{com} ; 5 - 4 μ g da base seca de CS_{com} ; 6 - 5 μ g da base seca de CS_{com} ; 7 - 5 μ g da base seca de CSS1. CS - Condroitim Sulfato; DS - Dermatam Sulfato; HS - Heparan Sulfato; O - origem.

Podemos observar a presença de banda única com migração eletroforética semelhante ao padrão de condroitim sulfato (CSS1) na amostra do CS_{com} . Por análise densitométrica das bandas foi possível avaliar o teor de condroitim sulfato (Figura 7).

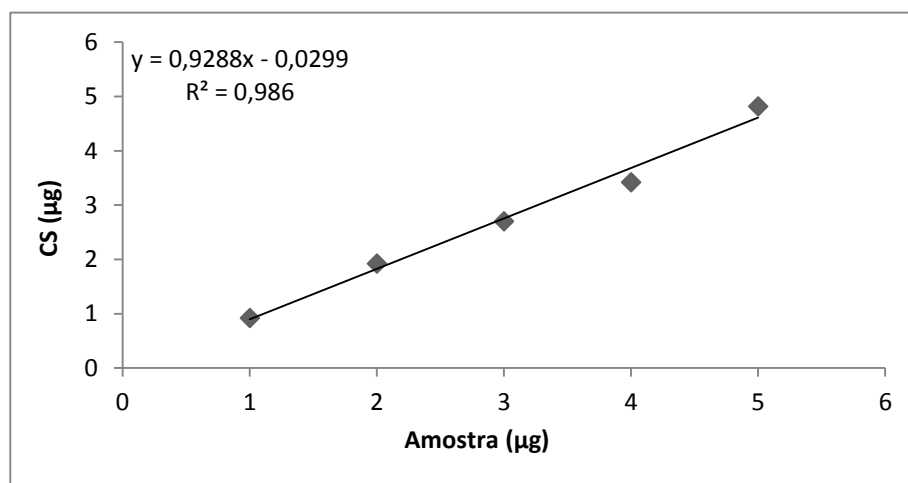


Figura 7. Linearidade das amostras de concentrações diferentes aplicadas na eletroforese em gel de agarose em tampão PDA.

O método apresenta linearidade em relação à quantidade de amostra aplicada e pelo coeficiente angular da reta obtida (μ g de condroitim sulfato/ μ g de amostra) obtivemos a concentração real da solução analisada (CS_{com}) de aproximadamente 93% de CS_{com} .

4.1.3 Eletroforese para Peso Molecular

Alíquotas de 20 μg de CS_{com} foram secas, ressuspensas em tampão de amostra e aplicadas em gel de poliacrilamida 7,5%. Após eletroforese o gel foi corado com azul de toluidina, como descrito em Métodos (3.1.1.3), e as bandas densitometradas para análise do R_f (Figura 8).

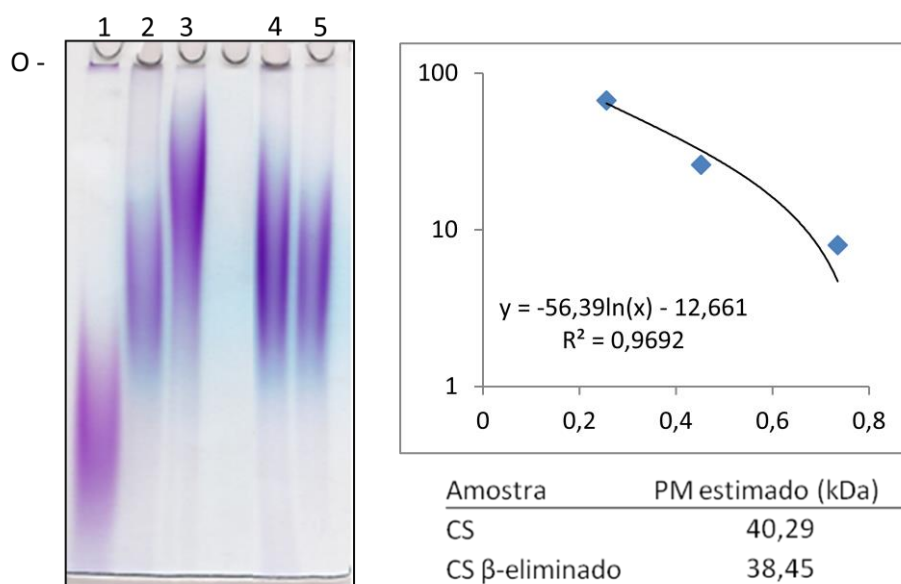


Figura 8. Gel de Poliacrilamida para Peso Molecular. Amostras (20 μg) foram analisadas em gel de poliacrilamida 7,5% corado com azul de toluidina 0,1%. 1 – Dextram sulfato (8kDa); 2 – Condroitim 4-sulfato (26 kDa); 3 – Condroitim 6-sulfato (67 kDa); 4, - CS_{com} ; 5 – CS_{com} β -eliminado.

O peso molecular modal das amostras foi estimado com base no R_f do pico obtido na análise densitométrica por regressão logarítmica com padrões de peso molecular conhecido. Observamos que o CS_{com} possui elevado peso molecular (40,29 kDa), havendo uma pequena diminuição após a β -eliminação da amostra, devido à quebra da região de ligação do glicosaminoglicano à proteína liberando resíduos de peptídeos que ainda podem estar ligados ao condroitim sulfato.

4.1.4 Espectro de Absorção em Ultravioleta

Alíquotas do CS_{com} e CS referência (CSS1 e CSS2) (1 mL, 1 mg/mL em água destilada) foram submetidas à varredura em espectrofotômetro na região UV (190 a 400 nm). A Figura 9 apresenta os espectros de varredura.

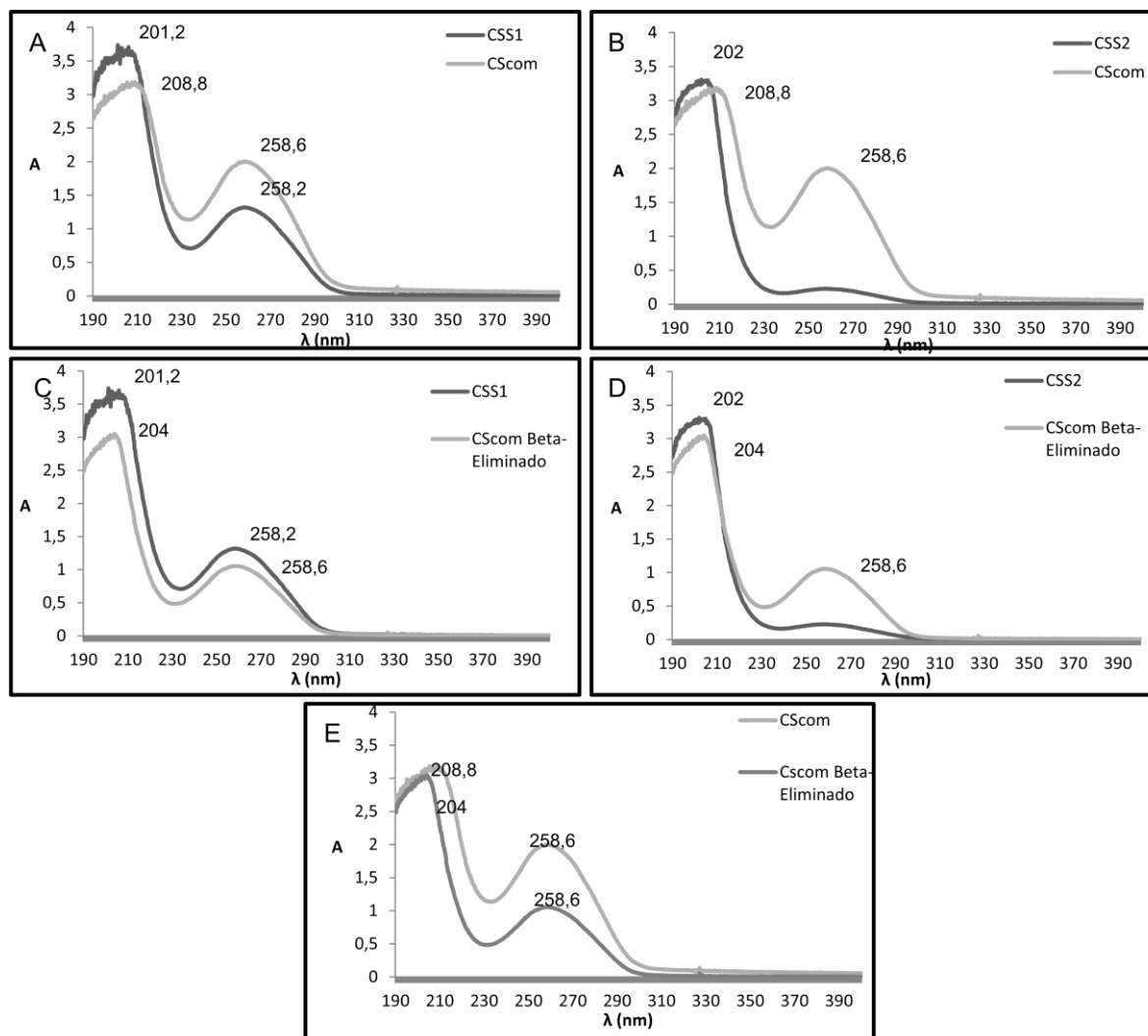


Figura 9. Espectro de absorção do CS_{com}, CSS1 e CSS2 na região do ultravioleta (1 mL, 1 mg/mL). Varredura realizada em faixa de comprimento de onda de 190 a 400 nm (600 nm/s). Os números representam os picos de cada um dos espectros (nm).

Observa-se na Figura 9 a presença de dois picos, um próximo à região de 200 nm e outro próximo à região de 250 nm, nos espectros de varredura das amostras. O primeiro pico é proveniente do somatório das absorvâncias de seus monossacarídeos constituintes (carbonila do ácido D-glucurônico e ligação acetamida) e o segundo pico pode ser resultado da ressonância de

resíduos aromáticos de peptídeos, ácidos nucleicos ou ainda de compostos utilizados para a preservação das amostras (como benzoato de sódio) presentes nas amostras. Podemos notar uma grande similaridade entre os espectros de absorção do CS_{com} e do CSS1 (A). Após as reações de β -eliminação não se observou diminuição significativa do segundo pico da amostra CS_{com} (C e D)

4.1.5 Degradação Enzimática

A análise das unidades dissacarídicas presentes em CS_{com} foi realizada por degradação destes compostos com mucopolissacaridasas bacterianas específicas e os produtos de digestão visualizados por FACE como descrito em Métodos (3.1.1.5).

Para isso, misturas de incubação contendo 20 μ g de CS_{com} e 2 mU de condroitinase AC de *Flavobacterium heparinum* em tampão etilenodiamino acetato, 0,5 M, pH 8,0 foram mantidos a 30°C por 24h. Após esse tempo 5 μ g do composto foram submetidos à eletroforese em gel de agarose em tampão PDA e o material restante derivado com AMAC para análise do perfil dissacarídico (Figura 10).

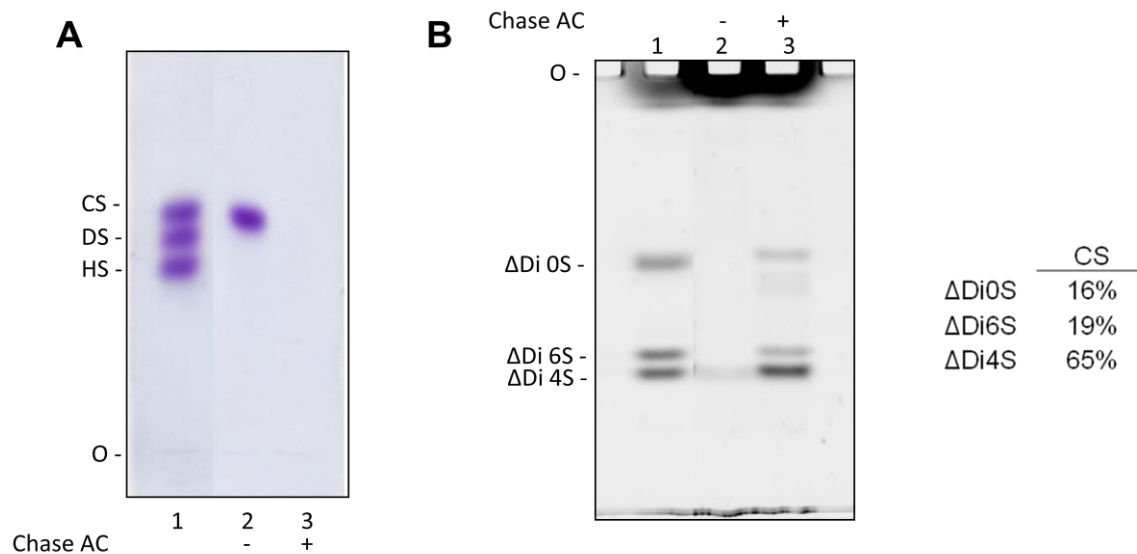


Figura 10. Degradação e análise enzimática de amostra de CS_{com} . (A) Eletroforese em gel de agarose em tampão PDA 0,05 M (pH 9,0) de incubação de Chase AC e CS_{com} . 1 – Mistura de padrões de GAGs; 2 – CS_{com} ; 3 – CS_{com} incubado com Chase AC. (B) Eletroforese de Carboidratos Assistida por Fluoróforos (FACE) em tampão Tris-Glicina (pH 8,8). 1 – Padrão de dissacarídeos; 2 – CS_{com} ; 3 – CS_{com} incubado com Chase AC.

Podemos observar na eletroforese em gel de agarose em tampão PDA o desaparecimento total da banda de CS_{com} após degradação enzimática (Figura 10.A). Na eletroforese em gel de poliacrilamida observamos que os produtos gerados após a digestão são constituídos principalmente por dissacarídeos 4-sulfatados (Δ Di4S – 65%), contando ainda com Δ Di6S (19%) e Δ Di0S (16%) em menores proporções (Figura 10.B).

Com base nos resultados obtidos podemos afirmar que o CS_{com} apresenta um elevado teor (acima de 92%), peso molecular de aproximadamente 40 kDa, espectro de absorção UV semelhante aos padrões de CS e ainda uma composição com predominância de dissacarídeos 4-sulfatados.

4.2 EFEITO BIOLÓGICO DO CONDROITIM SULFATO

4.2.1 Caracterização do Modelo Experimental

A ligação do ducto biliar (BDL) é um modelo de colestase extra-hepática que leva ao acúmulo de bile no fígado do animal, evoluindo de uma inflamação aguda para fibrose no tecido com desenvolvimento até mesmo de cirrose com presença de ascite, após cerca de 60 dias.

Para o estudo dos estágios iniciais da doença, ratos machos Wistar foram submetidos à BDL e eutanasiados 2, 7 ou 14 dias após o procedimento cirúrgico. Animais controle (grupo *Sham*) foram utilizados para comparação dos parâmetros avaliados, sendo realizados grupos tratados (administração intraperitoneal de CS_{com} – 120 mg/kg do animal) e não tratados (administração intraperitoneal de salina). As médias de peso corporal e a razão fígado/corpo, bem o número de animais em cada grupo são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Dados descritivos dos animais utilizados no trabalho.

| Dias | | n | M _i (g) | M _f (g) | Variação (%) | Fígado/Corpo (%) |
|------|---------------------------|---|--------------------|--------------------|----------------|------------------|
| 2 | <i>Sham</i> | 7 | 253,14 ± 26,01 | 248,86 ± 23,14 | (1,58) ± 2,30 | 4,22 ± 0,22 |
| | <i>Sham</i> _{CS} | 6 | 224,50 ± 20,86 | 207,17 ± 18,84 | (7,69) ± 1,99 | 4,69 ± 0,33 |
| | BDL | 8 | 237,37 ± 31,02 | 210,75 ± 25,03 | (11,06) ± 3,74 | 4,96 ± 0,45 |
| | BDL _{CS} | 8 | 232,25 ± 10,95 | 211,87 ± 14,78 | (8,85) ± 2,27 | 4,99 ± 0,36 |
| 7 | <i>Sham</i> | 4 | 191,00 ± 47,98 | 212,75 ± 39,63 | 12,56 ± 6,25 | 4,27 ± 0,34 |
| | <i>Sham</i> _{CS} | 6 | 200,00 ± 44,66 | 204,83 ± 36,97 | 3,20 ± 5,42 | 4,84 ± 0,97 |
| | BDL | 9 | 219,78 ± 54,28 | 217,22 ± 46,37 | (0,32) ± 5,33 | 5,78 ± 0,51 |
| | BDL _{CS} | 8 | 207,62 ± 44,77 | 205,25 ± 35,26 | (0,17) ± 6,32 | 6,64 ± 1,60 |
| 14 | <i>Sham</i> | 4 | 208,75 ± 14,73 | 247,00 ± 10,36 | 18,55 ± 4,91 | 4,23 ± 0,18 |
| | <i>Sham</i> _{CS} | 6 | 222,17 ± 32,87 | 253,17 ± 27,01 | 14,68 ± 7,14 | 4,29 ± 0,35 |
| | BDL _S | 8 | 220,37 ± 17,70 | 246,25 ± 18,94 | 12,07 ± 8,50 | 6,87 ± 0,56 |
| | BDL _{CS} | 8 | 223,75 ± 34,70 | 245,62 ± 26,49 | 10,67 ± 7,55 | 6,46 ± 0,52 |

Dados descritivos dos animais utilizados nos grupos *Sham* e BDL, tratados e não tratados, eutanasiados 2, 7 ou 14 dias após o procedimento cirúrgico. M_i: massa inicial dos animais em gramas; M_f: massa final dos animais em gramas; Variação: variação de peso dos animais durante o experimento, em porcentagem do peso inicial (números entre parênteses indicam valores negativos); Fígado/Corpo: razão do peso do fígado pelo do corpo de cada animal. *Sham*: Animais controle não tratados; *Sham*_{CS}: Animais controle tratados; BDL_S: Animais BDL não tratados; BDL_{CS}: Animais BDL tratados. Dados expressos em *média ± desvio padrão*.

