

MÁRCIO LUIS ALVES MOURA

**DISTRIBUIÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO NA PELE DE RATAS
OOFORECTOMIZADAS APÓS ADMINISTRAÇÃO DE GLICOSAMINA
SULFATO E CONDROITIM SULFATO**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Mestre em Ciências pelo programa de pós-graduação em Morfologia e Genética.

Orientadora:

Profa. Dra. Olga Maria de Toledo Corrêa.

SÃO PAULO

2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E GENÉTICA**

Chefe do Departamento:

Profa. Dra. Marília Arruda Smith

Coordenador do Curso de Pós-Graduação:

Profa. Dra. Janete Maria Ferutti

Márcio Luis Alves Moura

**DISTRIBUIÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO NA PELE DE RATAS
OOFORRECTOMIZADAS APÓS ADMINISTRAÇÃO DE GLICOSAMINA SULFATO E
CONDROITIM SULFATO**

Presidente da Banca:

Profa. Dra. Olga Maria de Toledo Corrêa _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Elia Tamaso Espin Garcia Caldini _____

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro _____

Profa. Dra. Maria Aparecida da Silva Pinhal _____

Suplente:

Profa. Dra. Mônica de Campos Pinheiro _____

*Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo
começo, qualquer um pode começar agora e fazer um
novo fim.*

(Chico Xavier)

A Deus

“Pela oportunidade de viver e por demonstrar em todos momentos da minha vida o seu grandioso amor. Por me presentear com minha família, meus amigos e meus professores... MUITO OBRIGADO SENHOR”

*Aos meus pais Luis Alves Moura e Ana Lina de Almeida Moura
(in memoriam)*

“A vocês que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, a vocês que iluminaram os meus caminhos com afeto e dedicação, a vocês que se doaram por inteiro e renunciaram aos seus sonhos, para que muitas vezes pudessem realizar os meus. Que com amor e carinho educaram-me segundo os ensinamentos de Cristo, ensinando-me a amar e a respeitar o próximo. Suas palavras de incentivo, correção, compreensão e dedicação sempre me impulsionaram a enfrentar os obstáculos da vida com objetivo de alcançar o crescimento espiritual, pessoal e profissional. AMO VOCÊS hoje e sempre, muitas saudades...”

DEDICATÓRIA

Ao meu querido avô **João** (*in memoriam*) e minha querida avó **Maria Deolinda** que além de avós também foram meus pais, me ajudando sempre com muito amor, carinho e dedicação. AMO VOCÊS!

As minhas queridas irmãs **Rosana, Luciane e Liliane**. Vocês são minhas companheiras e o que tenho de mais importante na vida. Amo vocês e agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de poder caminhar ao lado de pessoas guerreiras como vocês. Obrigado por me apoiarem e sempre me acolherem. AMO VOCÊS!

Ao meu sobrinho **Luis Felipe** e minha sobrinha **Layla** que são os amores da família e que sempre poderão contar com o tio. AMO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Profa. Dra. Olga Maria De Toledo Corrêa**, pela oportunidade de tê-la como orientadora, pelos votos de confiança em mim depositado, pelas palavras de correção, incentivo, dedicação, paciência e bondade. Admiro-a pelo amor que tem pela profissão e dedicação a pesquisa científica, sabedoria e ética profissional. Muito obrigada por tudo!

A **Profa. Dra. Elia Tamaso Espin Garcia Caldini**, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela simpatia, generosidade, confiança e por ter me acolhido em seu laboratório, contribuindo para a realização deste trabalho.

A **Profa. Dra. Maria Aparecida da Silva Pinhal**, do Departamento de Biologia Molecular da UNIFESP-EPM, pela paciência, dedicação, ensinamentos e auxílio precioso na realização de técnicas em seu laboratório.

Ao meu primo **Prof. Dr. Oswaldo Alves Mora** (*in memoriam*), pelo incentivo e por ser fonte de minha inspiração pessoal e profissional. Pelo exemplo de que se pode viver com alegria e harmonia. E principalmente por ter me dado esperança.

A minha prima **Juliana Mora Veridiano**, amiga e companheira de laboratório pela paciência, incentivo, apoio constante e por fazer parte desta minha trajetória pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

Ao meu primo **Prof. Mestre Adriano Mora Veridiano**, pela amizade, disponibilidade, conselhos e principalmente por todos ensinamentos.

A **Profa. Dra. Helena B. Nader** do Departamento de Biologia Molecular da UNIFESP-EPM, pela oportunidade da realização de experimentos em seu laboratório.

A **Aline Mendes e Carina Mucciolo Melo** do Departamento de Biologia Molecular da UNIFESP-EPM, pela colaboração, disponibilidade, ensinamentos e informações sobre métodos bioquímicos.

Aos amigos e companheiros de pós-graduação da UNIFESP-EPM, **Leonardo, Wémeson, Milene, Roberta, Regina, Mônica, Miriam, Rinaldo, Adriana, Renato, Pedro, Rafael, Robson, Carina, Gisela, Heloísa e Magali**.

A **Silvia Cristina Borragini Abuchaim** pela sua amizade, simpatia, paciência e por estar sempre disponível para ajudar os alunos.

Aos **professores** do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP-EPM), pela contribuição em minha formação durante a pós-graduação.

Aos funcionários da Disciplina de Histologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP-EPM), **Kellen, Ilça, Pedro, Edinaldo, Paulinho, Cida, Licurgo e Luzia**, pelo companheirismo, atenção, ajuda e ótima convivência.

Aos funcionários e pós graduandos do LIM 59 FMUSP, **Cristina, Valéria, Felipe, Gildásio, Nilsa, Iris, Mariana, Marcelo, Claudia, Júlia e Gisele** pela simpatia e por estarem sempre dispostos em ajudar.

Aos meus amigos de muitos anos de convivência e de todas as horas **Aridel, Ivam, Jonilson, Luizinho e Celso**. Obrigado por fazerem parte da minha vida nos bons momentos e também naqueles momentos mais difíceis em que estiveram sempre ao meu lado.

A **todas as pessoas** que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho. Meu muito obrigado.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	vi
Agradecimentos Especiais.....	vii
Agradecimentos.....	ix
Resumo.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	06
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4. RESULTADOS.....	30
5. DISCUSSÃO.....	49
6. CONCLUSÕES.....	54
7. ANEXO.....	56
8. REFERÊNCIAS.....	59
9. Abstract.....	70
10. Bibliografia Consultada.....	72

RESUMO

Diversos fatores associados à menopausa contribuem para mudanças na pele, incluindo envelhecimento cronológico do organismo e a ausência de hormônios esteróides. Sabe-se que a supressão dos hormônios sexuais causa alterações na matriz extracelular. O ácido hialurônico (HA) é um glicosaminoglicano de alto peso molecular e é o maior componente da matriz extracelular da pele. A pele contém aproximadamente 50% de todo HA do organismo. Diversas funções biológicas foram atribuídas ao ácido hialurônico, tais como: estabilização da matriz extracelular, retenção de água, lubrificação de articulações, proliferação celular e regulação das atividades celular. A glicosamina sulfato (Glc) e o condroitim sulfato (CS), ambos componentes da matriz extracelular, têm sido utilizados no tratamento da osteoartrite. A glicosamina sulfato é um amino açúcar que está presente em todo tecido humano e é precursora na biossíntese dos glicosaminoglicanos e proteoglicanos. O condroitim sulfato é um glicosaminoglicano formado por unidades dissacarídicas repetidas contendo galactosamina sulfato e ácido glucurônico. Entretanto, os efeitos da glicosamina sulfato apenas ou associada ao condroitim sulfato (Glc/CS) ainda são desconhecidos na pele. O presente trabalho analisa a distribuição do ácido hialurônico na pele de ratas ooforectomizadas e tratadas com Glc ou Glc/CS. Ratas wistar (n = 50) foram divididas em dois grupos: não ooforectomizados (controle) e ooforectomizados (experimental). Os animais receberam por gavagem 0,0214 mg Dinaflex® (glicosamina sulfato) ou de Condroflex® (glicosamina sulfato + condroitim sulfato) por grama de peso do animal dissolvidos em 250 µl de água durante 45 e 60 dias. As peles foram retiradas e foram analisados os seguintes parâmetros: 1) espessura da derme e epiderme; 2) localização histoquímica do ácido hialurônico na epiderme e derme; 3) quantificação bioquímica do ácido hialurônico na pele. Os resultados mostraram que: 1) Animais ooforectomizados apresentam diminuição na concentração de ácido hialurônico na pele; 2) Animais ooforectomizados e tratados com água ou glicosamina sulfato ou glicosamina sulfato associada ao condroitim sulfato, por 45 e 60 dias não apresentam alterações na concentração de ácido hialurônico na pele; 3) A

administração terapêutica destes compostos deve levar em consideração as peculiaridades de cada tecido, uma vez que a literatura mostra que a cartilagem responde a administração terapêutica destes açúcares.