4.2.1.1 Peso Corporal dos Animais

Observamos, de forma geral, uma alteração no peso corporal e na proporção fígado/corpo dos animais utilizados neste trabalho. Para caracterização do modelo experimental foram comparados os animais não tratados operados (grupo BDL) e controle (grupo *Sham*).

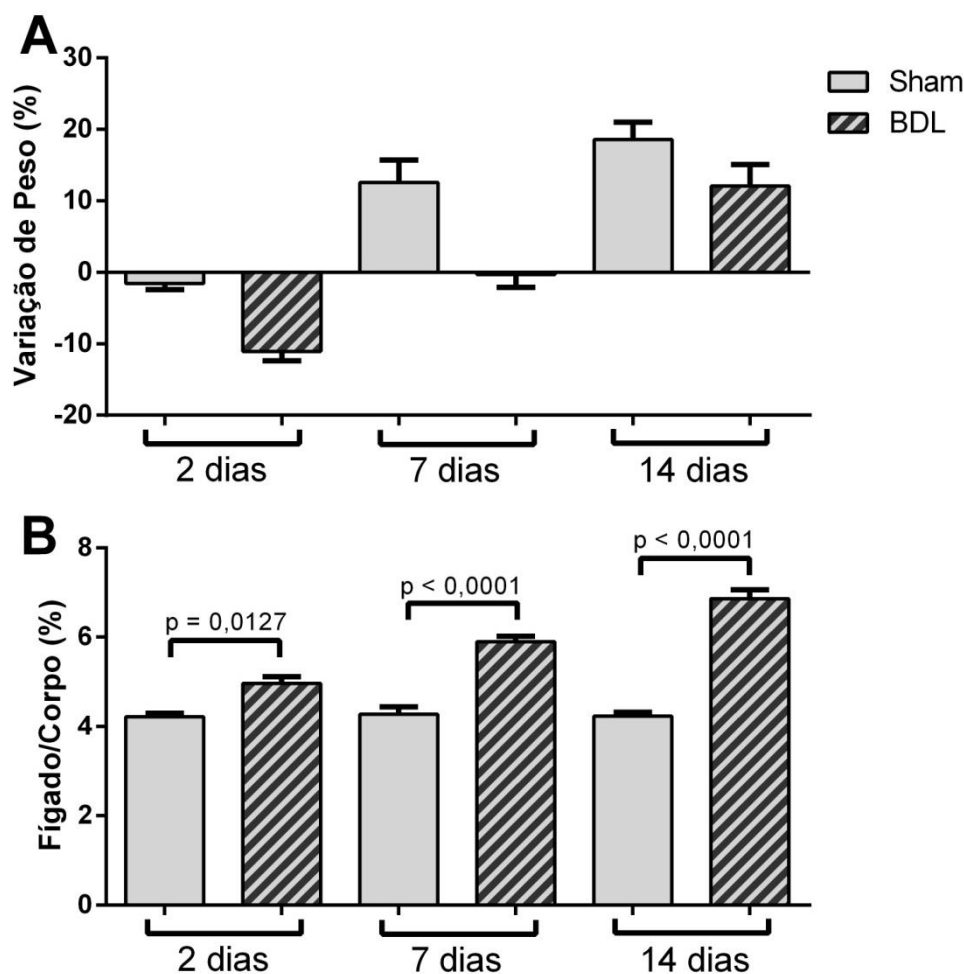


Figura 11. Alteração do peso dos animais BDL sem tratamento. (A) Variação de peso dos animais falso-operados (*Sham*) e operados (BDL) nos diversos dias de experimento. (B) Razão peso do fígado/peso do corpo do animal em cada grupo estudado.

Pode-se perceber leve perda de peso dos animais do grupo controle (*Sham*) eutanasiados 2 (dois) dias após a cirurgia, entretanto após 7 (sete) e 14 (catorze) dias de experimento esse grupo apresentou ganho de peso. Nos animais com colestase induzida houve uma maior perda de peso nos dias 2 (dois) e 7 (sete), enquanto os animais eutanasiados 14 (catorze) dias após o procedimento cirúrgico apresentaram ganho de peso, porém menor quando comparado ao grupo *Sham* (Figura 11.A).

A perda de peso nos primeiros dias é devido ao jejum pós-cirúrgico e ao procedimento cirúrgico ao qual os animais foram submetidos com agravamento devido ao estresse pós-procedimento, sendo este peso recuperado aos poucos ao longo do experimento. Embora o peso final dos animais BDL seja menor do

que o obtido para os animais *Sham*, a porcentagem de ganho de peso foi semelhante em ambos os grupos ao final dos 14 dias.

A relação fígado/corpo dos animais *Sham* permaneceu constante durante todo o experimento ($4,22 \pm 0,08\%$; $4,27 \pm 0,83\%$; $4,23 \pm 0,09\%$). Para o grupo BDL observou-se um aumento significativo dessa razão nos animais 2 dias ($4,96 \pm 0,16\%$; $p = 0,0127$), 7 dias ($5,78 \pm 0,17\%$; $p < 0,0001$) e 14 dias ($6,87 \pm 0,20\%$; $p < 0,0001$) (Figura 11.B). Essa alteração pode ser decorrente de hiperplasia do tecido hepático, devido a proliferação ductular e edema do tecido ou aumento da MEC hepática.

Para análise de possíveis efeitos do CS_{com} nos animais foi realizado um grupo controle tratado ($Sham_{CScom}$) (Figura 12).

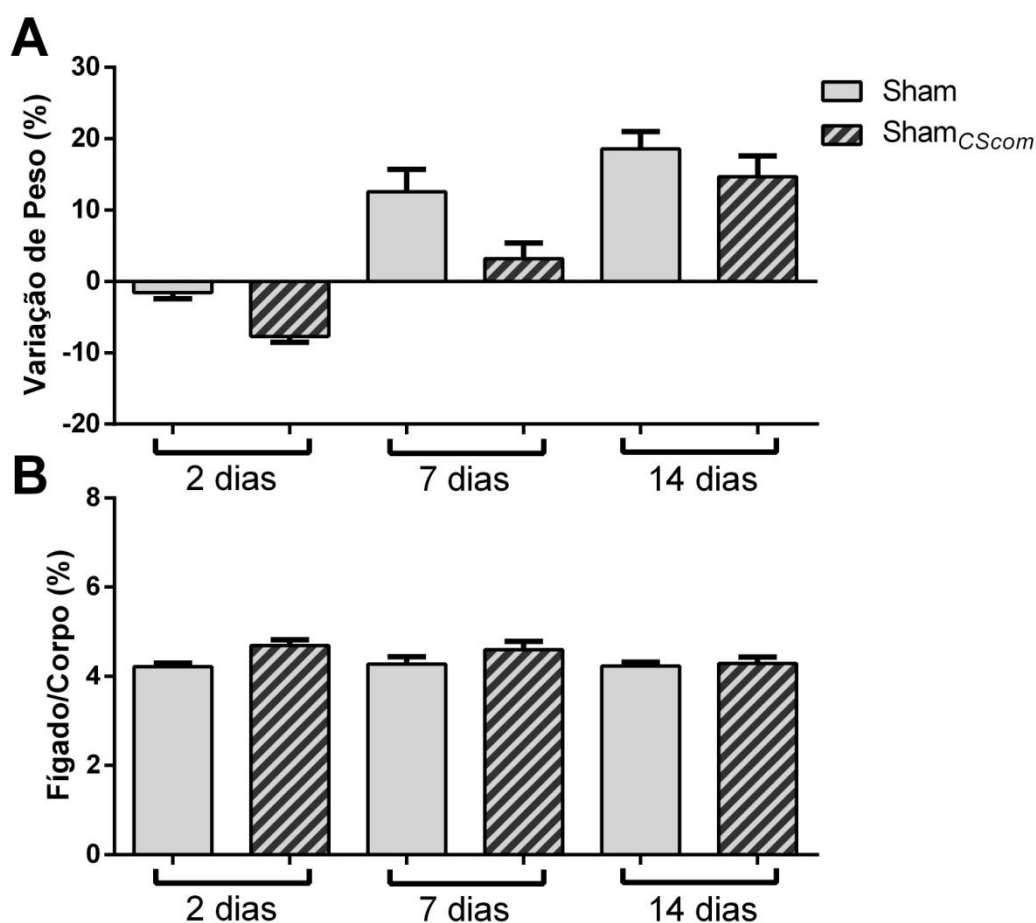


Figura 12. Alteração do peso dos animais *Sham* tratados. (A) Variação de peso dos animais falso-operados tratados ($Sham_{CScom}$) e não tratados (*Sham*) nos diversos dias de experimento. (B) Razão peso do fígado/peso do corpo do animal em cada grupo estudado.

O CS_{com} também apresentou variação em relação ao peso dos animais durante o período de execução do experimento entre os grupos analisados (Figura 12.A). Entretanto, a relação do peso do fígado dos animais com o peso do corpo permaneceu constante ao longo do tratamento (Figura 12.B), demonstrando que este composto não afeta o tecido hepático dos animais.

Animais submetidos à laqueadura foram então tratados para a observação do efeito do CS_{com} no desenvolvimento do processo patológico em seus estágios iniciais (Figura 13).

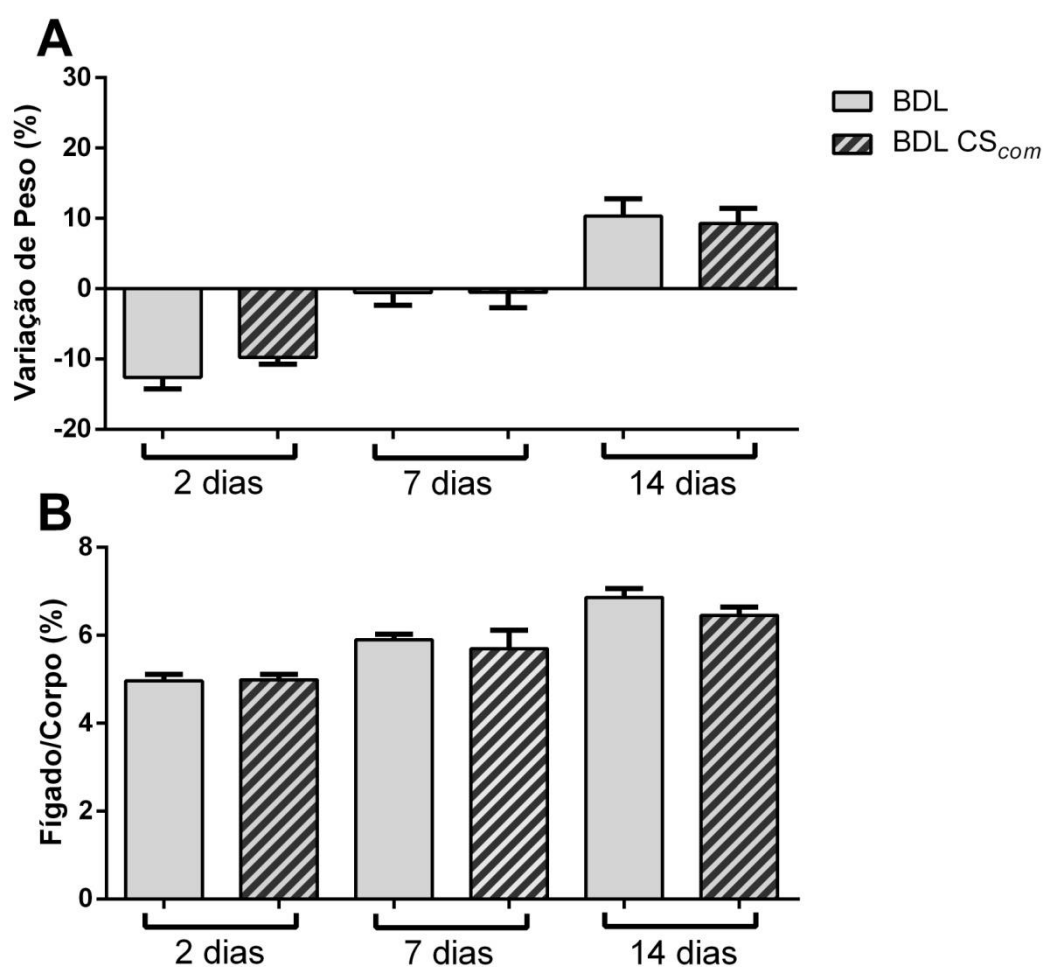


Figura 13. Alteração no peso dos animais BDL tratados. (A) Variação de peso dos animais operados tratados (BDL_{CScom}) e não tratados (BDL) nos diversos dias de experimento. (B) Razão peso do fígado/peso do corpo do animal em cada grupo estudado.

Não foram observadas alterações significativas de variação de peso dos animais dos grupos BDL e BDL_{CScom} (Figura 13.A). A relação fígado/corpo apresentou uma redução aparente com a administração do medicamento nos

dias 7 e 14, como observado na Figura 13.B, sugerindo a redução do edema e do aumento do parênquima hepático observado no grupo induzido, entretanto também não foi significativa em nenhum dos dias do experimento ($p = 0,9872$ e $p = 0,7965$ respectivamente).

4.2.2 Dosagens Bioquímicas

Testes bioquímicos são úteis na avaliação da função hepática, podendo ser utilizados para detectar a presença de uma doença, diferenciar os tipos de desordens, medir a extensão de uma patologia já conhecida e seguir a evolução em tratamentos.

Neste trabalho o sangue dos animais foi coletado da aorta descendente no momento da eutanásia em tubo seco, e o soro foi analisado para o estabelecimento de parâmetros indicadores de lesão hepática. A Figura 14 apresenta os resultados obtidos para os grupos *Sham* e BDL não tratados.

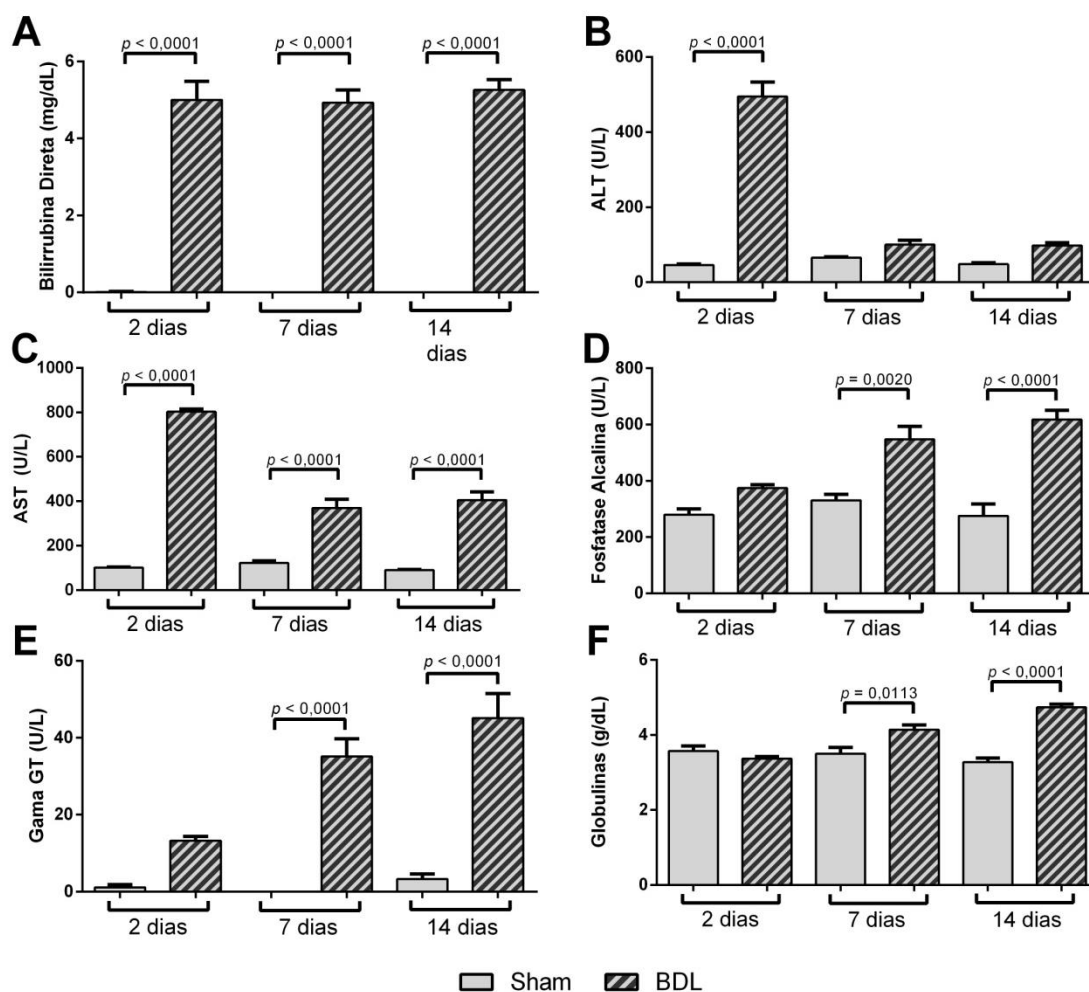


Figura 14. Dosagens bioquímicas no soro dos animais dos grupos Sham e BDL. Níveis séricos de diversos parâmetros relacionados à lesão hepática, como: (A) Bilirrubina Direta; (B) Alanina Aminotransferase; (C) Aspartato Aminotransferase; (D) Fosfatase Alcalina; (E) Gama glutamil transpeptidase; (F) Globulinas.