Moura, Márcio Luis Alves

Distribuição do ácido hialurônico na pele de ratas ooforectomizadas após administração de glicosamina sulfato e condroitim sulfato. / Márcio Luis Alves Moura. -- São Paulo, 2009.

xii, 73f.

Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Morfologia.

Título em inglês: Distribution of the hyaluronic acid in the skin of ovariectomy rats after glycosamine sulfate and chondroitin sulfate administration.

1. Pele. 2. Ácido Hialurônico. 3. Glucosamina. 4. Sulfatos de Condroitina. 5. Ovariectomia. 6. Ratos.

1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento da população mundial é um fenômeno novo ao qual mesmo os países mais ricos e poderosos ainda estão tentando se adaptar. Desde a década de 50, a maioria dos idosos vive em países do Terceiro Mundo. O Brasil, com as características de um país em desenvolvimento, passa pelo processo de aumento da expectativa de vida. O aumento da população idosa será da ordem de 15 vezes, entre 1950 e 2025, enquanto que o da população como um todo será de cinco vezes no mesmo período (Kalache et al., 1987).

Com melhorias na qualidade e na provisão dos cuidados médicos, a expectativa de vida média da mulher no mundo inteiro aumentou dramaticamente em relação ao século passado. Enquanto a população da mulher na menopausa aumenta, o interesse nos efeitos e na influência do hormônio estrógeno em diversos sistemas do corpo cresce cada vez mais (Shah, Maibach, 2001).

O hormônio estrógeno é benéfico em reduzir o risco de osteoporose, de fraturas óssea e possivelmente de doenças cardiovasculares nas mulheres. Embora os efeitos do hormônio estrógeno em diversos sistemas do corpo ter sido estudado, uma área pouco examinada, é a influência do hormônio estrógeno na pele (Shah, Maibach, 2001). A pele é um órgão alvo para vários tipos de hormônios incluindo o estrógeno (Schmidt et al., 1990).

A pele é o maior órgão do corpo. Anatomicamente, a pele é compreendida por duas camadas: a epiderme que forma a camada externa (tecido epitelial) e é constituída principalmente por queratinócitos e melanócitos. A derme forma a camada mais profunda compreendendo o volume maior da pele (tecido conjuntivo) e é constituída principalmente por células e matriz extracelular (Brincat et al., 2005). A matriz extracelular consiste em diferentes combinações de proteínas fibrosas, além de moléculas que incluem as glicoproteínas, os glicosaminoglicanos e proteoglicanos (Prost-Squarcioni et al., 2008).

A qualidade da pele piora com a idade devido aos efeitos do envelhecimento cronológico do organismo, fatores ambientais e de deficiência hormonal (Bologna et al., 1989). A função do hormônio estrógeno na

integridade da pele foi concretizada com a descoberta dos receptores para estrógeno em fibroblastos na derme e em queratinócitos na epiderme (MacLean et al., 1990; Brincat et al., 2005). Segundo Tammi (1991), os fibroblastos e os queratinócitos são as principais células que sintetizam o ácido hialurônico e de acordo com estudos realizados por Uzuka et al., (1981), o hormônio estrógeno aumenta consideravelmente a síntese de ácido hialurônico na pele de ratas.

A pele contém cerca de 0,5 a 1,0 mg de tecido molhado de ácido hialurônico, ou aproximadamente 50% de todo o HA de um dado organismo (Laurent e Fraser, 1992; Harada, Takahashi, 2007). Na pele, o ácido hialurônico, tem sido localizado na matriz extracelular do tecido conjuntivo (derme) e nos espaços intercelulares das camadas espinhosa, granulosa e córnea do tecido epitelial (epiderme) (Sakai et al., 2000).

O ácido hialurônico é um polímero linear de alto peso molecular. Este glicosaminoglicano é carregado negativamente e formado por unidades dissacarídicas de ácido D-glucurônico e N-acetil-D-glucosamina (Camenisch, McDonald, 2000; Day, Sheehan, 2001; Toole, 2001). Entre as funções do ácido hialurônico estão: expansão do espaço extracelular, lubrificação, retenção de água e regulação das atividades celular (Laurent et al., 1995).

A glicosamina é um amino açúcar presente em quase todos tecidos humanos. Este substrato é essencial na formação do ácido hialurônico e dos glicosaminoglicanos sulfatados que subseqüentemente são ligados covalentemente a um eixo protéico, formando a molécula de proteoglicano (Bissett, 2006). A glicosamina e o seu derivado N-acetil-glucosamina são prontamente sintetizados pelo organismo a partir da glicose (Anderson et al., 2005).

A molécula de condroitim sulfato é um polímero de cadeia longa formado por unidades dissacarídicas repetitivas contendo galactosamina sulfato e ácido glucurônico (Lippiello et al., 2000; Van Blitterswijk et al., 2003). O condroitim sulfato é um glicosaminoglicano que faz parte da composição da estrutura do proteoglicano Versican presente na pele (Carrino et al., 2000; Carrino et al., 2003). Este proteoglicano é detectado na camada basal da

epiderme e na derme associado com fibras elásticas e é um dos mais abundantes proteoglicanos encontrado na pele humana de adultos. Estudos demonstram que em função da idade, ocorre uma grande diminuição da quantidade deste proteoglicano na pele (Carrino et al., 2000).

Pesquisas recentes descrevem a glicosamina e o condroitim sulfato como sendo agentes que interferem na progressão da osteoartrite (Hungerford, Jones, 2003; Bruyere, Reginster 2007). A osteoartrite é caracterizada como uma degeneração da cartilagem articular e está relacionada com a progressão da idade dos indivíduos. A utilização da glicosamina e do condroitim sulfato como agentes modificadores da osteoartrite, está no fato destes componentes serem essenciais para a síntese de glicosaminoglicanos e na montagem dos proteoglicanos (Lippiello et al., 2000; Morelli et al., 2003).

Baseado nestas evidências, a glicosamina tem sido utilizada para acelerar a cicatrização de feridas, aumentar a hidratação da pele e na diminuição de rugas (Bissett, 2006). No entanto, na pele desprovida dos hormônios sexuais, o seu efeito na distribuição dos glicosaminoglicanos, principalmente do ácido hialurônico conhecido pela sua função na hidratação dos tecidos, ainda não foi analisado. Assim, torna-se importante um estudo mais detalhado sobre as alterações do ácido hialurônico decorrentes da sua diminuição, bem como, o papel da glicosamina e do condroitim sulfato nessas alterações para a utilização de estratégias de intervenção na pele de mulheres na pós-menopausa.

1.1 Objetivos

Analisar a distribuição do ácido hialurônico sobre influência dos hormônios sexuais em pele de ratas ooforectomizadas submetidas e não submetidas ao tratamento oral de dinaflex® 1,5g (glicosamina sulfato) e de condroflex® 1,5g + 1,2g (glicosamina sulfato + condroitim sulfato), por 45 e 60 dias de administração, nos seguintes parâmetros:

1. Medida da espessura da epiderme e derme;
2. Quantificação bioquímica do glicosaminoglicano ácido hialurônico na pele;
3. Localização histoquímica do glicosaminoglicano ácido hialurônico na epiderme e derme.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estrutura da pele

A pele é o maior órgão do corpo, constituindo 16% do peso corporal. É composta pela epiderme (derivada do ectoderma) e pela derme subjacente (derivada do mesoderma). Juntamente com seus anexos, as glândulas sudoríparas, as glândulas sebáceas, os folículos pilosos e as unhas formam o sistema tegumentar. Além de proporcionar uma cobertura para os tecidos moles subjacentes, a pele realiza outras funções, incluindo proteção contra lesões e invasão de bactérias; regulação da temperatura corporal; recepção de sensações contínuas do ambiente (exemplo: tato, temperatura e dor); excreção, a partir das glândulas sudoríparas; e absorção da radiação ultravioleta dos raios solares para a síntese de vitamina D (Gartner, Janes, 2007).

A epiderme é constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. Os queratinócitos são as células mais abundantes deste tecido, porém em menor quantidade apresenta ainda três tipos de células: os melanócitos que produzem o pigmento melanina, as células de Langerhans que fazem parte do sistema imunitário e as células de Merkel que representam receptores mecânicos (Gartner, Janes, 2007).

A espessura e a estrutura da epiderme são variáveis, sendo mais espessa e mais complexa nas regiões palmar e plantar, atingindo a espessura de até 1,5 mm. Partindo da derme para a superfície, a epiderme forma cinco camadas: 1) a camada basal ou germinativa constituída por células cubóides sobre a membrana basal que separa a epiderme da derme; 2) a camada espinhosa que é formada por células cubóides ou ligeiramente achatada, unidas por expansões citoplasmáticas através de desmossomos, o que dá a cada célula um aspecto espinhoso; 3) a camada granulosa, formada por células poligonais achatadas e apresenta o citoplasma carregado de grânulos basófilos; 4) a camada lúcida, evidente na pele espessa e constituída por células achatadas, cujos núcleos e organelas citoplasmáticas estão ausentes (foram digeridos por enzimas dos lisossomos); e, por fim, 5) a camada córnea que tem espessura variável e é constituída por células achatadas, mortas e

sem núcleo. O citoplasma dessas células apresenta-se repleto de queratina (Junqueira e Carneiro, 2004).

A estrutura de sustentação do epitélio é denominada membrana basal e consiste em dois componentes: a lâmina basal, uma camada de matriz extracelular sintetizada pelos queratinócitos da camada basal, é o resultado da associação de molécula de laminina, colágeno IV, entactina e perlecan; a lâmina reticular formada por fibras de colágeno VII, também chamadas de fibras reticulares, as fibras reticulares são sintetizadas pelos fibroblastos da derme e fazem a adesão da lâmina basal ao tecido conjuntivo subjacente (Kierszenbaum, 2004).

A derme é o tecido conjuntivo onde se apóia a epiderme e une a pele à hipoderme. O principal constituinte deste tecido é a matriz extracelular, a qual é de importância fundamental para o desempenho de suas funções. A derme apresenta espessura variável, podendo atingir um máximo de 3 mm na região plantar. É formada por duas camadas: a camada papilar, delgada e constituída por tecido conjuntivo frouxo. É o local de formação das papilas dérmicas, as quais acompanham as reentrâncias correspondentes da epiderme sendo de localização mais superficial. Esta camada apresenta fibrilas especiais de colágeno VII que se inserem por um lado na membrana basal e pelo outro penetram profundamente na derme, contribuindo para prender a derme à epiderme; Já a camada reticular é mais espessa, constituída por tecido conjuntivo denso e é de localização mais profunda. Ambas as camadas contêm fibras do sistema elástico, além dos vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e estruturas derivadas da epiderme, como folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas. Os fibroblastos são as células mais numerosas da derme, sintetizam as proteínas colágeno e elastina, além do glicosaminoglicano, proteoglicano e glicoproteínas multiadesivas que farão parte da matriz extracelular (Junqueira e Carneiro, 2004).

2.1.1 Matriz extracelular

As matrizes extracelulares são compostas por proteínas fibrosas (exemplo: colágeno e elastina), glicoproteínas multiadesivas (exemplo: laminina e fibronectina, cuja função principal é realizar a adesão entre a matriz e as células) e macromoléculas (exemplo: glicosaminoglicanos e proteoglicanos). A matriz extracelular é uma estrutura dinâmica que interage com as células, conseqüentemente, modula eventos de adesão, migração, proliferação e diferenciação celular. Além de ser um importante local de reserva para hormônios que controlam o crescimento (Kleinman, Hoffman, 2003; Daley et al., 2008; Jarvelainen et al., 2009). Dois tipos de matriz extracelular são encontrados na formação dos tecidos: a matriz extracelular intersticial nos tecidos conjuntivos e as lâminas basal e externa nos tecidos não conjuntivos (epitelial, muscular e nervoso) (Junqueira e Carneiro, 2004).

2.1.1.1 Fibras colágeno

As proteínas mais abundantes da matriz extracelular pertencem à família dos colágenos (Gelse et al., 2003; Callaghan, Wilhelm, 2008). Já foram descritos na literatura, quase 30 tipos diferentes de moléculas de colágeno ou simplesmente colágenos (Myllyharju, Kivirikko, 2004; Jarvelainen et al., 2009). O colágeno é responsável por conferir vigor e suporte para a pele humana. Na pele jovem, o colágeno tipo I consiste em 80% e o colágeno tipo III consiste em 15% do total de colágeno (Baumann, 2007). Na pele também são encontrados colágenos do tipo V e VII (Callaghan, Wilhelm, 2008).

A molécula de colágeno é formada por três longas cadeias polipeptídicas, cada uma contendo o aminoácido apolar glicina a cada três resíduos. Essa estrutura regular permite que as cadeias se enrolem formando uma longa hélice tripla. As células que sintetizam a molécula de colágeno na pele são os fibroblastos. A forma precursora da molécula de colágeno é denominada pró-colágeno, a qual contém peptídeos adicionais em cada extremidade que impedem a reunião em fibrilas de colágeno. Uma enzima extracelular, a colagenase, cliva esses domínios terminais permitindo a união somente após as moléculas terem saído para o espaço extracelular, evitando

que a célula se torne obstruída com seus próprios produtos (Allberts et al., 2006).

2.1.1.2 Sistema elástico

A pele é composta pelos três tipos de fibras do sistema elástico: oxitalânica, elaunínica e elástica, as quais são responsáveis por fornecer resistência e elasticidade a este tecido (Prost-Squarcioni et al., 2008).

Semelhante ao colágeno, as células que sintetizam as fibras do sistema elástico da pele são os fibroblastos. A proelastina, o precursor da elastina, é secretado como tropoelastina. Na matriz extracelular, a tropoelastina interage com a glicoproteína fibrilina para organizar as fibras elásticas imaturas, que se agregam e formam as fibras elásticas maduras. Os aminoácidos desmosina e isodesmosina são característicos da elastina e são responsáveis pela ligação cruzada nas fibras elásticas maduras, permitindo seu estiramento e o encurtamento semelhante a um elástico (Kierszenbaum, 2004).

2.1.1.3 Proteoglicanos

Os proteoglicanos são proteínas extracelulares ligadas a uma classe de polissacarídeos carregados negativamente (glicosaminoglicanos). Possuem uma estrutura tridimensional semelhante a uma escova de limpar tubos e são extremamente diversos em tamanho, forma e composição química (Allberts et al., 2006).

Estas moléculas da matriz extracelular exercem funções importantes na fisiologia da pele (Carrino et al., 2003). Evidência obtida através de estudos realizados durante os últimos anos no campo da bioquímica sugerem que os proteoglicanos não são somente componentes estruturais da matriz extracelular, mas também participam da regulação de muitos eventos celulares, incluindo proliferação e diferenciação celular, além de interações de célula-célula e célula-matriz extracelular (Bernfield et al., 1999; Vynios et al., 2002).

Na pele os proteoglicanos encontrados, incluem o versicam, o decorim e o biglycam. O versicam é detectado na camada basal da epiderme e na derme em associação com fibras elástica da pele de adultos. O decorim é observado em associação com fibras da derme. Já o biglycam, está localizado na epiderme e também no endotélio vascular (Carrino et al., 2000).

2.1.1.4 Glicosaminoglicanos (GAGs)

Os glicosaminoglicanos são polissacarídeos lineares, compostos de unidades repetitivas de dissacarídeos. Cada dissacarídeo consiste de uma hexosamina (galactosamina ou glicosamina) e um ácido urônico (ácido glicurônico ou ácido idurônico). De acordo com a estrutura química, os glicosaminoglicanos são divididos em: ácido hialurônico (HA), condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS), heparam sulfato (HS), heparina e queratam sulfato (KS) (Vynios et al., 2002). Segundo Baumann (2007), o ácido hialurônico, o dermatam sulfato (ambos são os GAGs mais predominantes) e o condroitim sulfato contribuem para a preservação de uma pele suave e hidratada.