Houve um aumento significativo nos níveis séricos de bilirrubina direta (BD) em todos os animais BDL ($p < 0,0001$) indicando o acúmulo de bilirrubina conjugada, por impedimento de sua passagem pelo ducto biliar comum sugerindo a instalação de colestase (Figura 14.A).

As atividades da alanina aminotransferase (ALT) e da aspartato aminotransferase (AST) também se mostraram elevadas nos animais submetidos ao processo cirúrgico, sendo este aumento mais significativo no dia 2 ($p < 0,0001$) (Figura 14.B e 14.C). Estes valores elevados no segundo dia provavelmente refletem o estresse cirúrgico do animal, onde houve manipulação do fígado para isolamento do ducto biliar comum, além dos danos aos tecidos adjacentes e à musculatura abdominal, alterando principalmente a

atividade da ALT, que é menos específica do tecido hepático. O aumento significativo da AST nos demais dias de experimento sugere um dano na membrana celular hepática, com posterior aumento de permeabilidade.

Os animais operados apresentaram um leve aumento na atividade de fosfatase alcalina (FA) com 2 dias ($p = 0,2524$), sendo este aumento significativo nos animais com 7 dias ($p = 0,0020$) e 14 dias ($p < 0,0001$) (Figura 14.D). O mesmo comportamento ocorreu com a atividade da gama glutamil transpeptidase (Gama GT), apresentando para o grupo BDL valores maiores que o grupo *Sham* com 2 ($p = 0,2617$), 7 ($p < 0,0001$) e 14 dias ($p < 0,0001$) (Figura 14.E). Ambas as enzimas estão presentes em células do ducto biliar, com seu aumento indicando possíveis lesões nessas vias.

O aumento na concentração de globulinas nos animais BDL com 7 ($p = 0,0113$) e 14 dias ($p < 0,0001$) pode representar a elevação nos níveis alfa e beta globulinas produzidas por hepatócitos, indicando lesão hepática (Figura 14.F).

O tratamento do grupo *Sham* (*Sham_{CScom}*) não levou a grandes alterações no tecido hepático (Figura 15).

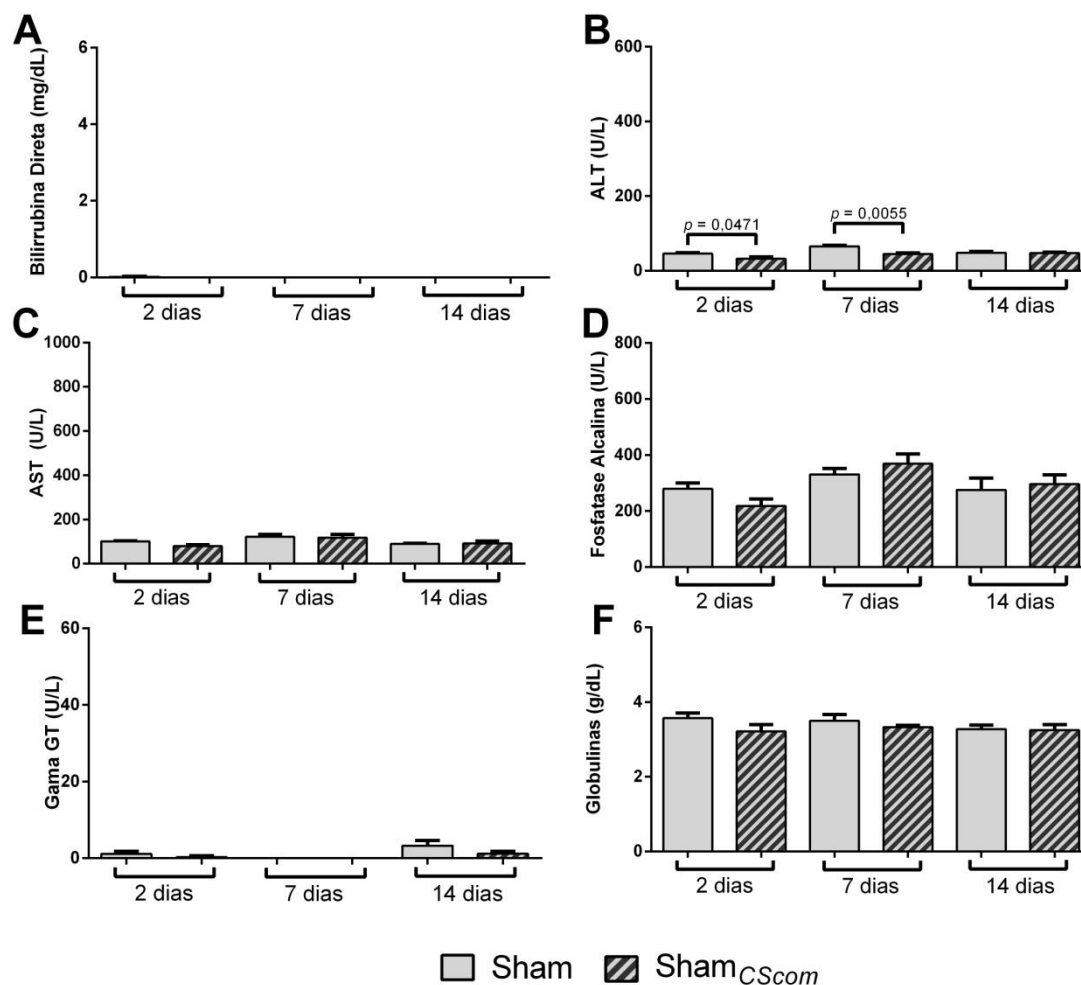


Figura 15. Dosagens bioquímicas no soro dos animais dos grupos Sham e Sham_{CScom}. Níveis séricos de diversos parâmetros relacionados à lesão hepática, como: (A) Bilirrubina Direta; (B) Alanina Aminotransferase; (C) Aspartato Aminotransferase; (D) Fosfatase Alcalina; (E) Gama glutamil transpeptidase; (F) Globulinas.

O CS_{com} causou uma diminuição na atividade da alanina aminotransferase no soro dos animais saudáveis em 2 ($p = 0,0471$) e 7 dias ($p = 0,0055$) indicando uma melhor recuperação dos tecidos lesados na laparotomia dos animais (Figura 15.B). Os outros parâmetros não sofreram modificações significantes com o tratamento.

Tratamento dos animais com colestase extra-hepática induzida foi realizado e o soro destes também foi coletado para as mesmas dosagens bioquímicas.

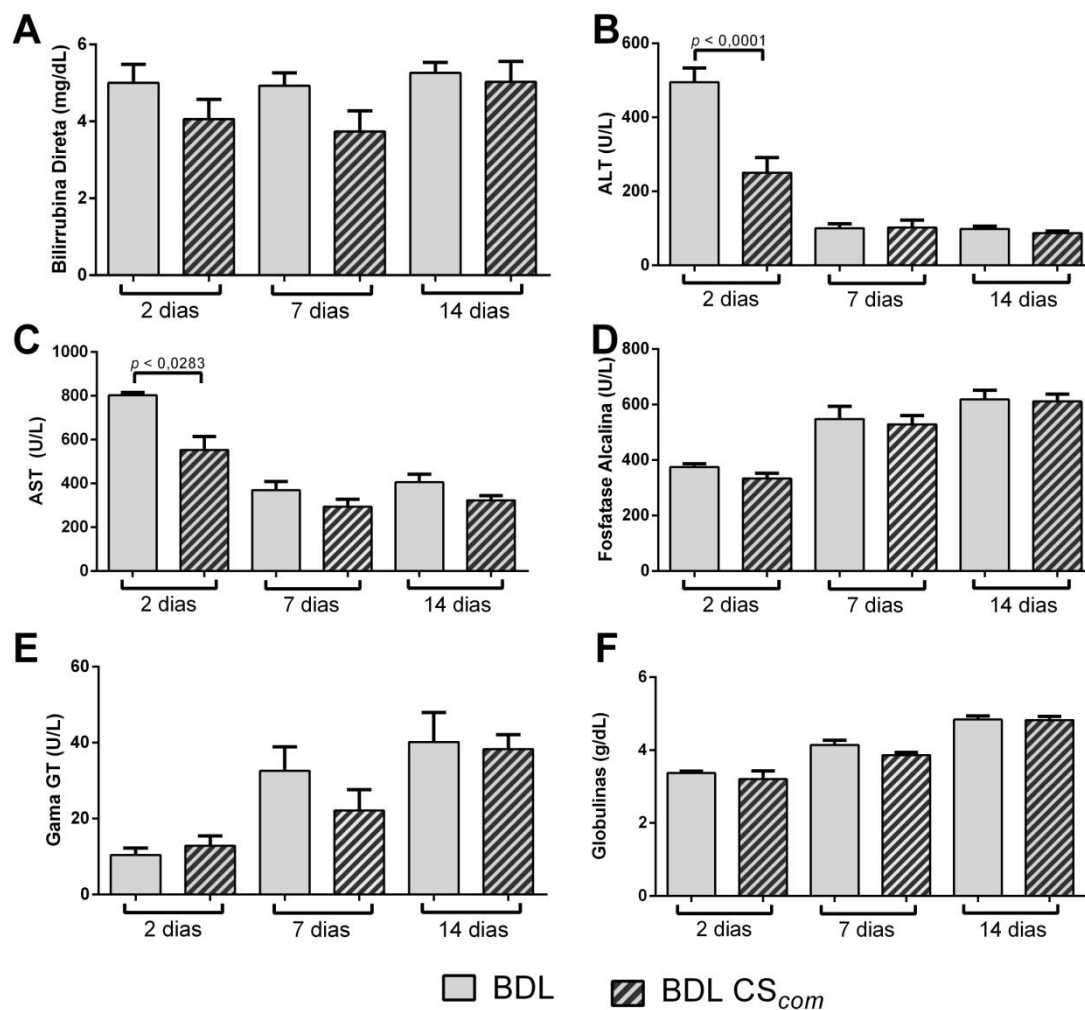


Figura 16. Dosagens bioquímicas no soro dos animais dos grupos BDL e BDL_{CS_{com}}. Níveis séricos de diversos parâmetros relacionados à lesão hepática, como: (A) Bilirrubina Direta; (B) Alanina Aminotransferase; (C) Aspartato Aminotransferase; (D) Fosfatase Alcalina; (E) Gama glutamil transpeptidase; (F) Globulinas.

Neste grupo o CS_{com} também foi capaz de reduzir significativamente o a atividade das transaminases, amenizando o estresse cirúrgico tanto nos tecidos adjacentes ($p < 0,0001$; Figura 16.B), quanto no próprio fígado dos animais ($p = 0,0283$; Figura 16.C) em períodos iniciais, mostrando um efeito protetor. Os demais parâmetros bioquímicos avaliados não apresentaram diferenças significativas quando comparados os grupos BDL tratado e não tratado.

4.2.3 Análise Histopatológica

Após a eutanásia dos animais, fragmentos hepáticos representativos foram fixados em solução tamponada de paraformaldeído 10% e submetidos à técnica histológica convencional ou seja, processados e incluídos em parafina para realizações de cortes histológicos corados por hematoxilina-eosina (H&E). Os achados histológicos foram classificados de acordo com dois critérios: proliferação ductular (PD) e infiltrado inflamatório (II), como descrito em Métodos (3.2.3).

Tabela 4. Análise histopatológica semi-quantitativa de fígado nos diferentes grupos do trabalho.

| Dias | Grupos | PD | II |
|-------------|--------------------------|-----------|-----------|
| 2 | <i>Sham</i> | ∅ | ∅ |
| | <i>Sham_{CS}</i> | ∅ | ∅ |
| | BDL | + | + / ++ |
| | BDL _{CS} | + | + |
| 7 | <i>Sham</i> | ∅ | ∅ |
| | <i>Sham_{CS}</i> | ∅ | ∅ |
| | BDL | + / ++ | + / ++ |
| | BDL _{CS} | + / ++ | + / ++ |
| 14 | <i>Sham</i> | ∅ | ∅ |
| | <i>Sham_{CS}</i> | ∅ | ∅ |
| | BDL | +++ | +++ |
| | BDL _{CS} | ++ | + / ++ |

∅: ausente; +: discreto; ++: moderado; +++: intenso

As Figuras 17 e 18 mostram cortes do fígado dos animais dos grupos estudados visualizados em microscopia óptica.

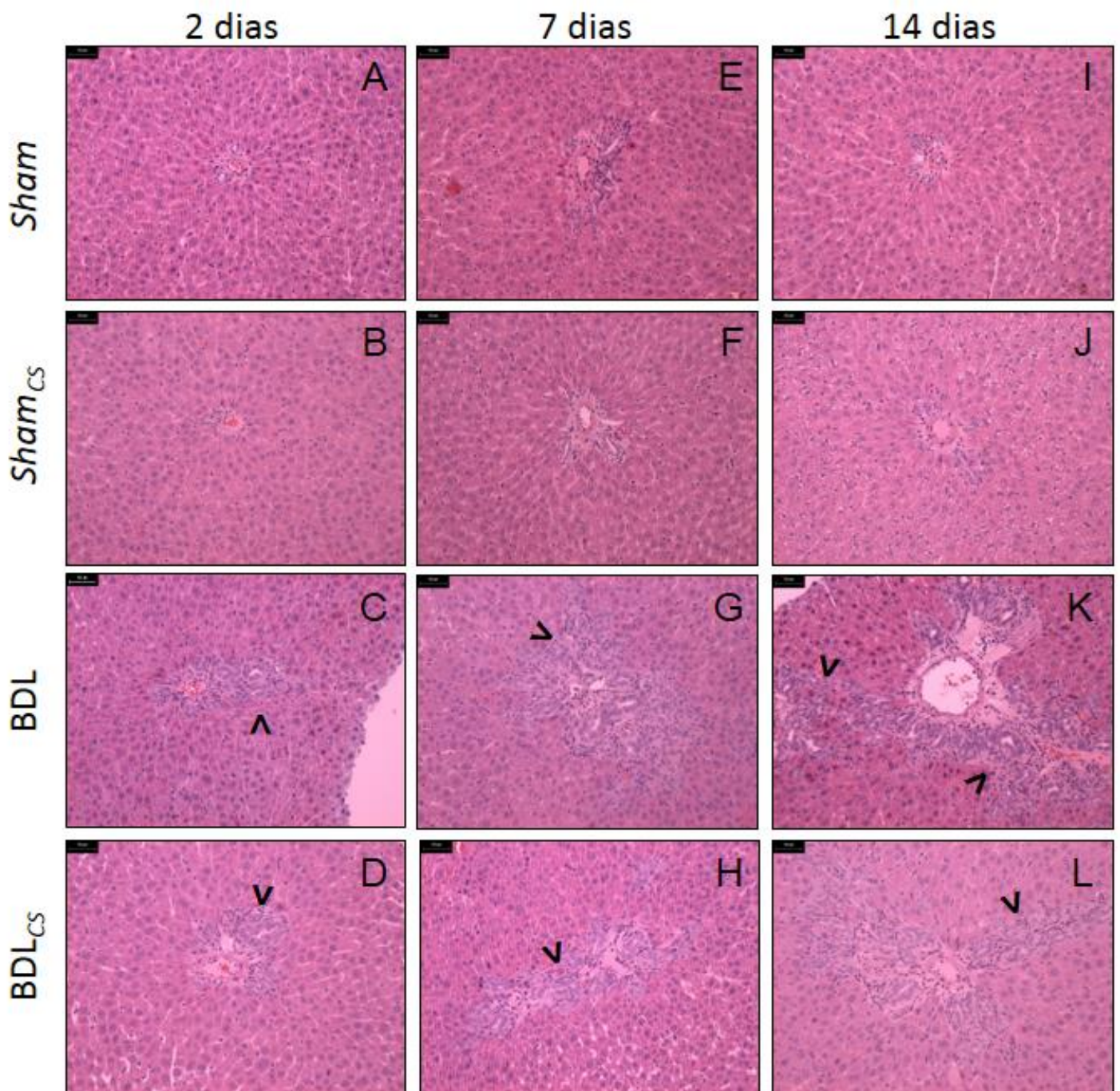


Figura 17. Cortes histológicos do fígado dos animais dos diferentes grupos do trabalho (H&E - 200x). As setas indicam pontos característicos de proliferação ductular no tecido.