2.1.1.5 Ácido hialurônico

Histórico

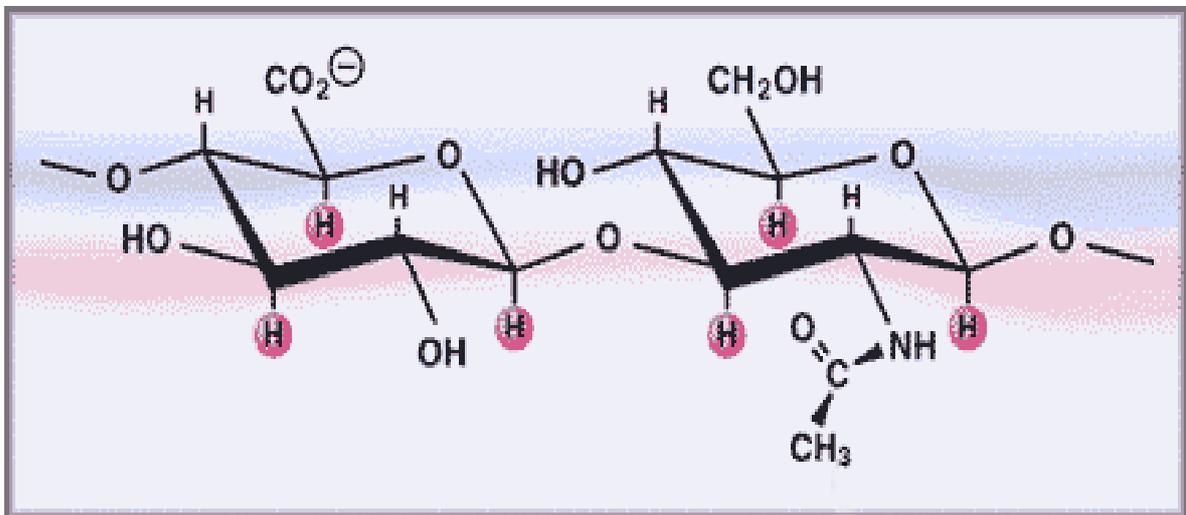
Em 1934, Karl Meyer e seu assistente de laboratório John Palmer anunciaram a descoberta de um novo polissacarídeo de alto peso molecular, isolado do humor vítreo de boi. Este polissacarídeo continha ácido urônico e hexosamina. Eles propuseram por conveniência que este polissacarídeo fosse denominado ácido hialurônico (McDonald, Hascall, 2001; Necas et al., 2008).

A estrutura química do ácido hialurônico somente foi determinada em 1950 por Karl Mayer e seus associados (Laurent, Fraser, 1992; Necas et al., 2008) e em 1986, o termo “hyaluronan” foi introduzido para ficar em conformidade com a nomenclatura internacional dos polissacarídeos (Necas et al., 2008).

Principais características

O ácido hialurônico é um polímero linear de alto peso molecular, carregado negativamente e formado por unidades dissacarídicas repetitivas de ácido D-glucurônico e N-acetil-D-glucosamina, com ligações β (1-3) e β (1-4) respectivamente (figura - 1) (Laurent et al., 1995; Frost et al., 1997; Itano et al., 1999; Tammi et al., 2002; Kakehi et al., 2003).

Figura 1 - Estrutura química do dissacarídeo que compõe a molécula de ácido hialurônico. À esquerda, representação da molécula de ácido D-glucurônico β (1-3) e à direita, representação da molécula de N-acetil-D-glucosamina β (1-4) (Laurent, 2000)



Este glicosaminoglicano é encontrado na matriz extracelular, na superfície das células (Evanko, Wight, 1999; Huang et al., 2000), no citoplasma e núcleo de algumas células (Evanko, Wight, 1999; Evanko, Wight, 2001). Na pele humana, grandes concentrações de ácido hialurônico estão presentes na derme, entretanto, podem estar presentes também na epiderme em concentrações elevadas (Tammi et al., 1989; Tammi et al., 2005).

Segundo Kakehi et al., (2003), além da pele, o ácido hialurônico é encontrado em grandes concentrações em outros tecidos como articulações e córnea. Distingui-se dos demais glicosaminoglicanos pela ausência de grupamentos sulfato e por não estar covalentemente ligado a proteínas para formar proteoglicanos. (Lee et al., 2000; Day, Sheehan, 20001). Em condições fisiológicas normais, o ácido hialurônico consiste de 2.000 – 25.000

dissacarídeos e os polissacarídeos formados possuem massa molecular relativa de $10^6 - 10^7$ com comprimento de aproximadamente 2 – 25 μm (Toole, 2004). Porém podem também existir como pequenos fragmentos ou oligossacarídeos em certas condições fisiológicas e patofisiológicas (Straach et al., 2005).

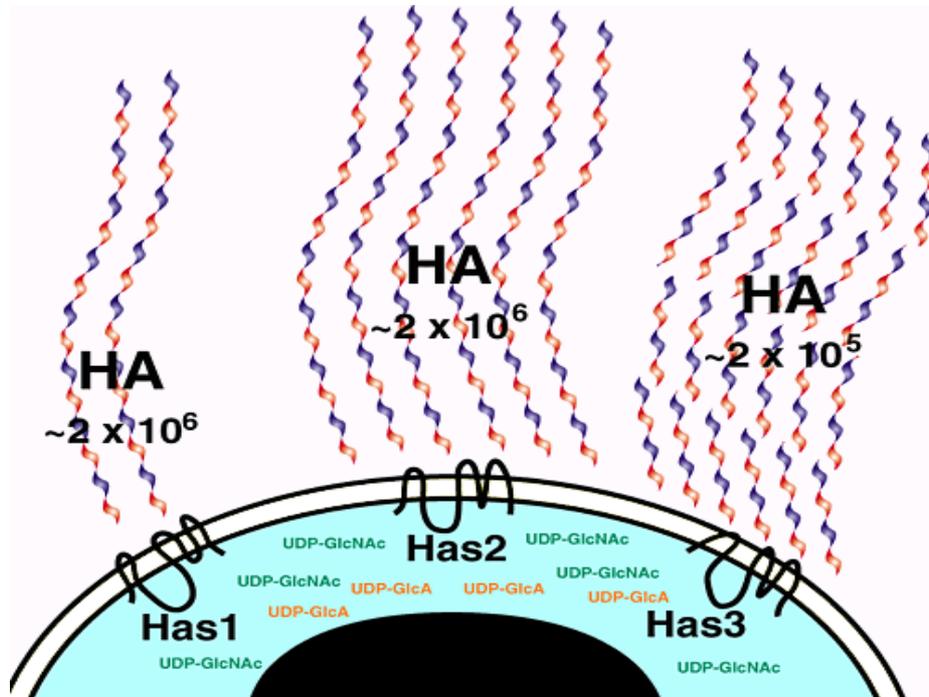
O ácido hialurônico é sintetizado por uma família de glicosiltransferases associadas à membrana plasmática (Camenisch, McDonald, 2000), ao contrário dos outros glicosaminoglicanos onde a estrutura protéica é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso e o componente açúcar adicionado no complexo de Golgi para, posteriormente, serem secretados por vias semelhantes a das glicoproteínas (Toole, 2004).

Foram descritos três genes que codificam as enzimas responsáveis pela biossíntese destes polímeros, sendo denominadas HAS1, HAS2 e HAS3 (ácido hialurônico sintases 1, 2 e 3) (Spicer, McDonald, 1997; Taylor, Gallo, 2006). Dados sugerem que HAS1 e HAS2 sintetizam o ácido hialurônico de alto peso molecular e HAS3 produz cadeias menores deste composto (Itano et al., 1999; Camenisch, McDonald, 2000). Os genes destas três enzimas estão localizados em diferentes cromossomos, sendo HAS1 localizada no cromossomo 19q13.3-q13.4; HAS2 no cromossomo 8q24.12 e HAS3 no cromossomo 16q22.1 (Spicer et al., 1997).

As ácido hialurônico sintases são expressas diferencialmente umas das outras em diversos tipos de células, sendo que um mesmo fator pode estimular determinado tipo celular e inibir outro no que diz respeito à produção de ácido hialurônico (Jacobson et al., 2000; Sayo et al., 2002).

Quando comparadas às taxas de sínteses de ácido hialurônico entre as enzimas HAS1, HAS2 e HAS3 observa-se que HAS3 é mais ativa do que HAS2, a qual é por sua vez mais ativa do que HAS1 (figura - 2) (Spicer, McDonald, 1998).

Figura 2 - Esquema representativo dos tamanhos das cadeias de ácido hialurônico sintetizados pelas ácido hialurônico sintases (Spicer, McDonald, 1998)



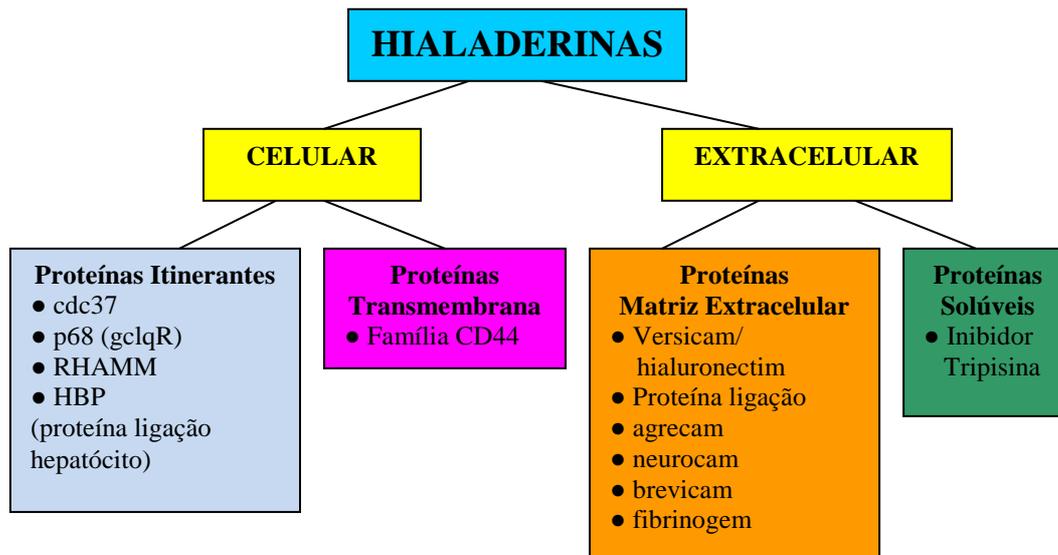
Conforme vai sendo sintetizado, o ácido hialurônico, é translocado através da membrana plasmática para a superfície celular ou para a matriz extracelular (Laurent, Fraser, 1992; Weigel et al., 1997; Spicer, McDonald, 1998; Tammi et al., 2002).

Segundo Laurent e Fraser (1992), cerca de 10 a 100 mg de ácido hialurônico entra na circulação de um humano adulto todos os dias. A degradação é feita por sua clivagem por meio de enzimas denominadas hialuronidases, as quais diminuem o tamanho do polímero de forma gradativa levando a formação de oligossacarídeos (Stern, 2004). Os humanos possuem seis genes que codificam as enzimas hialuronidases com diferentes propriedades e localização celular (Csoka, 2001). O processo de degradação do ácido hialurônico também pode ser controlado por meio de inibidores das hialuronidases, porém a maior parte destes inibidores não foram ainda identificados (Stern, 2004).

Foi proposta por Toole (1990) a denominação genérica de hialaderinas, para as proteínas com a capacidade de se ligarem ao ácido

hialurônico. Estas proteínas podem ser encontradas na matriz extracelular, na superfície celular ou intracelularmente (figura - 3) (Turley, Harrison, 1999; Toole, 2001).

Figura 3 - Representação da distribuição e localização das principais hialaderinas (Turley, Harrison, 1999)



O CD44 (*Cluster of differentiation 44*) é a molécula que melhor caracteriza a ativação de sinalização intracelular em resposta ao ácido hialurônico (Camenisch, McDonald, 2000; Lesley et al., 2000). Este receptor celular de ácido hialurônico está envolvido em seu catabolismo bem como na interação do ácido hialurônico com respostas imune, processos fisiológicos, invasão tumoral e metástase (Oliferenko et al., 2000; Fitzgerald et al., 2000; Harada, Takahashi, 2007). Outras proteínas intracelulares recentemente identificadas são RHAMM, P32, CDC37 e IHABP4 (Huang et al., 2000; Hascall et al., 2004).

A interação do ácido hialurônico com proteínas de ligação e com receptores na superfície celular, influencia o comportamento das células, tais como processos de adesão célula-célula, migração e diferenciação celular (Knudson, Knudson, 1993).

O ácido hialurônico exerce diversas funções nos tecidos. Entre as funções do ácido hialurônico estão: expansão do espaço extracelular, ligando sais e água; devido a sua viscosidade possui propriedades ideais para lubrificação de articulações; interação com moléculas extracelulares para formar compostos da matriz extracelular; ativação de vias de sinalização intracelulares por meio de receptores de superfície celular que o reconhecem; retenção de água; homeostase e integridade biomecânica dos tecidos (Laurent, Fraser, 1992; Laurent et al., 1995; Laurent et al., 1996). Sabe-se também que a síntese de ácido hialurônico aumenta durante o processo mitótico (Evanko, Wight, 1999; Hascall et al., 2004).

Estudos demonstram que o tamanho das cadeias do polissacarídeo pode determinar a sua função biológica (Camenisch, McDonald, 2000). Cadeias de ácido hialurônico maiores do que 10^6 Da estão envolvidas na manutenção da estrutura e na viscosidade do tecido (Laurent et al., 1996), assim como no favorecimento da migração de células tumorais e metástase (Itano et al., 1999), e na adesão célula-matriz extracelular (Zimmerman et al., 2002). As cadeias menores estão envolvidas com processos de angiogênese (Lees et al., 1995) e inflamação (Camenisch, McDonald, 2000; Taylor, Gallo, 2006).

2.1.1.6 Glicosamina sulfato

A glicosamina sulfato é um amino açúcar presente em quase todos os tecidos humanos. Este substrato é essencial na formação do ácido hialurônico e dos glicosaminoglicanos sulfatados que subseqüentemente são ligados covalentemente a um eixo protéico, formando a molécula de proteoglicano (Bissett, 2006). A glicosamina e o seu derivado N-acetilglucosamina são prontamente sintetizados pelo organismo a partir da glicose (Anderson et al., 2005). A administração da glicosamina sulfato em humanos geralmente é realizada por via oral e sua absorção no aparelho digestório é de 90% da dose administrada (Setnikar, Rovati, 2001; Anderson et al., 2005). O seu metabolismo é altamente regulado em vários tecidos, sendo intermediado sobre padrões enzimáticos (Uldry et al., 2002; Anderson et al., 2005). Estudos

indicam que o uso de glicosamina sulfato em ratos é similar àqueles relatados em humanos (Aghazadeh-Habashi et al., 2002).

Pesquisas recentes descrevem a glicosamina e o condroitim sulfato como sendo agentes que interferem na progressão da osteoartrite (Hungerford, Jones, 2003; Kobayashi et al., 2005; Bruyere, Reginster 2007). A osteoartrite é caracterizada como uma degeneração da cartilagem articular e está relacionada com a progressão da idade (Lippiello et al., 2000; Kobayashi et al., 2005). A utilização da glicosamina e do condroitim sulfato como agentes modificadores da osteoartrite, está no fato destes componentes serem essenciais para a síntese de glicosaminoglicanos e na montagem dos proteoglicanos (Lippiello et al., 2000; Morelli et al., 2003). Baseado nestas evidências, a glicosamina tem sido utilizada para acelerar a cicatrização de feridas, aumentar a hidratação da pele e na diminuição de rugas (Bissett, 2006).

2.1.1.7 Condroitim sulfato

A molécula de condroitim sulfato é um polímero de cadeia longa formada por unidades dissacarídicas repetitivas contendo galactosamina sulfato e ácido glucurônico (Lippiello et al., 2000; Blitterswijk et al., 2003). O condroitim sulfato é um glicosaminoglicano que faz parte da composição da estrutura do proteoglicano Versican presente na pele (Carrino et al., 2000; Carrino et al., 2003). Este proteoglicano é detectado na camada basal da epiderme e na derme associado com fibras elásticas. É um dos mais abundantes proteoglicanos encontrado na pele humana de adultos. Estudos demonstram que em função da idade, ocorre uma grande diminuição da quantidade deste proteoglicano na pele (Carrino et al., 2000).

A absorção no aparelho digestório pela administração oral é acima de 70% (Lippiello et al., 2000). Na pele humana ocorre uma diminuição da quantidade deste proteoglicano em razão da progressão da idade, contribuindo para mudanças nas propriedades físicas da pele (Carrino et al., 2000). Assim como a glicosamina sulfato, o condroitim sulfato também tem sido utilizado no

tratamento da osteoartrite (Towheed, Anastassiades, 2000), e ambos diminuem os sinais e sintomas da doença (Vangsness Jr. et al., 2009).

2.2 Influência da ooforectomia no hormônio estrógeno

A ooforectomia em ratas é um procedimento muito utilizado como modelo de estudos associados às mulheres na menopausa (Ozyazgan et al., 2002). A deficiência de hormônio ovariano influencia substancialmente as características mecânicas da pele (Circosta et al., 2006; Verdier-Sévrain, 2007), ocorrendo mudanças nas propriedades funcionais da matriz extracelular (Kafantari et al., 2000; Ozyazgan et al., 2002).

O estado de hipoenstrogenismo na menopausa causa mudanças na quantidade de colágeno, perda da elasticidade, alterações na concentração de glicosaminoglicanos e diminuição da quantidade de água da matriz extracelular (Raine-Finney et al., 2003; Brincat et al., 2005; Verdier-Sévrain et al., 2006).