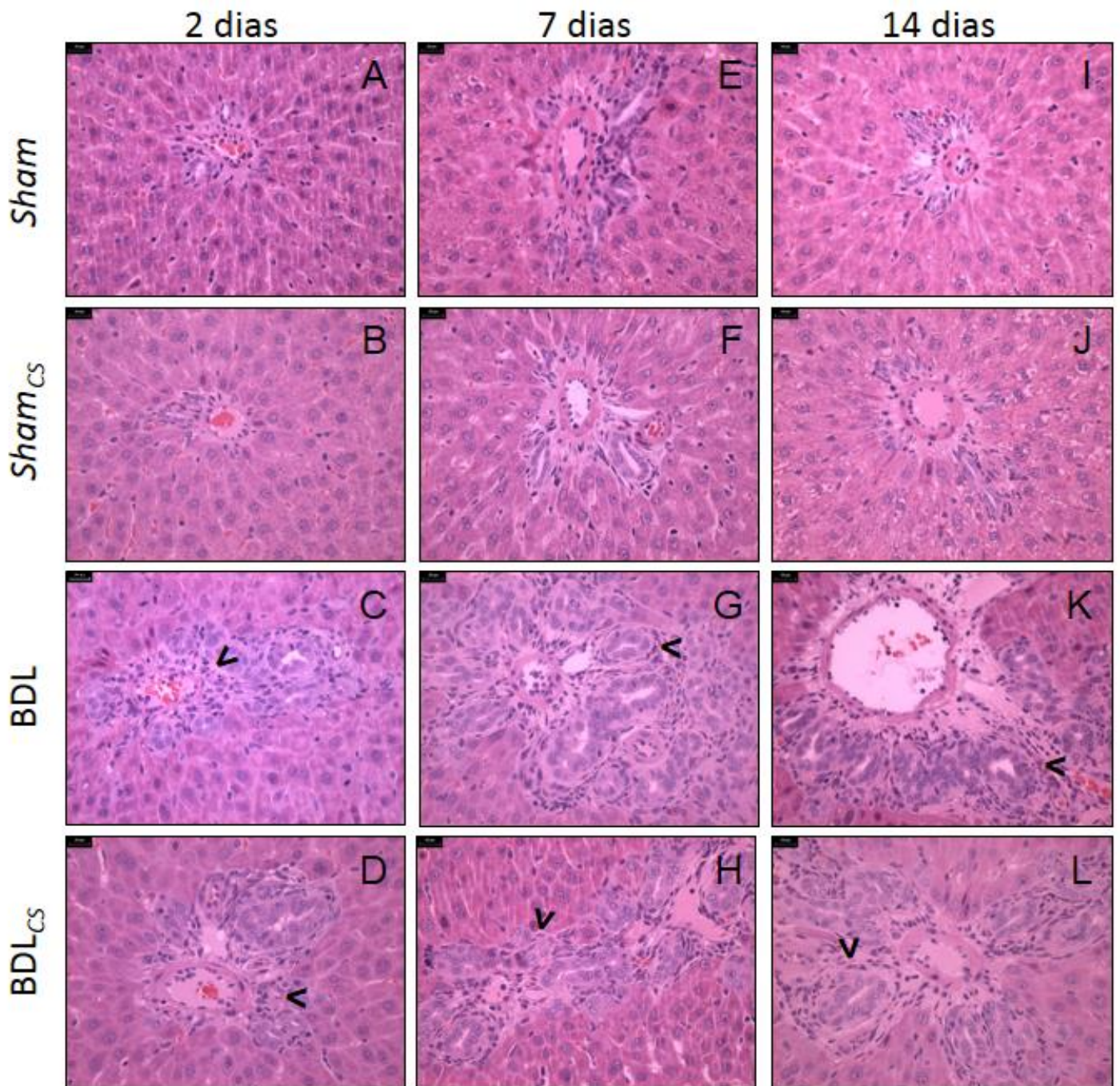


Figura 18. Cortes histológicas do fígado dos animais dos diferentes grupos do trabalho (H&E - 400x). Cada corte mostra um espaço porta do fígado do animal, sendo possível a visualização da vênula portal, artéria hepática e ductos biliares. As setas indicam a presença de infiltrado neutrofilico no tecido.

Pode-se perceber que os animais do grupo *Sham* tratados e não tratados apresentaram manutenção da arquitetura hepática para os três tempos analisados neste trabalho (Figuras 17 e 18.A, E e I).

A BDL desencadeia colestase intra-hepática, reação inflamatória portal e lesão hepatocítica associada à proliferação dos ductos biliares (Figuras 17 e 18.C, G e K). Com 2 dias após a cirurgia há o predomínio de neutrófilos no infiltrado, caracterizando um processo inflamatório agudo (Figura 18.C). Gradativamente o infiltrado neutrofilico foi substituído por um infiltrado mononuclear, caracterizando a instalação de um processo inflamatório crônico, o que foi mais evidente aos 14 dias, principalmente no grupo tratado (Figura 18.L).

As alterações morfológicas como o infiltrado inflamatório tecidual e a remodelação observados nos cortes histológicos foram também correlacionadas em outros estudos como dosagem da atividade de mieloperoxidase e metaloproteases e ainda a quantificação dos GAGs presentes no fígado dos animais testados.

4.2.4 Atividade de Mieloperoxidase

Mieloperoxidase (MPO) é a principal enzima encontrada em leucócitos como neutrófilos polimorfonucleares (PMN) estando presente em seus grânulos azurófilos. Catalisa a conversão do H_2O_2 gerada pelo *burst* oxidativo de neutrófilos, e o aumento de sua atividade está relacionado ao infiltrado leucocitário nos tecidos, gerando lesão tissular.

Para a dosagem da atividade desta enzima, parte do tecido hepático extraído dos animais foi utilizado no preparo de homogenatos e sua atividade foi calculada pela variação da absorbância na amostra devido à oxidação da *o*-dianisidina, como descrito em métodos (3.2.6). A Tabela 5 mostra a média da atividade específica de MPO em cada um dos grupos estudados.

Tabela 5. Atividade específica de mieloperoxidase (MPO).

| Atividade | | |
|-----------|---------------|--|
| Dias | Grupos | Específica de MPO (x10 ³) |
| 2 | <i>Sham</i> | 2,46 ± 0,14 |
| | <i>Shamcs</i> | 1,90 ± 0,13 |
| | BDL | 3,25 ± 0,12 |
| | BDLcs | 2,84 ± 0,13 |
| 7 | <i>Sham</i> | 2,56 ± 0,26 |
| | <i>Shamcs</i> | 2,44 ± 0,18 |
| | BDL | 4,28 ± 0,24 |
| | BDLcs | 3,64 ± 0,33 |
| 14 | <i>Sham</i> | 2,79 ± 0,17 |
| | <i>Shamcs</i> | 2,57 ± 0,12 |
| | BDL | 5,07 ± 0,46 |
| | BDLcs | 3,65 ± 0,17 |

Atividade específica de MPO (x10³) no homogenato do fígado dos animais utilizados nos diversos grupos do trabalho. Valores expressam média da atividade específica (UE/mg de proteínas) x 10³ ± erro padrão.

Com 2 dias foi possível observar um aumento significativo na atividade de MPO no fígado dos animais com colestase, o que sugere a presença de uma inflamação aguda no tecido logo nos primeiros dias deste modelo ($p = 0,0013$; Figura 19).

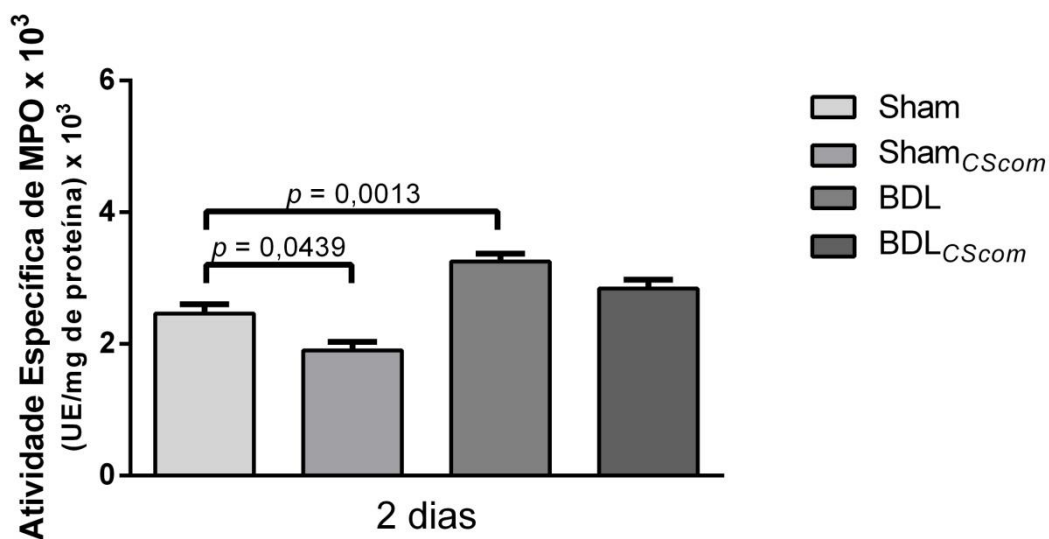


Figura 19. Atividade específica de mieloperoxidase no fígado de animais após 2 dias.

O tratamento com o CS_{com} dos animais diminuiu a atividade da enzima no tecido em ambos os grupos (*Sham*_{CScom}: $p = 0,0439$; *BDL*_{CScom}: $p = 0,1257$) demonstrando uma tendência do controle do processo inflamatório pelo CS.

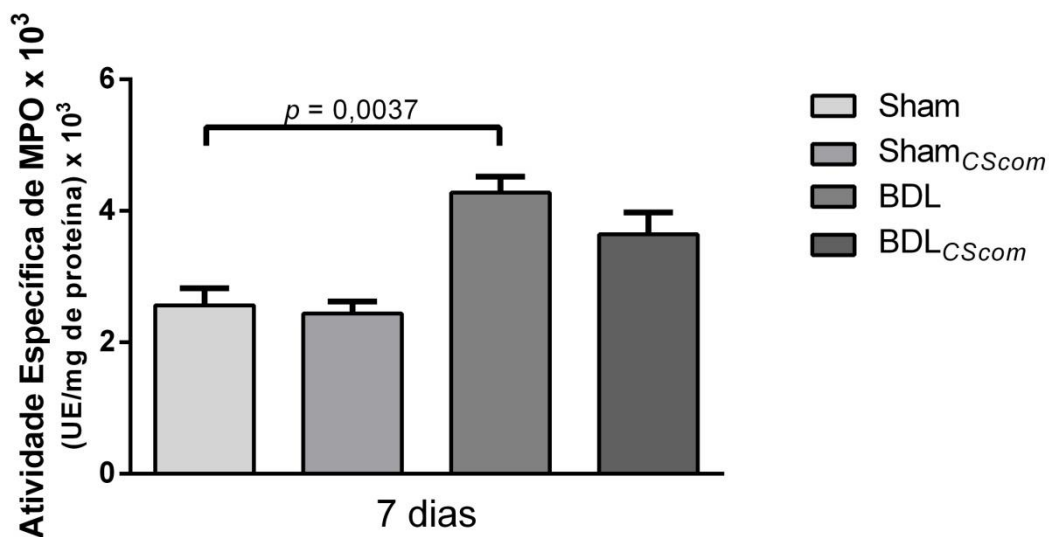


Figura 20. Atividade específica de mieloperoxidase no fígado de animais após 7 dias.

Após 7 dias de colestase observa-se grande aumento na atividade de MPO no fígado dos animais operados em relação ao controle ($p = 0,0037$). O tratamento dos animais levou à diminuição da atividade da enzima, como observado na Figura 20 ($p = 0,3066$).

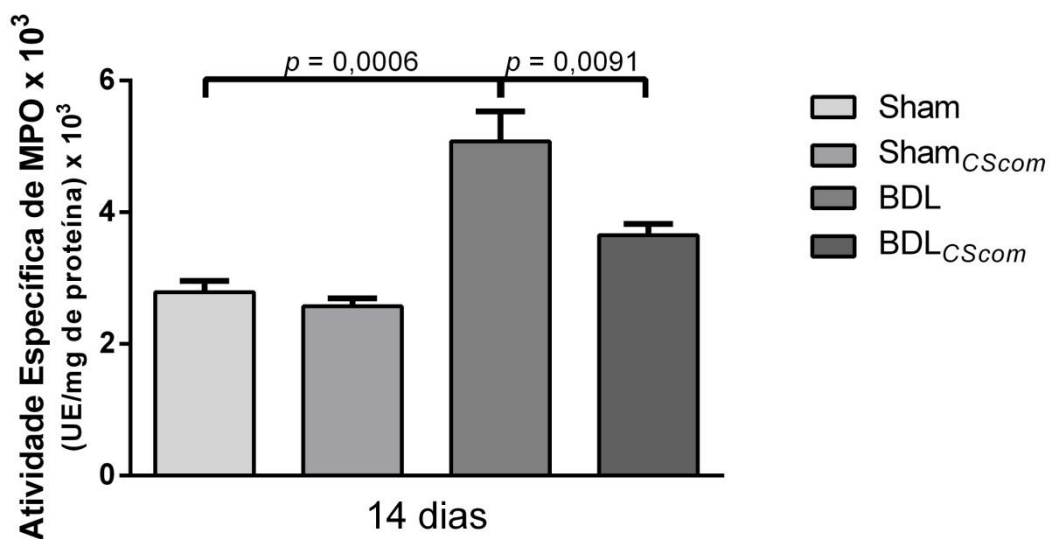


Figura 21. Atividade específica de mieloperoxidase no fígado de animais após 14 dias.

Com 14 dias de colestase foi encontrada grande diferença na atividade enzimática no homogenato ($p = 0,0006$). Após este período, o tratamento intraperitoneal dos animais com CScom diminuiu significativamente o infiltrado leucocitário no fígado dos ratos, como mostra a Figura 21 ($p = 0,0091$).

Estes dados confirmam os achados histológicos de que o CSc_{com} utilizado neste trabalho foi, portanto capaz de reduzir a migração de leucócitos para o fígado dos animais com colestase extra-hepática, prevenindo assim a lesão do tecido.

4.2.5 Atividade de Metaloproteases

As MMPs são endopeptidases envolvidas na homeostase da MEC de diversos tecidos, regulando função, crescimento, divisão celular, resposta imune e a síntese de elementos desta matriz.

Essas enzimas são divididas em diversos grupos de acordo com o substrato de preferência na MEC, podendo degradar compostos como colágeno e proteoglicanos. Dentre as MMPs se encontram as gelatinases MMP-2 e MMP-9, envolvidas da remodelação da MEC e em processos inflamatórios.

Para análise de MMPs foram realizados homogenatos com o fígado dos animais, e a atividade determinada por zimografia, como descrito em Métodos (3.2.5) (Tabela 6).