Os efeitos do estrógeno são mediados por receptores intracelulares específicos, os quais pertencem a super família de hormônios estereóides e tireóideos (Haapasaari et al., 1997; Oikarinen, 2000). Receptores do hormônio estrógeno, assim como receptores de outros hormônios tem sido isolados e caracterizados na pele humana (Schmidt et al., 1990; Oikarinen, 2000).

Vários estudos demonstram que a presença do estrógeno aumenta significativamente a quantidade de ácido hialurônico da pele (Uzuka et al., 1981; Thornton, 2002; Gendimenico et al., 2002; Kanda, Watanabe, 2005).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi submetido à avaliação e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM) em 2007, CEP 1188/07.

3.1 - Animais

Foram utilizadas trinta ratas submetidas ao processo cirúrgico de ooforectomia bilateral e vinte ratas não submetidas ao processo cirúrgico de ooforectomia bilateral (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, com dois meses de idade, fornecidas pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais em Medicina e Biologia (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM). Os animais foram divididos em dois grupos, sendo:

➤ Grupo I – animais ooforectomizados (experimental)

- **E45G:** ratas (n = 5) ooforectomizadas e mantidas por 45 dias com administração oral de glicosamina sulfato (dinaflex® 1,5g).
- **E60G:** ratas (n = 5) ooforectomizadas e mantidas por 60 dias com administração oral de glicosamina sulfato (dinaflex® 1,5g).
- **E45C:** ratas (n = 5) ooforectomizadas e mantidas por 45 dias com administração oral de glicosamina sulfato associada ao condroitim sulfato (condroflex® 1,5g + 1,2g).
- **E60C:** ratas (n = 5) ooforectomizadas e mantidas por 60 dias com administração oral de glicosamina sulfato associada ao condroitim sulfato (condroflex® 1,5g + 1,2g).
- **E45A:** ratas (n = 5) ooforectomizadas e mantidas por 45 dias com administração oral de água potável.
- **E60A:** ratas (n = 5) ooforectomizadas e mantidas por 60 dias com administração oral de água potável.

➤ **Grupo II – animais não ooforectomizados (controle)**

- **C45A:** ratas ciclantes em estro (n = 5) foram mantidas por 45 dias com administração oral de água potável.
- **C60A:** ratas ciclantes em estro (n = 5) foram mantidas por 60 dias com administração oral de água potável.
- **C60G:** ratas ciclantes em estro (n = 5) foram mantidas por 60 dias com administração oral de glicosamina sulfato (dinaflex® 1,5g).
- **C60C:** ratas ciclantes em estro (n = 5) foram mantidas por 60 dias com administração oral de glicosamina sulfato associada ao condroitim sulfato (condroflex® 1,5g + 1,2g).

Os animais foram alimentados com uma dieta comercial normal (ração Purina) e água “ad libitum”. A iluminação artificial foi controlada para obtenção de ciclos claro e escuro de doze horas cada e a temperatura média mantida à 24°C.

3.2 – Métodos

3.2.1 - Procedimento cirúrgico de ooforectomia bilateral

Os animais foram anestesiados via intraperitoneal com xilazina (1mg/100g de peso animal) (relaxante muscular - anasedan®) e ketamina (5mg/100g de peso animal) (anestésico - dopalen®). Em seguida foram posicionados em decúbito ventral e após tricotomia foi feita uma incisão de aproximadamente 3,5cm de comprimento ao longo da coluna vertebral, centrada na altura do rebordo costal caudal. Com a ponta de uma tesoura fina fechada foram perfurados as camadas musculares e o peritônio nos dois lados da coluna vertebral.

Com o auxílio de uma pinça, direcionada para a região medial e cranial do animal, foram exteriorizados os ovários, a ponta do corno uterino e a gordura adjacente para em seguida seccionar os ovários e os vasos adjacentes (figura 4).

Os demais tecidos foram cuidadosamente reintroduzidos na cavidade peritoneal após a certificação de estancamento do sangramento. Foram realizados pontos cirúrgicos com fio de seda preta 3,0 (Ethicon - Johnson & Johnson) e a pele limpa com álcool iodado.

Figura 4 - Foto representativa do processo cirúrgico de ooforectomia bilateral, onde após tricotomia e incisão de aproximadamente 3,5cm ao longo da coluna vertebral à altura do rebordo costal caudal fez-se o seccionamento dos ovários, vasos e gordura adjacentes



3.2.2 - Procedimento para exame colpocitológico

Após uma semana do procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos a exames vaginais colpocitológicos durante quatro semanas consecutivas. Foi coletado material suficiente para a realização do esfregaço em lâminas histológicas, onde foi permitido observar células epiteliais da vagina, que indicaram o período do ciclo estral o qual a rata se encontrava. O

material coletado em lâminas histológicas foi fixado em uma solução de álcool - éter (1:1), corado pelo método de Harris-Shorr (Shorr, 1941) e analisado ao microscópio de luz. Os animais que se apresentaram após quatro semanas consecutivas do procedimento cirúrgico de ooforectomia bilateral em período de próestro (produzindo hormônios – figura 5) foram descartados e somente animais que se apresentaram em período de diestro (não produzindo hormônios – figura 6) foram utilizados para a administração dos medicamentos.

Figura 5 - Exame colpocitológico de esfregaço vaginal de rata em próestro (produzindo hormônios). Observar que são vistas em grande quantidade células epiteliais em descamação (células eosinófilas) e raros leucócitos (células basófilas). Coloração por Harris-Shorr

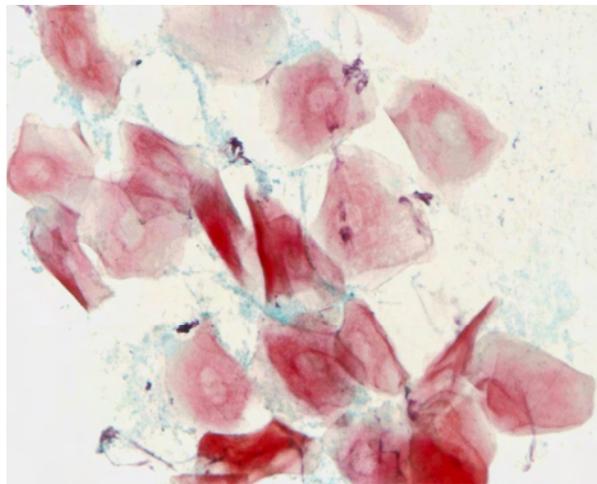


Figura 6 - Exame colpocitológico de esfregaço vaginal de rata em diestro (não produzindo hormônios). Observar que não são visualizadas células epiteliais em descamação, mas somente leucócitos (células basófilas). Coloração por Harris-Shorr



3.2.3 - Tratamento com a glicosamina sulfato ou glicosamina associada ao condroitim sulfato

A administração da glicosamina sulfato (dinaflex® - figura 7 e anexo 1) e da glicosamina sulfato associada ao condroitim sulfato (condroflex® - figura 8 e anexo 2) foi iniciada logo após o encerramento do procedimento dos exames colpocitológicos. Os medicamentos empregados foram dissolvidos em 250 µl de água potável administrando-se diariamente 0,0214mg por grama de peso do animal, nos períodos de 45 e 60 dias.

Figura 7 - Foto representativa do medicamento dinaflex® da empresa Zodiac, contendo 1,5g de pó para solução oral de glicosamina sulfato



Figura 8 - Foto representativa do medicamento condroflex® da empresa Zodiac, contendo 1,5g de pó para solução oral de glicosamina sulfato e 1,2g de condroitim sulfato



A padronização da dose de glicosamina sulfato e de glicosamina sulfato associada ao condroitim sulfato foi embasada em cálculos da dose em relação ao peso do animal, comparados com a dose diária administrada de 1,5g ao dia em humanos com peso corpóreo de 70kg. A gavagem foi à via de administração escolhida por assemelhar-se a via oral, comumente utilizada pelos usuários destes compostos (figura 9).

Figura 9 - Foto representativa da aplicação oral em rata Wistar dos medicamentos dinaflex® ou condroflex®, pelo método de gavagem utilizando-se cânula acoplada em seringa de 1,0ml



3.2.4 - Retirada das peles e sacrifício dos animais

Os animais foram anestesiados, colocados na posição decúbito dorsal e submetidos a tricotomia de aproximadamente 9cm² na região do abdome. Em seguida foram retirados dois fragmentos de pele com aproximadamente 1cm² cada. Um fragmento foi utilizado para procedimentos histológicos e detecção histoquímica do ácido hialurônico e o outro utilizado na extração e quantificação bioquímica do ácido hialurônico.