Tabela 6. Atividade de metaloproteases de matriz (MMPs).

| Dias | Grupos | Atividade Enzimática (UD/ μ g de proteínas) | | |
|------|--------------------------|---|------------------|------------------|
| | | pro MMP-2 | MMP-2 | MMP-9 |
| 2 | <i>Sham</i> | 2244 \pm 99 | 19797 \pm 3807 | 8392 \pm 303 |
| | <i>Sham_{CS}</i> | 3545 \pm 782 | 21225 \pm 5779 | 12283 \pm 4324 |
| | BDL | 3866 \pm 646 | 23641 \pm 3377 | 14468 \pm 2740 |
| | BDL _{CS} | 3055 \pm 434 | 21988 \pm 3348 | 19217 \pm 1614 |
| 7 | <i>Sham</i> | 2793 \pm 98 | 21620 \pm 696 | 8396 \pm 2857 |
| | <i>Sham_{CS}</i> | 2896 \pm 226 | 23537 \pm 1265 | 13594 \pm 5070 |
| | BDL | 4057 \pm 352 | 38739 \pm 2159 | 22497 \pm 3798 |
| | BDL _{CS} | 2659 \pm 530 | 22718 \pm 2852 | 15744 \pm 3962 |
| 14 | <i>Sham</i> | 3407 \pm 241 | 22716 \pm 1620 | 13263 \pm 968 |
| | <i>Sham_{CS}</i> | 2940 \pm 545 | 23311 \pm 3089 | 9321 \pm 1649 |
| | BDL | 7495 \pm 1536 | 44043 \pm 2884 | 50844 \pm 6654 |
| | BDL _{CS} | 4364 \pm 323 | 30548 \pm 2918 | 36452 \pm 3788 |

Média das atividade de MMPs no fígado dos animais obtida por análise densitométrica dos zimogramas. Valores expressos em Unidades Densitométricas (UD/ μ g de proteína) \pm erro padrão.

A Figura 22 mostra que nos animais com 2 dias há um equilíbrio nos 4 grupos em relação à atividade de pro MMP-2 e MMP-2. A atividade de MMP-9 sofre um aumento não significativo em relação ao grupo controle (*Sham* não tratado) quando o CS_{com} é administrado e nos grupos operados tratado e não tratado ($p > 0,9999$; $p = 0,9925$ e $p = 0,7721$, respectivamente.)

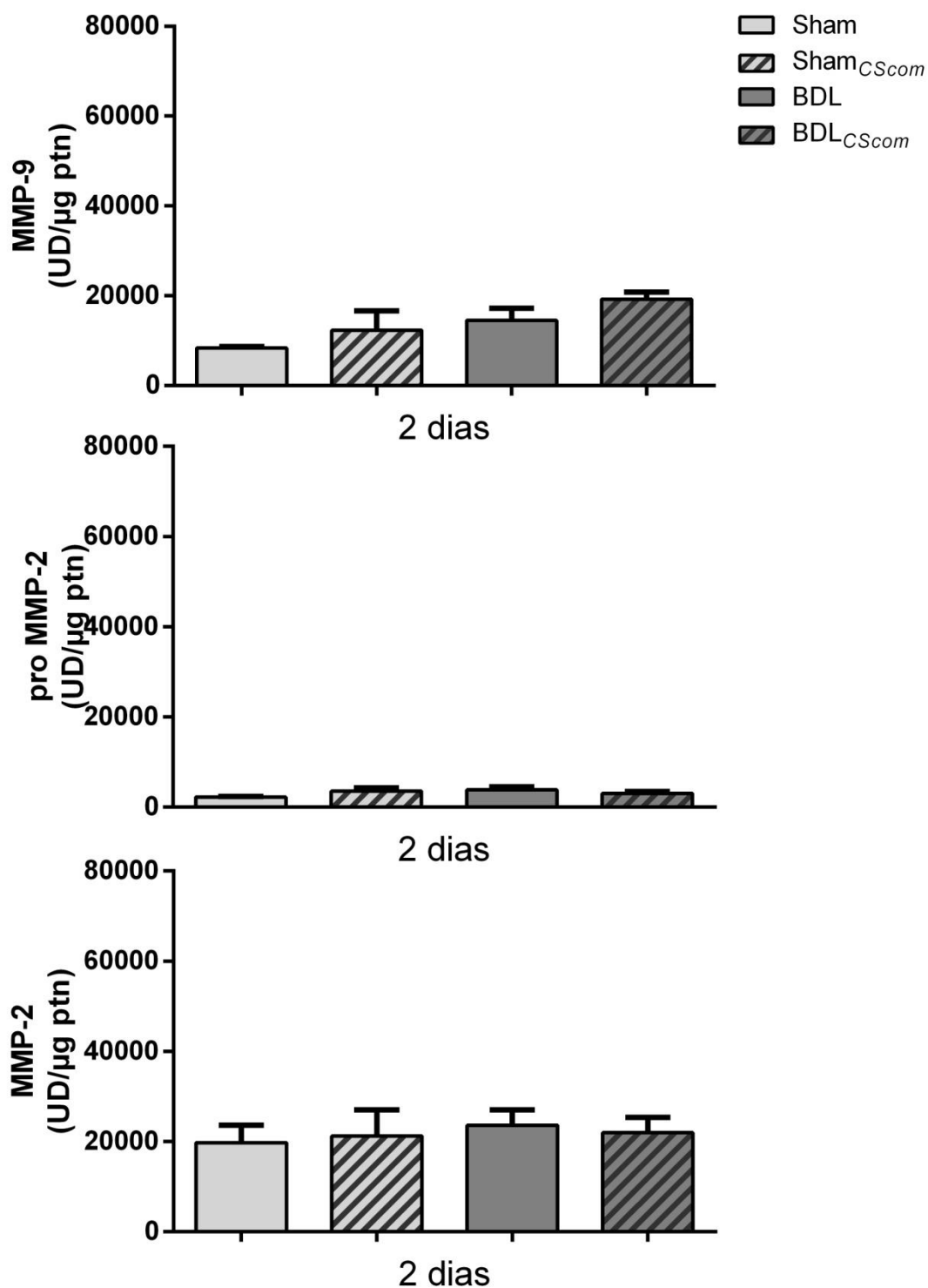


Figura 22. Atividade de metaloproteases (MMPs) nos animais com 2 dias de experimento.

Os animais com 7 dias de experimento também apresentaram valores constantes de pro MMP-2. Nos animais BDL não tratados pode-se observar um aumento significativo na atividade de MMP-2 ($p = 0,0113$), que é uma enzima

constitutiva envolvida com o processo de remodelamento de MEC, sendo que com o tratamento esta atividade é diminuída ($p = 0,0230$). A MMP-9 também sofreu um aumento com a colestase ($p = 0,4926$) com diminuição nos animais tratados com CS_{com} ($p = 0,9928$) (Figura 23).

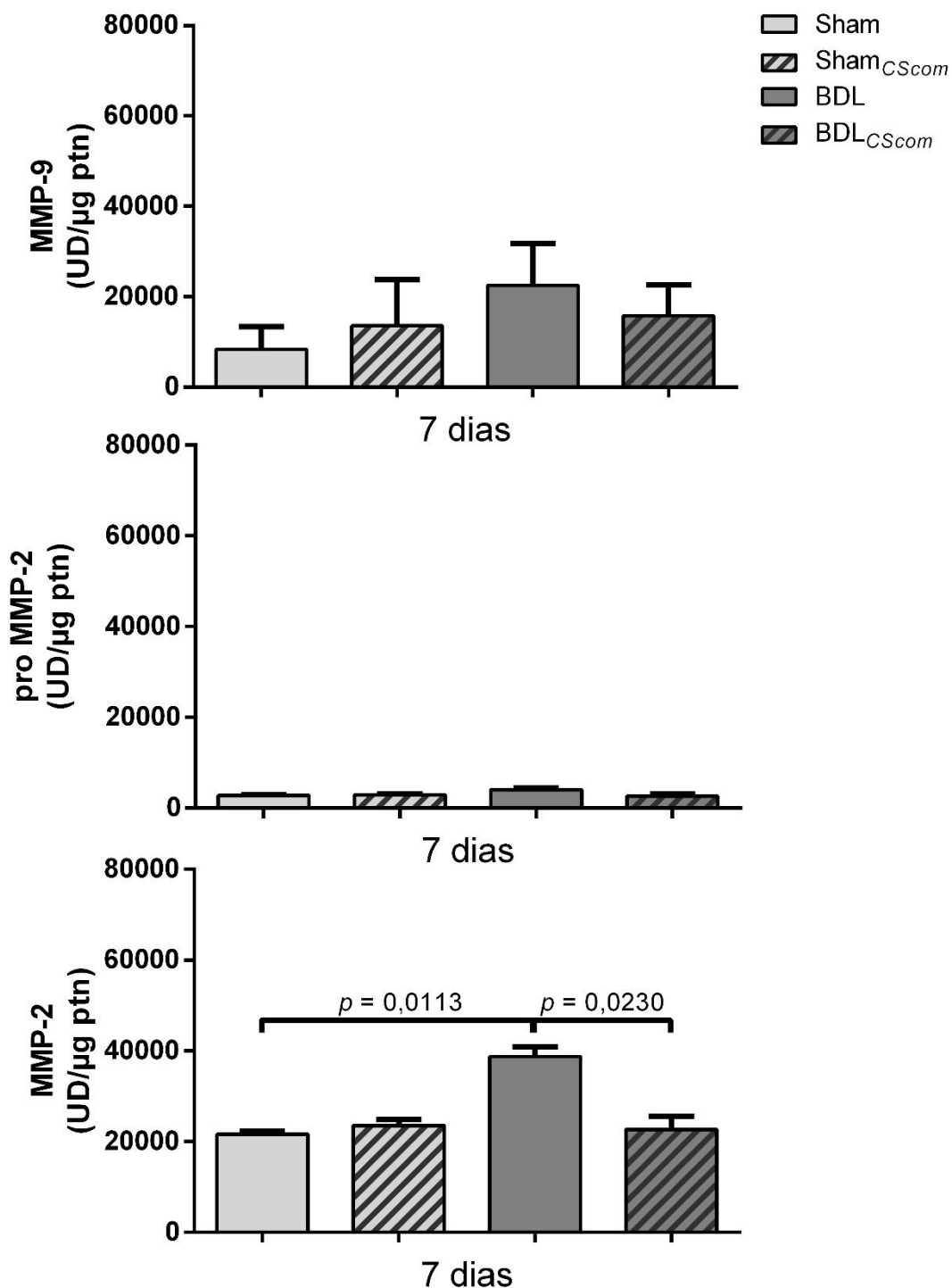


Figura 23. Atividade de metaloproteases (MMPs) nos animais com 7 dias de experimento.

A Figura 24 mostra que os animais BDL do grupo 14 dias apresentaram o mesmo aumento de atividade de MMP-2 apresentada com 7 dias de experimento ($p = 0,0010$) sendo que o CS_{com} reduziu a atividade desta enzima significativamente ($p = 0,0425$), mostrando que o medicamento reduziu a remodelação de MEC do tecido. Neste grupo há também o aumento significativo da atividade de pró MMP-2 o que pode indicar um início do aumento da expressão deste grupo de proteinases.

Pode-se observar que ocorre um grande aumento de atividade de MMP-9 no tecido colestático ($p < 0,0001$). Esta gelatinase está envolvida na instalação do processo inflamatório no tecido, sendo sua expressão relacionada à translocação nuclear do fator NF- κ B. O tratamento foi capaz de reduzir a atividade da enzima ($p = 0,2444$), sugerindo um controle do processo inflamatório.

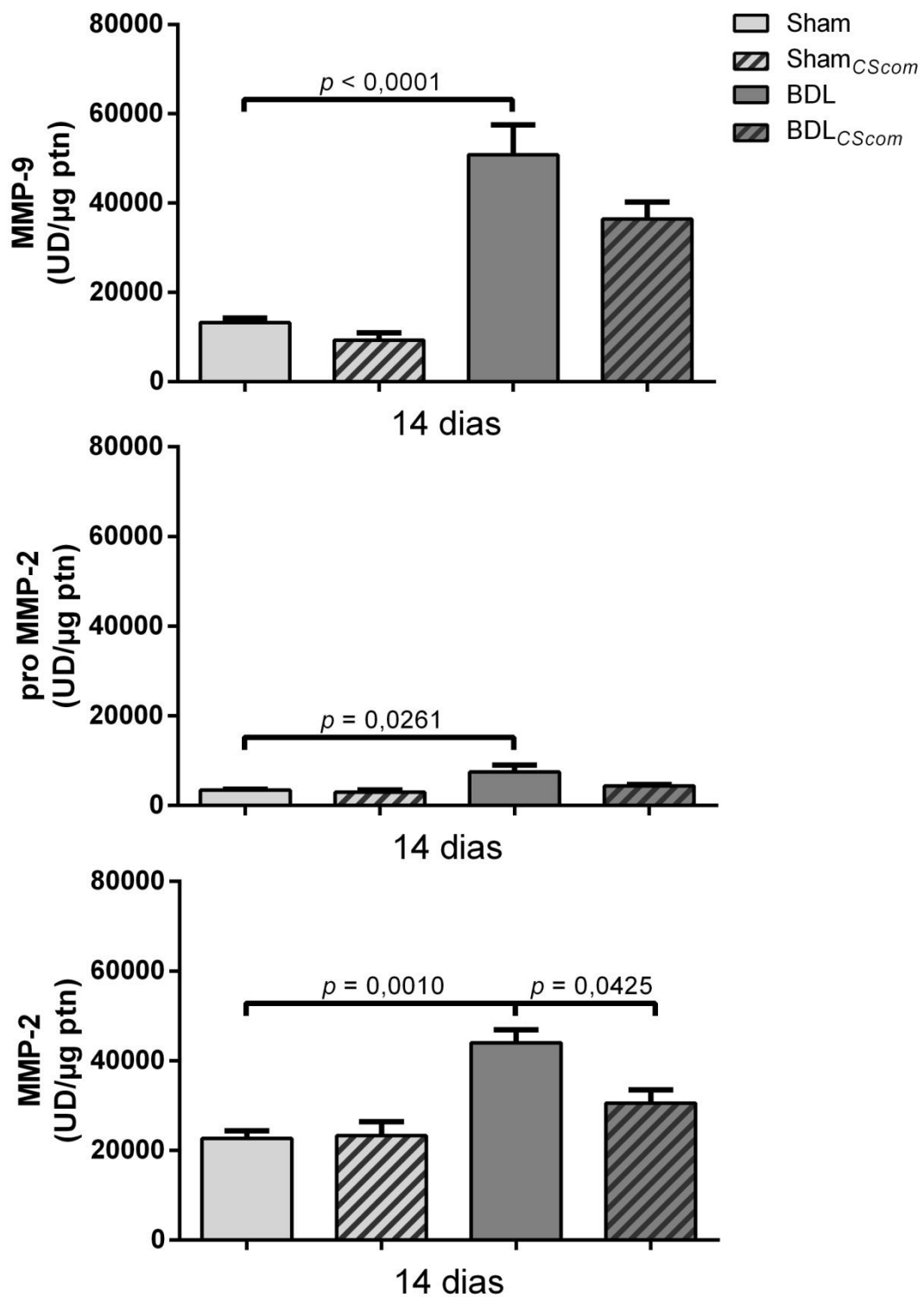


Figura 24. Atividade de metaloproteases (MMPs) nos animais com 14 dias de experimento.

4.2.6 Conteúdo de Glicosaminoglicanos

Fígado dos animais foi submetido à degradação proteolítica com papaína (1 mg/mL) e purificado por cromatografia de troca iônica para análise dos GAGs presentes no tecido hepático dos animais.

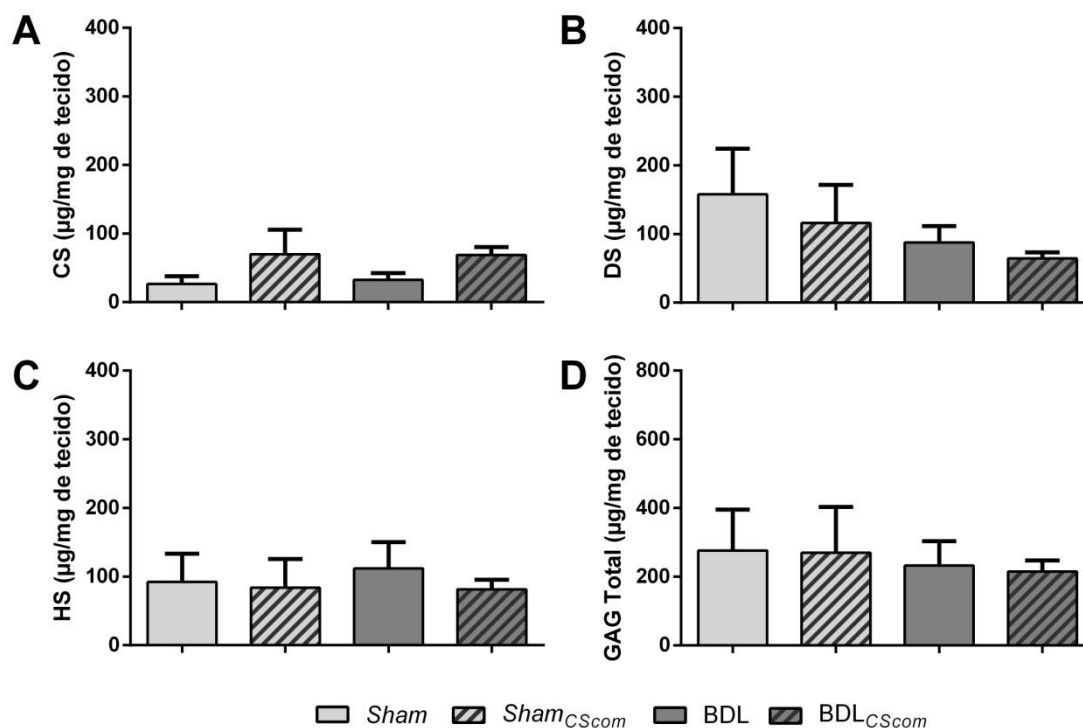


Figura 25. Glicosaminoglicanos presentes no fígado dos animais com 2 dias.