Os animais foram sacrificados logo após a retirada dos fragmentos por overdose do anestésico ketamina.

3.2.5 - Processamento do material para procedimentos histológicos e detecção histoquímica do ácido hialurônico

3.2.5.1 - Fixação

Os fragmentos utilizados para procedimentos histológicos e detecção histoquímica do ácido hialurônico foram fixados em formol 10%, diluído em tampão fosfato de sódio (PBS – 0,1M, pH 7,4) por 24 horas, à temperatura ambiente.

3.2.5.2 - Inclusão e microtomia

Após a fixação, as peças foram lavadas em água destilada e passadas pelo processo de desidratação em gradiente crescente de etanol (70%, 80%, 95% e 100%). O tempo de permanência em cada concentração de etanol foi de uma hora. Em seguida, foram submetidas à diafanização em três trocas de xilol. O tempo de permanência em cada banho de xilol foi de trinta minutos. Após estes processos, foram embebidas e incluídas em parafina a 65°C formando blocos. Estes, já contendo as peças foram submetidos a cortes seriados de 7µm utilizando-se um micrótomo manual LEICA - RM 2145. Os cortes histológicos foram montados em lâminas contendo uma fina camada de albumina. Os cortes para detecção histoquímica do ácido hialurônico foram montados em lâminas silanizadas.

3.2.6 - Procedimentos histológicos

3.2.6.1 - Métodos de coloração

Hematoxilina-Eosina

Os cortes histológicos foram desparafinados em xilol, hidratados em gradiente decrescente de etanol (100%, 95% e 70%), corados durante dois minutos na Hematoxilina de Harris, lavados durante três minutos em água destilada e contracorados com Eosina aquosa durante quatro minutos. Depois de coradas as lâminas foram lavadas em água destilada, desidratadas em gradiente crescente de etanol (70%, 95% e 100%) e montadas com entellan. Então, foram analisadas sob microscopia de luz e fotografadas em fotomicroscópio Nikon Eclipse E800®.

3.2.6.2 – Análise morfométrica

Após coloração, os cortes foram submetidos ao processo de captação de imagem e avaliação morfométrica através do sistema digital de processamento e análise composto por um microscópio Nikon Eclipse E800®, acoplado a uma câmera de vídeo digital Nikon DXM1200F® e comandados

pelo programa Nikon (ACT-1 versão 2.62 2000®) instalado em um microcomputador no Laboratório de Biologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). As medidas histomorfométricas foram realizadas no programa de análise de imagem Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics), no mesmo laboratório. A epiderme e a derme foram medidas em 10 diferentes locais em cada amostra. Em seguida, para cada corte foi calculada uma média das espessuras da epiderme e da derme, utilizada então para obtenção da média de cada grupo.

3.2.7 – Detecção histoquímica do ácido hialurônico

A detecção histoquímica do ácido hialurônico foi realizada utilizando-se sonda para ácido hialurônico biotilada, desenvolvida pela Disciplina de Biologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP-EPM, a partir da proteína de ligação da região de ligação do agregam ao ácido hialurônico, extraída da cartilagem nasal de boi e acoplada a biotina (EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin, Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA).

Os cortes após terem sido montados em lâminas silanizadas foram desparafinados em xilol, hidratados em gradiente decrescente de etanol (100%, 95% e 70%), lavados em água destilada e em seguida receberam dois banhos de solução tampão PBS (0,05M, pH 7,4) de 5 minutos cada.

Posteriormente os cortes foram tratados com peróxido de hidrogênio 0,3% em solução PBS, durante 30 minutos em temperatura ambiente para bloqueio da atividade da peroxidase endógena. Foram então novamente lavados três vezes em solução tampão PBS durante 10 minutos cada e em seguida, foi feito o bloqueio dos sítios inespecíficos em PBS BSA 1% por 10 minutos. Logo após, foi realizada a aplicação da sonda biotilada para ácido hialurônico diluída em PBS + BSA 1% na proporção de 1:150 por 1 hora a 4°C.

Decorrido este tempo, os cortes foram lavados três vezes em solução tampão PBS durante 10 minutos cada e então foi feita a incubação com estreptoavidina-peroxidase em PBS-BSA 1% durante uma hora em

temperatura ambiente e câmara úmida (NOVOCastra Novostain Super ABC Reagente Kit). Após este processo, cada corte foi lavado duas vezes com Tris HCl (0,1M, pH 7,4), durante 5 minutos cada. Por fim, a revelação foi feita com 3,3'-diaminobenzidina (NOVOCastra Liquid DAB Substrate Kit NCL-L-DAB), por no máximo cinco minutos. As lâminas foram então lavadas em água destilada, contracoradas pelo corante Verde de Metila por trinta minutos e montadas em meio sintético. Para o controle foram utilizados cortes incubados por 12 horas com 100U/ml de hialuronidase bovina (Sigma) à 37°C (Suzuki et al., 2005).

3.2.8 – Extração e quantificação do ácido hialurônico

3.2.8.1 – Proteólise do tecido

As amostras de pele retirada dos animais foram pesadas separadamente obtendo-se o peso molhado. Posteriormente, as amostras devidamente identificadas foram cortadas em pequenos fragmentos e, em seguida, mergulhadas em acetona para remoção de lipídios por um período de 24 horas. A seguir, as amostras foram secas na estufa a 60°C durante 30 minutos para obtenção do pó cetônico. Depois de pesado, adicionou-se 2ml por 0,1g de pó cetônico de solução enzimática (1ml de alcalase + 40ml de tampão Tris acetato 0,05M pH 8,0) por 24 horas, a 60°C. Decorrido este período, foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) a 90%, até a concentração final de 10% e mantido por 20 minutos em banho de gelo. As amostras foram então centrifugadas, os precipitados descartados e aos sobrenadantes foram adicionados dois volumes de metanol em banho de gelo. Após este procedimento, as amostras permaneceram por 24 horas a -20°C, ocorrendo nessas condições a precipitação dos glicosaminoglicanos. Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante contendo apenas metanol foi descartado. As amostras foram secas a 37°C e o precipitado contendo os glicosaminoglicanos foi ressuspense em água destilada baseando-se na quantidade de pó cetônico inicial. Assim, para cada amostra foi acrescentado ao precipitado final dos glicosaminoglicanos extraídos 4µl de água destilada por mg de pó cetônico e finalmente fervidas para inativar as proteases.

3.2.8.2 – Quantificação do ácido hialurônico (ELISA)

Após proteólise da pele, o glicosaminoglicano ácido hialurônico foi quantificado através do método de ELISA desenvolvido por Martins et al., 2003.

À placa de ELISA com sonda absorvida foram adicionados 100µl/poço de soluções padrão de ácido hialurônico em várias concentrações (0 a 500µg/ml) diluídas no tampão de ensaio (Tris-HCl 0,05M pH 7,75 e 1% BSA - albumina bovina sérica), além das soluções das amostras contendo o ácido hialurônico em triplicatas.

Após incubação da placa por 12 horas a 4°C, a placa foi então lavada, três vezes, com tampão de lavagem (Tris-HCl 0,05M pH 7,75). Em seguida foram adicionadas 100µl da sonda (1mg/ml) 1:10000 em tampão de ensaio, sobre agitação durante 2 horas. Em seguida, a placa foi lavada nove vezes com tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,75.

A seguir, foi adicionada a placa 100µl/poço de estreptavidina marcada com európio diluído 1:10000 em tampão de ensaio. A estreptavidina tem afinidade à biotina conjugada à sonda. Após agitação por 30 minutos a placa foi lavada nove vezes com tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,75.

Com o objetivo de soltar o európio ligado a estreptavidina, adicionou-se 280µl “enhancement” por poço, agitou-se por 5 minutos e o európio livre na placa foi lido em fluorímetro.

3.2.9 – Análise estatística

Após a contagem dos dados apresentados, estes tiveram suas médias e desvios-padrão calculados. A análise estatística foi realizada através do Teste de ANOVA, seguido do Teste de Bonferroni. Todas as decisões foram baseadas no nível de significância de $p \leq 0,05$ (Fowler, Cohen, 1990).

4. RESULTADOS

O procedimento cirúrgico de ooforectomia bilateral proporcionou a análise das alterações morfológicas, morfométricas e histoquímica na pele de ratas, após 45 e 60 dias sem o efeito dos hormônios sexuais e tratadas com glicosamina sulfato (dinaflex®) ou glicosamina sulfato associada ao condroitim sulfato (condroflex®).