Pode-se observar na Figura 25 que nos animais eutanasiados com 2 dias há um aumento da massa de CS nos tecidos dos grupos tratados, indicando a absorção do medicamento administrado via intraperitoneal. Apesar disso, não houve alteração no conteúdo total de GAGs nestes fígados.

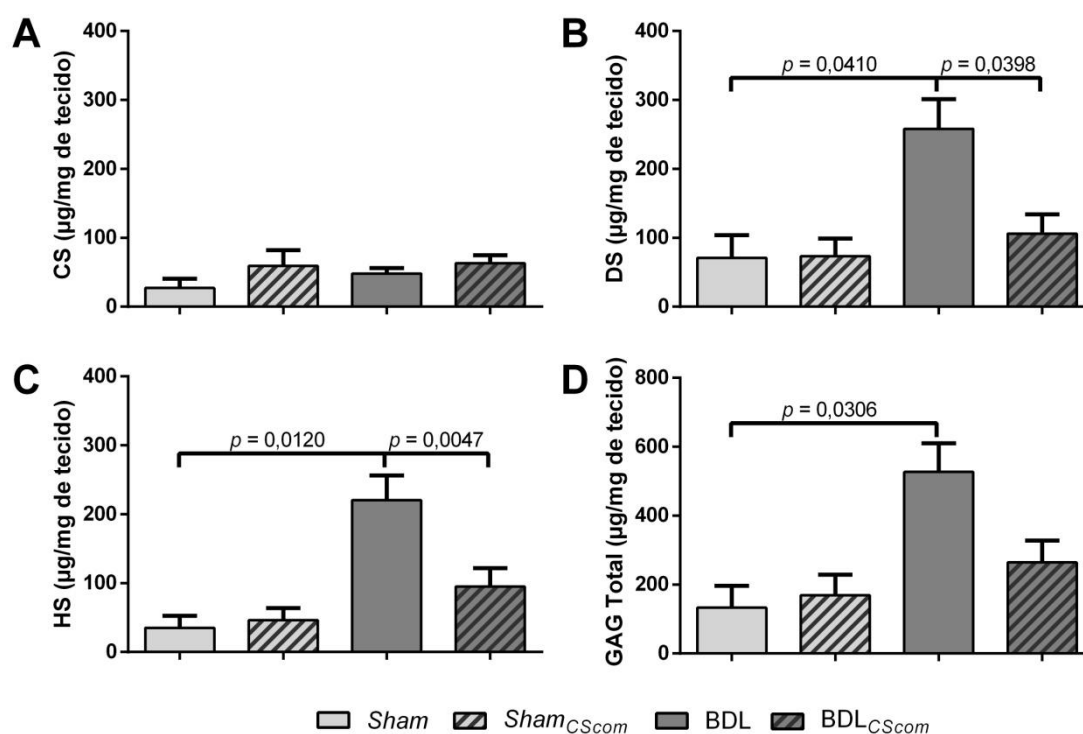


Figura 26. Glicosaminoglicanos presentes no fígado dos animais com 7 dias.

A Figura 26 mostra que os animais com 7 dias de experimento, assim como os anteriores, apresentaram aumento do CS quando tratados. Podemos observar também uma significativa elevação do conteúdo de DS presente no fígado dos animais BDL em relação ao grupo *Sham* ($p = 0,0410$), enquanto após o tratamento houve grande diminuição nessa concentração ($p = 0,0398$). É possível que o aumento da presença deste GAG no tecido indique um remodelamento hepático do animal, com *turnover* da MEC.

A quantidade de HS presente nestes animais seguiu o padrão do DS, com aumento quando induzida a colestase ($p = 0,0120$) e diminuição deste após a administração de CS ($p = 0,0047$). O HS encontra-se em membranas de células, com seu aumento indicando possíveis fatores como hiperplasia hepática ou a presença de infiltrados celulares nos tecidos. A alteração do DS e do HS levou a um aumento no total de GAGs presentes no tecido colestático ($p = 0,0306$).

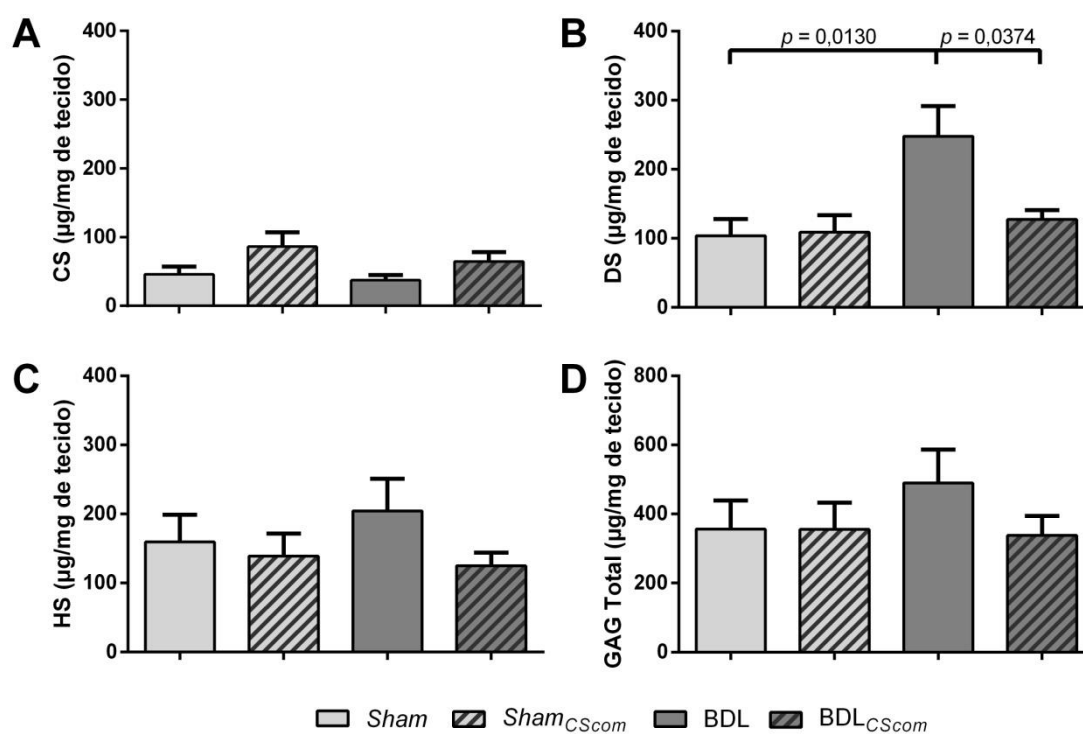


Figura 27. Glicosaminoglicanos presentes no fígado dos animais com 14 dias.

Após 14 dias também se observa o aumento do CS hepático nos animais tratados, não havendo, portanto alteração no padrão de absorção do tecido. Assim como nos animais com 7 dias, há aumento de DS com a indução da colestase ($p = 0,0130$), com sua diminuição nos animais tratados ($p = 0,0306$). Estes ratos apresentaram ainda o mesmo acréscimo do HS, apesar de os valores não se mostrarem com significância estatística (Figura 27).

5 DISCUSSÃO

O CS é um polissacarídeo de origem animal de natureza complexa, que apresenta considerável variabilidade estrutural quanto ao tamanho de sua cadeia e à posição e grau de sulfatação, gerados pelas diversas enzimas envolvidas em sua biossíntese. Essa diversidade estrutural possibilita este GAG a interagir com muitas moléculas da MEC, fatores de crescimento, inibidores de protease, citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e fatores de virulência (VOLPI, 2011; MIKAMI e KITAGAWA, 2013).

Diversos trabalhos destacam a atividade anti-inflamatória do CS. GAGs extraídos de plasma humano, com composição predominante de C4S, aplicados em diferentes concentrações a cultura de condrócitos estimulados por LPS foram capazes de reduzir citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ) e iNOS pelo bloqueio da ativação de NF- κ B (CAMPO *et al.*, 2008). Jomphe e outros (2008) demonstraram que CS diminui a translocação de NF- κ B induzida por IL-1 β pela de inibição da fosforilação de p38MAPK e de ERK1/2 induzida por essa mesma interleucina. Já Cañas e outros (2010) observaram que este GAG quando aplicado a cultura de astrócitos de ratos estimulados também por LPS reduziu TNF- α e iNOS por inibição do NF- κ B, indicando que o CS pode possuir ação neuro-imunomodulatória sob condições neurotóxicas.

A translocação nuclear do NF- κ B depende da ativação de receptores PRR, que gera a fosforilação das quinases p38MAPK, ERK1/2 e JNK desencadeando uma cascata de fosforilação que culmina na liberação do fator transcricional. Foi mostrado que o condroitim sulfato é internalizado na célula por receptores como o receptor de ácido hialurônico para endocitose (HARE), CD36, CD34 entre outros. Apesar de todos estes resultados o mecanismo pelo qual o CS reduz a fosforilação da p38MAPK e da ERK1/2 e a translocação do NF- κ B ainda não foi completamente elucidado (VALLIERES e DU SOUICH, 2010).

Imada e outros (2010) testaram C4S (cartilagem de traqueia suína - sulfatado na posição 4 da GalNAc) e C6S (cartilagem de tubarão - sulfatado na

posição 6 da GalNAc) em cultura de condrócitos humanos e mostraram que ambos reduziram, após indução com IL 1 β , expressão gênica das agrecanases ADAMTS (*agrecanase disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin-like motifs*) -4 e -5. As duas moléculas também controlaram a supressão de mRNA das cadeia proteicas do agrecam mediada pela IL 1 β e reduziram a expressão de MMPs nos condrócitos. Entretanto, apenas o C4S recuperou efetivamente a redução da expressão gênica do inibidor tissular de MMPs (TIMP) -3 nos condrócitos e aumentou a produção de TIMP-1 em fibroblastos sinoviais.

De acordo com a fonte, processo de extração e purificação, pode-se produzir condroitim sulfato com diferentes estruturas moleculares e pureza. A dosagem e determinação da pureza de condroitim sulfato extraído de tecidos animais é um ponto fundamental quando esse composto é produzido para fins farmacêuticos, assim como para uso em suplementos alimentares (VOLPI, 2009).

Em trabalho realizado previamente em nosso laboratório, Cunha (2012) testou 16 amostras de CS insumo farmacêutico sendo que 1 delas apresentou teor acima de 90%, 4 ficaram com teor entre 80% e 90% e todas as outras apresentaram teor inferior a 15% por eletroforese em gel de agarose em tampão PDA, apresentando elevados níveis de açúcares redutores.

Estes resultados mostram a importância de se realizar a caracterização adequada do composto a ser utilizado no trabalho, tanto em relação a sua estrutura quanto ao teor real daquela amostra.

Para a realização deste trabalho foi obtida amostra de CS comercial (CS_{com}). Inicialmente, análise por eletroforese em gel de agarose em tampão PDA (Figura 6) (DIETRICH, C. P. e DIETRICH, 1976) e por dosagem de ácidos urônicos (Tabela 2) (DI FERRANTE, 1956) verificamos que o CS obtido apresenta teor superior a 92%. Seu peso (modal) estimado por eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 8) (HILBORN e ANASTASSIADIS, 1971; DIETRICH, CARL P. e NADER, 1974) foi de aproximadamente 40 kDa, apresentando ainda espectro de varredura na região do UV semelhante ao padrão de C4S (CSS1) obtido da Sigma (Figura 9). A análise dissacarídica do material foi possível após degradação enzimática com condroitinase AC de

Flavobacterium heparinum, apresentando constituição de 65% de dissacarídeos 4-sulfatados (ΔDi4S), 19% de dissacarídeos 6-sulfatados (ΔDi6S) e 16% de dissacarídeos não sulfatados (ΔDi0S) (Figura 10) (VOLPI, 2007).

Uma alternativa para determinação da atividade anti-inflamatória do CS são os ensaios *in vivo*, com modelos como doença inflamatória intestinal (OLIVEIRA, 2013) e articular. A inflamação hepática também tem sido alvo de estudos em diversos modelos como por indução com tetracloreto de carbono (CCl_4).

Campo e outros (2004) administraram CS e ácido hialurônico (HA) intraperitoneal em ratos com lesão hepática induzida por CCl_4 . Juntos, os compostos foram capazes de reduzir o aumento de atividade de transaminases, peroxidação lipídica, expressão e ativação de MMPs e de limitar a deposição de colágeno no tecido hepático, além de levar à redução das atividades de superóxido desmutase e glutathione peroxidase. Em outro trabalho com indução de fibrose hepática com CCl_4 houve redução de peroxidação lipídica, TNF- α e MPO também somente após a administração de CS e HA, com sugestão dos autores de que há um efeito sinérgico destes compostos (CAMPO *et al.*, 2004).

A toxicidade induzida por CCl_4 depende da dose e duração de exposição e causa uma variedade de efeitos. Em doses mais baixas efeitos transitórios prevalecem como perda da homeostase de Ca^{2+} (MURIEL e MOURELLE, 1990), peroxidação lipídica (MURIEL, 2009), liberação de citocinas nocivas e benéficas e eventos apoptóticos seguidos de regeneração (KIM *et al.*, 2006).

Em altas doses ou em uma exposição mais longa ocorrem efeitos mais sérios como fibrose, cirrose e até mesmo câncer (WEBER *et al.*, 2003). Além disso, a intoxicação aguda com CCl_4 pode levar a falência hepática, quando a necrose hepatocelular excede a capacidade regenerativa do fígado. Doses extremas deste solvente resultam em toxicidade inespecífica, incluindo depressão de sistema nervoso central, falha respiratória e morte (BERGER *et al.*, 1986).

A indução de lesão hepática por CCl_4 é muito utilizada, porém a resposta dos animais é variável, a taxa de mortalidade é alta e o método demora um

período de tempo geralmente entre 8 e 12 semanas para gerar cirrose (MURIEL *et al.*, 2005). Além disso, atualmente, a intoxicação por CCl₄ é muito rara em humanos.

Uma alternativa para o estudo do desenvolvimento de inflamação hepática é a indução de colestase extra-hepática, onde ocorrem alterações morfológicas semelhantes à cirrose biliar em humanos, não havendo a necessidade de ativação do processo patológico por nenhuma toxina exógena, como no modelo citado anteriormente.

Colestase é uma característica de muitas doenças hepáticas. A falha na excreção dos sais biliares na colestase resulta em altas concentrações dentro de hepatócitos (GREIM *et al.*, 1972) e estes sais induzem a morte hepatocelular por apoptose (SCHMUCKER *et al.*, 1990; PATEL *et al.*, 1994; KWO *et al.*, 1995).

Em resposta à morte hepatocelular, células de Kupffer e neutrófilos são ativados e recrutados aos locais lesados (GUJRAL *et al.*, 2003). Essas células imunológicas secretam citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 β e TNF- α , por estímulo do fator transcricional NF- κ B (LIU *et al.*, 2001). Os sintomas envolvem edema do trato portal, infiltrado neutrofílico, proliferação de células epiteliais biliares e fibrose do trato portal (LI e CRAWFORD, 2004).

A icterícia obstrutiva causa uma alta taxa de morbidade e mortalidade na clínica humana. As sérias repercussões da colestase no fígado e sistêmicas levaram à criação de modelos experimentais para melhor entender a patogênese, profilaxia e tratamento (ALLER *et al.*, 2008).

A ligação do ducto biliar comum (*Bile Duct Ligation* – BDL) é um modelo experimental muito utilizado para induzir fibrose colestática (TUCHWEBER *et al.*, 1996). BDL induz proliferação de células epiteliais biliares intra-hepáticas, diferenciação miofibroblástica de fibroblastos portais e deposição de MEC por estas células (DESMOULIERE *et al.*, 1997).

No presente trabalho foi realizada a BDL de ratos Wistar, eutanasiados 2, 7 ou 14 dias depois da cirurgia, sendo estes animais tratados com CS ou solução salina intraperitoneal. Grupos sem laqueadura (Sham) foram utilizados como controle do processo inflamatório.

O CS administrado nos animais controle deste trabalho não induziu alterações no tecido saudável indicando que este composto não apresenta hepatotoxicidade.

O procedimento cirúrgico gerou um aumento crescente da razão do peso do fígado com o peso corporal nos animais em todos dias de experimento, indicando o possível desenvolvimento de processo fibrótico com deposição de colágeno no tecido, conforme citado por diversos autores (Figura 11) (GULUBOVA, 1996; HAVEMAN *et al.*, 1996; BELMIRO *et al.*, 2011) O tratamento foi capaz de reduzir levemente este aumento do fígado (Figura 13).

Em todos os grupos submetidos a BDL (tratado ou não) houve aumento dos níveis séricos de bilirrubina (Figura 14.A), indicando instalação da colestase hepática. Como dito anteriormente, essa bilirrubina é a responsável pelas lesões inicialmente causadas no tecido (FAUBION *et al.*, 1999) levando ao aumento de atividade das aminotransferases ALT e AST (Figura 14.B e C). Esta elevação foi mais marcante para o grupo 2 dias, provavelmente em decorrência do estresse cirúrgico passado pelos animais, com manipulação do fígado e lesão de tecido adjacentes durante a laparotomia, principalmente para a ALT, enzima menos específica para função hepática. O CS foi capaz de reduzir significativamente as atividades de aminotransferases neste grupo (2 dias) indicando uma possível proteção tecidual e proliferação celular pelo composto, como destacado por Zou e outros (2009) (ZOU *et al.*, 2009).

Com a colestase também houve aumento da atividade de fosfatase alcalina (FA) e gamaglutamil transferase (Gama GT), confirmando a origem biliar destas alterações (Figura 14.D e E).

A instalação destas lesões celulares gera inflamação, que por sua vez leva à expressão de proteínas quimioatrativas de monócitos e a infiltração de células imunes CD68⁺ (leucócitos, macrófagos e células de Kupffer) em fígados fibróticos (MARRA *et al.*, 1998).

Neste trabalho foi possível observar a presença de neutrófilos e mononucleares nos cortes histológicos dos animais BDL em todos os dias de experimento, sendo esta presença crescente de acordo com o tempo de colestase (Figuras 17 e 18; Tabela 4).

O infiltrado inflamatório foi confirmado pela realização da dosagem de atividade de MPO no homogenato do fígado dos animais. Por se tratar de uma enzima presente em grande quantidade nos grânulos azurófilos de neutrófilos, a MPO é utilizada como marcador da presença destas células em diversos tecidos (BRADLEY, P. P. *et al.*, 1982). Corroborando os dados histológicos, observamos aumento da atividade de MPO nos fígados de animais colestáticos em todos os grupos analisados (2, 7 e 14 dias). CS foi capaz de reduzir esta atividade enzimática em todos os grupos, porém somente no grupo 14 dias obtivemos redução com significância estatística (Figura 21).

Kawashima e outros (2000) mostraram que o CS apresenta capacidade de se ligar a e ainda ao CD44. Este fato pode impedir adesão de leucócitos a essas moléculas que são responsáveis pelos eventos iniciais de rolamento destas células em epitélios ativadas. Isso indica que a redução da MPO no tecido lesado observada no presente trabalho pode estar relacionada interação do CS com as L- e P-selectinas, impedindo a invasão das células inflamatórias. Em outro trabalho é mostrado que esta interação depende do grau de sulfatação do GAG envolvido no processo (KAWASHIMA *et al.*, 2002).

A supressão do infiltrado de macrófagos resulta na inibição da ativação de células estreladas causada pela lesão, o que pode aumentar o efeito de redução de lesão tecidual (IMAMURA *et al.*, 2005).

O processo inflamatório acaba por induzir a produção de moléculas de MEC, tais como colágeno, por fibroblastos portais, o que contribui com a fibrogênese nas lesões colestáticas (BEAUSSIER *et al.*, 2007). Em paralelo ocorrem mudanças patológicas na MEC, como consequências da alteração no delicado equilíbrio entre as MMPs e seus inibidores tissulares (TIMPs), contribuindo significativamente com a fibrogênese e ditando o processo de piora ou melhora no quadro (KOSSAKOWSKA *et al.*, 1998). A destruição precoce da matriz hepática normal por proteases acelera sua substituição por tecido conjuntivo, o que tem efeitos deletérios na função celular.

As células estreladas são responsáveis pelo equilíbrio desta degradação, sendo principal fonte de MMP-2 (MILANI *et al.*, 1994) e MMP-9 (HAN *et al.*, 2007) e dos inibidores TIMP-1 e TIMP-2 (ARTHUR, 2000).

É possível observar nos cortes histológicos deste trabalho um elevado grau de alteração da arquitetura hepática, com ocorrência de proliferação ductal já a partir do grupo 2 dias (Tabela 4; Figuras 17 e 18), havendo progressiva substituição do parênquima por tecido conjuntivo.

Este remodelamento tecidual também é refletido nas atividades de pró MMP-2 e MMP-2, com significativa elevação indicando um processo de renovação da matriz mais ativo. O tratamento dos animais induzidos reduziu a atividade destas enzimas, apontando a capacidade do CS de proteger o tecido do processo fibrótico (Figuras 23 e 24). O aumento marcante da expressão de MMP-2 é característico da cirrose, indicando que o composto utilizado pode retardar o desenvolvimento da doença (BENYON *et al.*, 1996).

Como observado na Figura 24 houve um grande aumento na atividade de MMP-9 nos animais com colestase, com diminuição significativa após o tratamento com CS. Essas enzimas têm participação ativa na degradação de macromoléculas extracelulares como colágeno e estão aumentadas durante a fibrogênese. Vários trabalhos destacam a grande importância da MMP-9, correlacionando sua presença com a atividade da doença, sendo a redução de sua atividade importantíssima para o controle das patologias inflamatórias (BAUGH *et al.*, 1999; SANTANA *et al.*, 2006; GARG *et al.*, 2009).

Os PGs são importantes constituintes da MEC do fígado. Estudos anteriores mostraram que os principais GAGs encontrados nestas macromoléculas no tecido hepático são condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato, onde estão diretamente relacionados ao controle do crescimento dos hepatócitos (OHNISHI *et al.*, 1975; KAWAKAMI e TERAYAMA, 1981; KOIDE *et al.*, 1989; OTSU *et al.*, 1992). Por eletroforese em gel de agarose em tampão PDA foi possível avaliar o perfil de GAGs no fígado dos animais estudados após a degradação proteolítica do material com papaína.

O aumento na concentração de CS observado nos animais tratados comprova a absorção do composto exógeno pelo tecido (Figuras 25, 26 e 27). Aumento da quantidade de DS também foi observado (Figura 26), provavelmente devido à tentativa de regeneração tecidual pelas células estreladas. De modo semelhante, aumento de PGs de DS foi observado em

córneas após desepitelização (SORIANO *et al.*, 2000). O HS é um GAG de superfície e a elevação de seus níveis indica maior presença de tipos celulares no tecido devido a proliferação ductal (Figuras 26 e 27) em consequência da fibrogênese neste tecido. Tanto o DS quanto o HS sofreram redução nos animais induzidos tratados com CS.

As células estreladas são responsáveis pela produção de MEC nos tecidos lesados. CS leva a redução de ativação destas células devido aos diversos mecanismos propostos (redução de infiltrado inflamatório, redução de produção de citocinas inflamatórias por inibição do NF- κ B e redução da degradação da MEC), levando a uma menor produção de matriz, com consequente diminuição nos níveis dos GAGs, nos tecidos dos animais BDL tratados.

Apesar da relação entre inflamação e fibrose não ser sempre direta devido a complexa interação entre os tipos e vias celulares, a redução da inflamação e da resposta imune são reconhecidas como as principais formas de prevenção à fibrose (DING *et al.*, 2011).

Este trabalho é o primeiro a demonstrar os efeitos do CS no modelo de colestase extra-hepática induzida por BDL. Os resultados mostram que o composto pode estar envolvido em várias vias reduzindo a lesão, fibrose e inflamação no fígado dos animais utilizados no trabalho.

CS pode ser uma alternativa para o tratamento dos sintomas gerados pela colestase, sendo capaz de retardar o processo de fibrose que precede a cirrose hepática.

6 CONCLUSÃO

O condroitim sulfato apresenta atividade anti-inflamatória e hepatoprotetora pois no modelo de colestase extra-hepática induzida por BDL foi capaz de reduzir os efeitos de lesão hepática causada pelo modelo, impedir a infiltração leucocitária (observado pela redução na atividades de mieloperoxidase) e inibir a ativação da metaloproteases de matriz MMP-2 e MMP-9 além de reduzir a síntese de glicosaminoglicanos na matriz extracelular hepática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, J. A.; LIMA, C. R.; BERTO, A. G.; MICHELACCI, Y. M. An improved methodology to produce *Flavobacterium heparinum* chondroitinases, important instruments for diagnosis of diseases. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 37, n. Pt 2, p. 115-27, Apr 2003.

ALLER, M. A.; ARIAS, J. L.; GARCIA-DOMINGUEZ, J.; ARIAS, J. I.; DURAN, M.; ARIAS, J. Experimental obstructive cholestasis: the wound-like inflammatory liver response. **Fibrogenesis & tissue repair**, v. 1, n. 1, p. 6, 2008.

ARIAS, I.; WOLKOFF, A.; BOYER, J.; SHAFRITZ, D.; FAUSTO, N.; ALTER, H.; COHEN, D. **The Liver: Biology and Pathobiology**. Wiley, 2009.

ARTHUR, M. J. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 279, n. 2, p. G245-9, Aug 2000.

BAUGH, M. D.; PERRY, M. J.; HOLLANDER, A. P.; DAVIES, D. R.; CROSS, S. S.; LOBO, A. J.; TAYLOR, C. J.; EVANS, G. S. Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 117, n. 4, p. 814-22, Oct 1999.

BEAUSSIER, M.; WENDUM, D.; SCHIFFER, E.; DUMONT, S.; REY, C.; LIENHART, A.; HOUSSET, C. Prominent contribution of portal mesenchymal cells to liver fibrosis in ischemic and obstructive cholestatic injuries. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 87, n. 3, p. 292-303, Mar 2007.

BELMIRO, C. L.; GONCALVES, R. G.; KOZLOWSKI, E. O.; WERNECK, A. F.; TAKYIA, C. M.; LEITE-JR, M.; PAVAO, M. S. Dermatan sulfate reduces monocyte chemoattractant protein 1 and TGF-beta production, as well as macrophage recruitment and myofibroblast accumulation in mice with unilateral ureteral obstruction. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]**, v. 44, n. 7, p. 624-33, 2011.

BENYON, R. C.; IREDALE, J. P.; GODDARD, S.; WINWOOD, P. J.; ARTHUR, M. J. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. **Gastroenterology**, v. 110, n. 3, p. 821-31, Mar 1996.

BERGER, M. L.; BHATT, H.; COMBES, B.; ESTABROOK, R. W. CCl4-induced toxicity in isolated hepatocytes: the importance of direct solvent injury. **Hepatology**, v. 6, n. 1, p. 36-45, Jan-Feb 1986.

BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. **The Journal of pathology**, v. 214, n. 2, p. 149-60, Jan 2008.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **The Journal of investigative dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206-9, Mar 1982.

BRASIL, M. S. **Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde. DATASUS.** <http://www.datasus.gov.br>: Brasília.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia.** 8ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

CAMPO, G. M.; AVENOSO, A.; CAMPO, S.; D'ASCOLA, A.; TRAINA, P.; SAMA, D.; CALATRONI, A. Purified human plasma glycosaminoglycans reduced NF-kappaB activation, pro-inflammatory cytokine production and apoptosis in LPS-treated chondrocytes. **Innate immunity**, v. 14, n. 4, p. 233-46, 2008.

CAMPO, G. M.; AVENOSO, A.; CAMPO, S.; FERLAZZO, A. M.; MICALI, C.; ZANGHI, L.; CALATRONI, A. Hyaluronic acid and chondroitin-4-sulphate treatment reduces damage in carbon tetrachloride-induced acute rat liver injury. **Life sciences**, v. 74, n. 10, p. 1289-305, Jan 23 2004.

CANAS, N.; GORINA, R.; PLANAS, A. M.; VERGES, J.; MONTELL, E.; GARCIA, A. G.; LOPEZ, M. G. Chondroitin sulfate inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in rat astrocytes by preventing nuclear factor kappa B activation. **Neuroscience**, v. 167, n. 3, p. 872-9, May 19 2010.

CHANG, S. W.; OHARA, N. Pulmonary circulatory dysfunction in rats with biliary cirrhosis. An animal model of the hepatopulmonary syndrome. **The American review of respiratory disease**, v. 145, n. 4 Pt 1, p. 798-805, Apr 1992.

CINEL, I.; OPAL, S. M. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. **Critical care medicine**, v. 37, n. 1, p. 291-304, Jan 2009.

CUNHA, A. L. **Aplicação da FACE na Análise de Condroitim Sulfato de Uso Farmacêutico.** 2012. 141 (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFJF, Biblioteca Universitária.

DESMOULIERE, A.; DARBY, I.; COSTA, A. M.; RACCURT, M.; TUCHWEBER, B.; SOMMER, P.; GABBIANI, G. Extracellular matrix deposition, lysyl oxidase expression, and myofibroblastic differentiation during the initial stages of cholestatic fibrosis in the rat. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 76, n. 6, p. 765-78, Jun 1997.

DI FERRANTE, N. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. **The Journal of biological chemistry**, v. 220, n. 1, p. 303-6, May 1956.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 645-647, 1976.

DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. Fractionation and properties of four heparitin sulfates from beef lung tissue: Isolation and partial characterization of a homogeneous species of heparitin sulfate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 343, n. 1, p. 34-44, 1974.

DIETRICH, C. P.; SCHIBUOLA, C. T.; SAMPAIO, L. O.; IBARA, I. Changes in the composition of sulfated mucopolysaccharides during neoplastic transformation of cerebral tissue. **Cancer research**, v. 38, n. 11 Pt 1, p. 3969-3971, 1978.

DING, Z.; KNG, Y.; YANG, H.; KE, Z.; ZHUO, L. An orally available small imidazolium salt ameliorates inflammation and fibrosis in a murine model of cholestasis. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 91, n. 5, p. 752-63, May 2011.

ESKO, J. D.; KIMATA, K.; LINDAHL, U. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. In: VARKI, A.; CUMMINGS, R. D., *et al* (Ed.). **Essentials of Glycobiology**. Cold Spring Harbor NY: The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California, 2009.

FAUBION, W. A.; GUICCIARDI, M. E.; MIYOSHI, H.; BRONK, S. F.; ROBERTS, P. J.; SVINGEN, P. A.; KAUFMANN, S. H.; GORES, G. J. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. **The journal of clinical investigation**, v. 103, n. 1, p. 137-45, Jan 1999.

FIEDLER, T. J.; DAVEY, C. A.; FENNA, R. E. X-ray crystal structure and characterization of halide-binding sites of human myeloperoxidase at 1.8 Å resolution. **The journal of biological chemistry**, v. 275, n. 16, p. 11964-71, Apr 21 2000.

GARG, P.; VIJAY-KUMAR, M.; WANG, L.; GEWIRTZ, A. T.; MERLIN, D.; SITARAMAN, S. V. Matrix metalloproteinase-9-mediated tissue injury overrides the protective effect of matrix metalloproteinase-2 during colitis. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 296, n. 2, p. G175-84, Feb 2009.

GREIM, H.; TRULZSCH, D.; CZYGAN, P.; RUDICK, J.; HUTTERER, F.; SCHAFFNER, F.; POPPER, H. Mechanism of cholestasis. 6. Bile acids in human livers with or without biliary obstruction. **Gastroenterology**, v. 63, n. 5, p. 846-50, Nov 1972.

GUJRAL, J. S.; FARHOOD, A.; BAJT, M. L.; JAESCHKE, H. Neutrophils aggravate acute liver injury during obstructive cholestasis in bile duct-ligated mice. **Hepatology**, v. 38, n. 2, p. 355-63, Aug 2003.

GULUBOVA, M. V. Ultrastructural sinusoidal changes in extrahepatic cholestasis. Light and electron microscopic immunohistochemical localization of collagen type III and type IV. **Acta histochemica**, v. 98, n. 3, p. 271-83, Jul 1996.

HAN, Y. P.; YAN, C.; ZHOU, L.; QIN, L.; TSUKAMOTO, H. A matrix metalloproteinase-9 activation cascade by hepatic stellate cells in trans-differentiation in the three-dimensional extracellular matrix. **The journal of biological chemistry**, v. 282, n. 17, p. 12928-39, 2007.

HAVEMAN, J.; JAMES, J.; GEERDINK, A. Collagen content in rat liver after experimentally induced cholestasis followed by choledochojejunostomy and X-irradiation. **Liver**, v. 16, n. 3, p. 195-200, Jun 1996.

HERNANDEZ-GEA, V.; FRIEDMAN, S. L. Pathogenesis of liver fibrosis. **Annual review of pathology**, v. 6, p. 425-56, 2011.

HILBORN, J. C.; ANASTASSIADIS, P. A. Estimation of the molecular weights of acidic mucopolysaccharides by polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 88-92, 1971.

IMADA, K.; OKA, H.; KAWASAKI, D.; MIURA, N.; SATO, T.; ITO, A. Anti-arthritic action mechanisms of natural chondroitin sulfate in human articular chondrocytes and synovial fibroblasts. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 33, n. 3, p. 410-4, 2010.

IMAMURA, M.; OGAWA, T.; SASAGURI, Y.; CHAYAMA, K.; UENO, H. Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats. **Gastroenterology**, v. 128, n. 1, p. 138-46, Jan 2005.

IOZZO, R. V. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. **Annual review of biochemistry**, v. 67, p. 609-52, 1998.

JACKSON, R. L.; BUSCH, S. J.; CARDIN, A. D. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. **Physiological reviews**, v. 71, n. 2, p. 481-539, Apr 1991.

JOMPHE, C.; GABRIAC, M.; HALE, T. M.; HEROUX, L.; TRUDEAU, L. E.; DEBLOIS, D.; MONTELL, E.; VERGES, J.; DU SOUICH, P. Chondroitin sulfate inhibits the nuclear translocation of nuclear factor-kappaB in interleukin-1beta-stimulated chondrocytes. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 102, n. 1, p. 59-65, Jan 2008.

JORDAN, K. M. EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). **Annals of the rheumatic diseases**, v. 62, n. 12, p. 1145-1155, 2003.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 11^a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KAHAN, A.; UEBELHART, D.; DE VATHAIRE, F.; DELMAS, P. D.; REGINSTER, J. Y. Long-term effects of chondroitins 4 and 6 sulfate on knee osteoarthritis: the study on osteoarthritis progression prevention, a two-year, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Arthritis and rheumatism**, v. 60, n. 2, p. 524-33, Feb 2009.

KASPER, D. L.; FAUCI, A. S.; LONGO, D. L.; BRAUNWALD, E.; HAUSER, S. L.; JAMESON, J. L. **Harrison's principles of internal medicine**. McGraw-Hill, Medical Publishing Division, 2005.

KAWAKAMI, H.; TERAYAMA, H. Liver plasma membranes and proteoglycan prepared therefrom inhibit the growth of hepatoma cells in vitro. **Biochimica et biophysica acta**, v. 646, n. 1, p. 161-8, Aug 6 1981.

KAWASHIMA, H.; ATARASHI, K.; HIROSE, M.; HIROSE, J.; YAMADA, S.; SUGAHARA, K.; MIYASAKA, M. Oversulfated chondroitin/dermatan sulfates containing GlcA β 1/IdoA α 1-3GalNAc(4,6-O-disulfate) interact with L- and P-selectin and chemokines. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 15, p. 12921-30, Apr 12 2002.

KAWASHIMA, H.; HIROSE, M.; HIROSE, J.; NAGAKUBO, D.; PLAAS, A. H.; MIYASAKA, M. Binding of a large chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan, versican, to L-selectin, P-selectin, and CD44. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 45, p. 35448-56, Nov 10 2000.

KIM, K. H.; KIM, H. C.; HWANG, M. Y.; OH, H. K.; LEE, T. S.; CHANG, Y. C.; SONG, H. J.; WON, N. H.; PARK, K. K. The antifibrotic effect of TGF-beta1 siRNAs in murine model of liver cirrhosis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 343, n. 4, p. 1072-8, May 19 2006.

KOIDE, N.; SHINJI, T.; TANABE, T.; ASANO, K.; KAWAGUCHI, M.; SAKAGUCHI, K.; KOIDE, Y.; MORI, M.; TSUJI, T. Continued high albumin production by multicellular spheroids of adult rat hepatocytes formed in the presence of liver-derived proteoglycans. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 161, n. 1, p. 385-91, May 30 1989.

KOSSAKOWSKA, A. E.; EDWARDS, D. R.; LEE, S. S.; URBANSKI, L. S.; STABBLER, A. L.; ZHANG, C. L.; PHILLIPS, B. W.; ZHANG, Y.; URBANSKI, S. J. Altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental biliary fibrosis. **The american journal of pathology**, v. 153, n. 6, p. 1895-902, Dec 1998.

KWO, P.; PATEL, T.; BRONK, S. F.; GORES, G. J. Nuclear serine protease activity contributes to bile acid-induced apoptosis in hepatocytes. **The american journal of physiology**, v. 268, n. 4 Pt 1, p. G613-21, Apr 1995.

LEE, S.; KIM, S.; LE, H. D.; MEISEL, J.; STRIJBOSCH, R. A.; NOSE, V.; PUDER, M. Reduction of hepatocellular injury after common bile duct ligation using omega-3 fatty acids. **Journal of pediatric surgery**, v. 43, n. 11, p. 2010-5, Nov 2008.

LEE, U. E.; FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. **Best practice & research clinical gastroenterology**, v. 25, n. 2, p. 195-206, 2011.

LI, M. K.; CRAWFORD, J. M. The pathology of cholestasis. **Seminars in liver disease**, v. 24, n. 1, p. 21-42, Feb 2004.

LIU, T. Z.; LEE, K. T.; CHERN, C. L.; CHENG, J. T.; STERN, A.; TSAI, L. Y. Free radical-triggered hepatic injury of experimental obstructive jaundice of rats involves overproduction of proinflammatory cytokines and enhanced activation of nuclear factor kappaB. **Annals of clinical and laboratory science**, v. 31, n. 4, p. 383-90, Oct 2001.

LOHMANDER, L. S.; DE LUCA, S.; NILSSON, B.; HASCALL, V. C.; CAPUTO, C. B.; KIMURA, J. H.; HEINEGARD, D. Oligosaccharides on proteoglycans from the swam rat chondrosarcoma. **The journal of biological chemistry**, v. 255, n. 13, p. 6084-91, Jul 10 1980.

MALHI, H.; GORES, G. J.; LEMASTERS, J. J. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? **Hepatology**, v. 43, n. 2 Suppl 1, p. S31-44, Feb 2006.

MARRA, F.; DEFRANCO, R.; GRAPPONE, C.; MILANI, S.; PASTACALDI, S.; PINZANI, M.; ROMANELLI, R. G.; LAFFI, G.; GENTILINI, P. Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 during active hepatic fibrogenesis: correlation with monocyte infiltration. **The american journal of pathology**, v. 152, n. 2, p. 423-30, Feb 1998.

MARTEL-PELLETIER, J.; BOILEAU, C.; PELLETIER, J. P.; ROUGHLEY, P. J. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. **Best practice & research. Clinical rheumatology**, v. 22, n. 2, p. 351-84, Apr 2008.

MEDINA, C.; RADOMSKI, M. W. Role of matrix metalloproteinases in intestinal inflammation. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 318, n. 3, p. 933-8, Sep 2006.

MICHELACCI, Y. M.; HORTON, D. S. P. Q. Proteoglycans from the cartilage of young hammerhead shark *Sphyrna lewini*. **Comparative biochemistry and physiology part B: comparative biochemistry**, v. 92, n. 4, p. 651-658, 1989.

MICHELACCI, Y. M.; MOURÃO, P. A. S.; LAREDO, J.; DIETRICH, C. P. Chondroitin Sulfates and Proteoglycans from Normal and Arthrosic Human Cartilage. **Connective tissue research**, v. 7, n. 1, p. 29-36, 1979.

MIKAMI, T.; KITAGAWA, H. Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1830, n. 10, p. 4719-4733, Jun 14 2013.

MILANI, S.; HERBST, H.; SCHUPPAN, D.; GRAPPONE, C.; PELLEGRINI, G.; PINZANI, M.; CASINI, A.; CALABRO, A.; CIANCIO, G.; STEFANINI, F.; ET AL. Differential expression of matrix-metalloproteinase-1 and -2 genes in normal and fibrotic human liver. **The american journal of pathology**, v. 144, n. 3, p. 528-37, Mar 1994.

MIURA, R. O.; YAMAGATA, S.; MIURA, Y.; HARADA, T.; YAMAGATA, T. Analysis of glycosaminoglycan-degrading enzymes by substrate gel electrophoresis (zymography). **Analytical biochemistry**, v. 225, n. 2, p. 333-40, Mar 1 1995.

MORETTO, L. D.; DIAS, R. A. **DCB: Denominações comuns brasileiras de fármacos e medicamentos**. Federação Brasileira da Indústria Farmacêutica, 2005.

MURIEL, P. Role of free radicals in liver diseases. **Hepatology international**, v. 3, n. 4, p. 526-36, Dec 2009.

MURIEL, P.; MORENO, M. G.; HERNANDEZ MDEL, C.; CHAVEZ, E.; ALCANTAR, L. K. Resolution of liver fibrosis in chronic CCl₄ administration in the rat after discontinuation of treatment: effect of silymarin, silibinin, colchicine and trimethylcolchicinic acid. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 96, n. 5, p. 375-80, May 2005.

MURIEL, P.; MOURELLE, M. The role of membrane composition in ATPase activities of cirrhotic rat liver: effect of silymarin. **Journal of applied toxicology : JAT**, v. 10, n. 4, p. 281-4, Aug 1990.

NADER, H. B. Characterization of a heparan sulfate and a peculiar chondroitin 4-sulfate proteoglycan from platelets. Inhibition of the aggregation process by platelet chondroitin sulfate proteoglycan. **The journal of biological chemistry**, v. 266, n. 16, p. 10518-23, Jun 5 1991.

NAGAOKA, M. R.; LE SUEUR-MALUF, L.; AGUIAR, O., JR.; CASTRO, G. M.; SPADARI-BRATFISCH, R. C.; RIBEIRO, D. A. Differential response related to genotoxicity in multiple organs of cirrhotic rats. **Hepatology international**, v. 5, n. 2, p. 740-6, Jun 2011.

OHNISHI, T.; OHSHIMA, E.; OHTSUKA, M. Effect of liver cell coat acid mucopolysaccharide on the appearance of density-dependent inhibition in hepatoma cell growth. **Experimental cell research**, v. 93, n. 1, p. 136-42, Jun 1975.

OHNO, H.; NAITO, Y.; NAKAJIMA, H.; TOMITA, M. Construction of a biological tissue model based on a single-cell model: a computer simulation of metabolic heterogeneity in the liver lobule. **Artificial life**, v. 14, n. 1, p. 3-28, Winter 2008.

OLIVEIRA, L. G. **Avaliação da Atividade Anti-Inflamatória de Condroitim Sulfato e Glucosamina em Modelo Experimental de Colite Ulcerativa em Ratos**. 2013. 88 (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Saúde Brasileira, UFJF, Biblioteca Universitária.

OONUKEI, Y.; YOSHIDA, Y.; UCHIYAMA, Y.; ASARI, A. Application of fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis to analysis of disaccharides and oligosaccharides derived from glycosaminoglycans. **Analytical biochemistry**, v. 343, n. 2, p. 212-22, Aug 15 2005.

OTSU, K.; KATO, S.; OHTAKE, K.; AKAMATSU, N. Alteration of rat liver proteoglycans during regeneration. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 294, n. 2, p. 544-9, May 1 1992.

PATEL, T.; BRONK, S. F.; GORES, G. J. Increases of intracellular magnesium promote glycodeoxycholate-induced apoptosis in rat hepatocytes. **The journal of clinical investigation**, v. 94, n. 6, p. 2183-92, Dec 1994.

RA, H. J.; PARKS, W. C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. **Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 26, n. 8, p. 587-96, Oct 2007.

RAVI, A.; GARG, P.; SITARAMAN, S. V. Matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease: boon or a bane? **Inflammatory bowel diseases**, v. 13, n. 1, p. 97-107, Jan 2007.

SAMPAIO, L. O.; NADER, H. B. Emergence and structural characteristics of chondroitin sulfates in the animal kingdom. **Advances in pharmacology**, v. 53, p. 233-51, 2006.

SANTANA, A.; MEDINA, C.; PAZ-CABRERA, M. C.; DIAZ-GONZALEZ, F.; FARRE, E.; SALAS, A.; RADOMSKI, M. W.; QUINTERO, E. Attenuation of dextran sodium sulphate induced colitis in matrix metalloproteinase-9 deficient mice. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 12, n. 40, p. 6464-72, Oct 28 2006.

SCHMUCKER, D. L.; OHTA, M.; KANAI, S.; SATO, Y.; KITANI, K. Hepatic injury induced by bile salts: correlation between biochemical and morphological events. **Hepatology**, v. 12, n. 5, p. 1216-21, Nov 1990.

SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Annual review of immunology**, v. 23, p. 197-223, 2005.

SHAPIRO, S. D.; KELLEY, D.; KOBAYASHI, D. Measurement of Metalloproteinase. **Methods in molecular medicine**, v. 56, p. 383-390, 2001.

SILVA, L. C. Isolation and purification of chondroitin sulfate. **Advances in pharmacology**, v. 53, p. 21-31, 2006.

SORIANO, E. S.; CAMPOS, M. S.; MICHELACCI, Y. M. Effect of epithelial debridement on glycosaminoglycan synthesis by human corneal explants. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 295, n. 1-2, p. 41-62, May 2000.

STYLIANOU, M.; TRIANTAPHYLLIDOU, I. E.; VYNIOS, D. H. Advances in the analysis of chondroitin/dermatan sulfate. **Advances in pharmacology**, v. 53, p. 141-66, 2006.

SUGAHARA, K.; KITAGAWA, H. Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans. **Current opinion in structural biology**, v. 10, n. 5, p. 518-527, 2000.

SUGAHARA, K.; MIKAMI, T.; UYAMA, T.; MIZUGUCHI, S.; NOMURA, K.; KITAGAWA, H. Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. **Current opinion in structural biology**, v. 13, n. 5, p. 612-620, 2003.

SUZUKI, S.; SAITO, H.; YAMAGATA, T.; ANNO, K.; SENO, N.; KAWAI, Y.; FURUHASHI, T. Formation of three types of disulfated disaccharides from chondroitin sulfates by chondroitinase digestion. **The journal of biological chemistry**, v. 243, n. 7, p. 1543-50, Apr 10 1968.

TEIXEIRA, C. I. G. **Acção de um bloqueador β 1 na lesão hepática induzida pela ligadura do conducto biliar comum em ratos Wistar - Estudos preliminares**. 2010. (Mestrado). Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

TORTORA, G. J.; GRABOWSKI, S. R. **Corpo humano: fundamentos de anatomia e fisiologia**. Artmed, 2007.

TUCHWEBER, B.; DESMOULIERE, A.; BOCHATON-PIALLAT, M. L.; RUBBIA-BRANDT, L.; GABBIANI, G. Proliferation and phenotypic modulation of portal fibroblasts in the early stages of cholestatic fibrosis in the rat. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 74, n. 1, p. 265-78, Jan 1996.

UEBELHART, D. Clinical review of chondroitin sulfate in osteoarthritis. **Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society**, v. 16 Suppl 3, p. S19-21, 2008.

UEBELHART, D.; KNOLS, R.; DE BRUIN, E. D.; VERBRUGGEN, G. Chondroitin sulfate as a structure-modifying agent. **Advances in pharmacology**, v. 53, p. 475-88, 2006.

VALLIERES, M.; DU SOUICH, P. Modulation of inflammation by chondroitin sulfate. **Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society**, v. 18 Suppl 1, p. S1-6, Jun 2010.

VOLPI, N. Analytical aspects of pharmaceutical grade chondroitin sulfates. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 96, n. 12, p. 3168-3180, 2007.

_____. Quality of different chondroitin sulfate preparations in relation to their therapeutic activity. **The journal of pharmacy and pharmacology**, v. 61, n. 10, p. 1271-80, Oct 2009.

_____. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulphate: new functions from an old natural macromolecule. **Inflammopharmacology**, v. 19, n. 6, p. 299-306, Dec 2011.

WEBER, L. W.; BOLL, M.; STAMPFL, A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. **Critical reviews in toxicology**, v. 33, n. 2, p. 105-36, 2003.

ZHANG, W.; MOSKOWITZ, R. W.; NUKI, G.; ABRAMSON, S.; ALTMAN, R. D.; ARDEN, N.; BIERMA-ZEINSTRA, S.; BRANDT, K. D.; CROFT, P.; DOHERTY, M.; DOUGADOS, M.; HOCHBERG, M.; HUNTER, D. J.; KWOH, K.; LOHMANDER, L. S.; TUGWELL, P. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. **Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society**, v. 16, n. 2, p. 137-62, Feb 2008.

ZHANG, Y. X.; DONG, W.; LIU, H.; CICUTTINI, F.; DE COURTEN, M.; YANG, J. B. Effects of chondroitin sulfate and glucosamine in adult patients with Kaschin-Beck disease. **Clinical rheumatology**, v. 29, n. 4, p. 357-62, Apr 2010.

ZHONG, J.; KYRIAKIS, J. M. Dissection of a signaling pathway by which pathogen-associated molecular patterns recruit the JNK and p38 MAPKs and trigger cytokine release. **The journal of biological chemistry**, v. 282, n. 33, p. 24246-54, Aug 17 2007.

ZOU, X. H.; JIANG, Y. Z.; ZHANG, G. R.; JIN, H. M.; NGUYEN, T. M.; OUYANG, H. W. Specific interactions between human fibroblasts and particular chondroitin sulfate molecules for wound healing. **Acta biomaterialia**, v. 5, n. 5, p. 1588-95, Jun 2009.