4.1 - Análise morfológica

Para a descrição da morfologia das amostras de pele foram analisadas as lâminas histológicas coradas com HE.

4.1.1 - Análise morfológica dos grupos (controle) não ooforectomizados e tratados com água nos períodos de 45 e 60 dias (C45A e C60A)

As amostras de pele retiradas dos grupos não ooforectomizados apresentam epitélio estratificado bem definido com poucas camadas de células e fortemente corado pela hematoxilina. Nota-se também uma discreta descamação da queratina na camada córnea. Na derme corada fortemente pela eosina, nota-se uma camada delgada de tecido conjuntivo mais frouxo que acompanha o epitélio. Esta camada corresponde à camada papilar, a qual forma as papilas dérmicas. Uma camada constituída de tecido conjuntivo denso não modelado localizado logo abaixo da camada papilar corresponde à camada reticular. Nesta última, nota-se a presença de uma grande quantidade de fibras colágenas que se dispõem em várias direções, além da presença de glândulas em cortes variados (figura 10-A). Entre os períodos de 45 e 60 dias não foi observada diferença morfológica.

4.1.2 - Análise morfológica dos grupos (experimental) ooforectomizados e tratados com água nos períodos de 45 e 60 dias (E45A e E60A)

Nestes grupos, nota-se os mesmos padrões morfológicos descritos nos grupos controle C45A e C60A (figura 10-A), no entanto, na pele das ratas ooforectomizadas há um discreto aumento dos espaçamentos entre as fibras de colágeno da camada papilar (figura 10-B). Entre os períodos de 45 e 60 dias não foi observada diferença morfológica, indicando que a parada hormonal por 45 dias foi suficiente para produzir esses efeitos na pele desprovida dos hormônios sexuais.

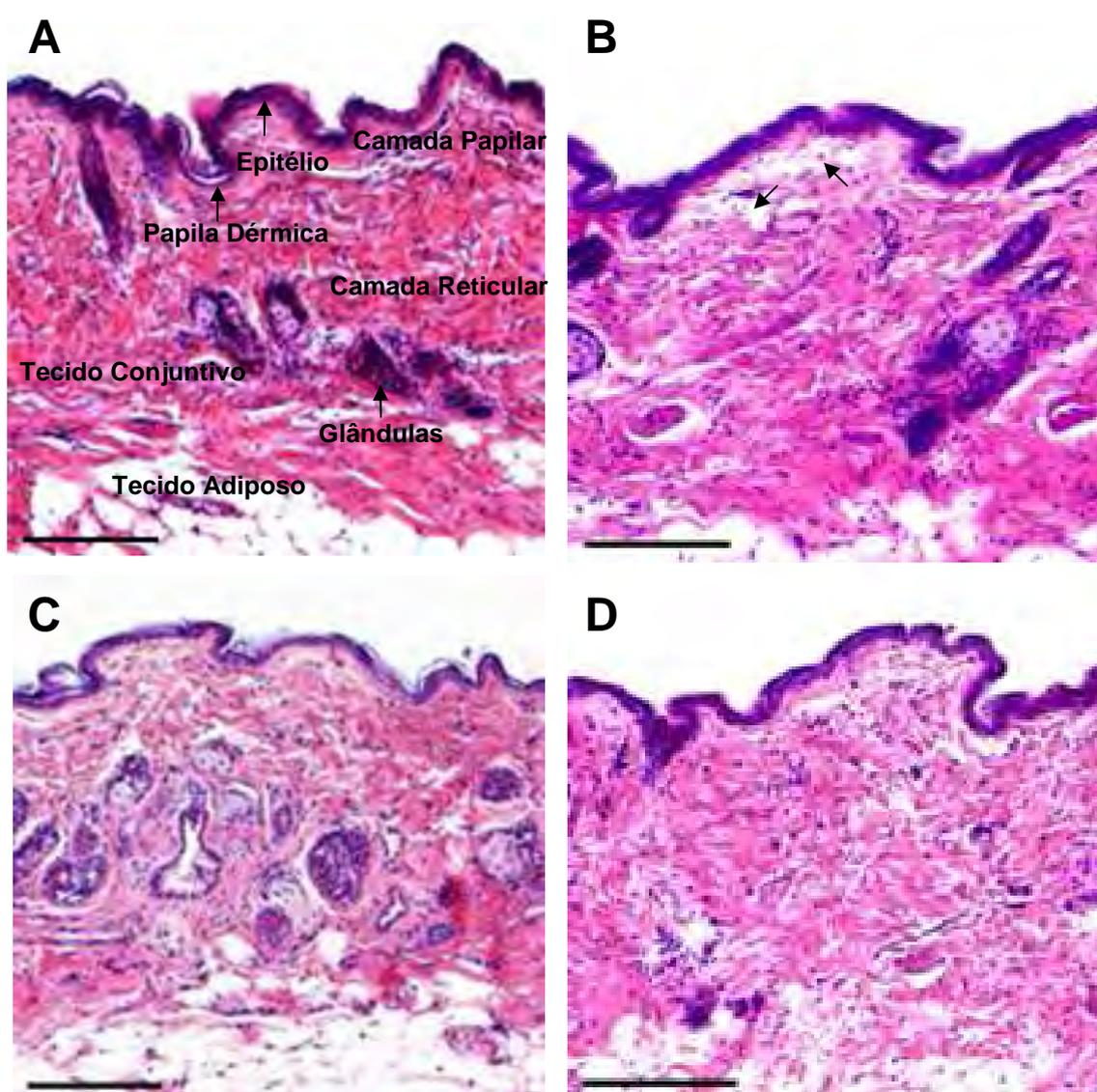
4.1.3 - Análise morfológica dos grupos (experimental) ooforectomizados e tratados com glicosamina sulfato (dinaflex®) ou glicosamina sulfato associada ao condroitim sulfato (condroflex®) nos períodos de 45 e 60 dias (E45G, E45C, E60G e E60C)

Os grupos ooforectomizados e tratados com os açúcares também seguem os mesmos padrões morfológicos descritos nos grupos controle C45A e C60A. Quando comparados ao grupo experimental tratado com água (E45A e E60A), observa-se que não ocorreram mudanças morfológicas na disposição das fibras de colágeno. Entre os períodos de 45 e 60 dias também não foi observada diferença morfológica (figura 10-C).

4.1.4 - Análise morfológica dos grupos (controle) não ooforectomizados e tratados com glicosamina sulfato (dinaflex®) ou glicosamina sulfato associada ao condroitim sulfato (condroflex®) no período de 60 dias (C60G e C60C)

Os grupos C60G e C60C (figura 10-D), também apresentam padrões morfológicos semelhantes aos grupos controle C45A e C60A.

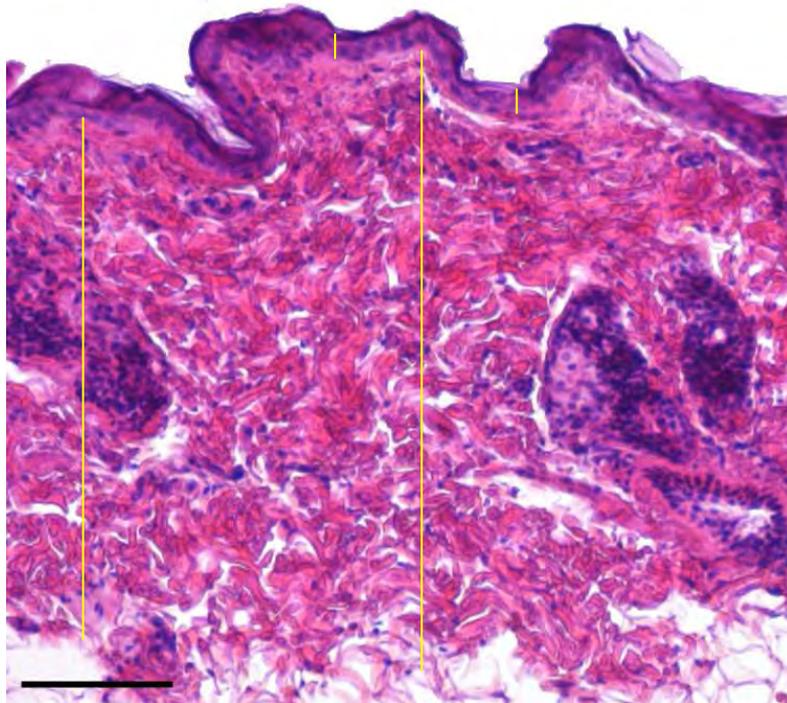
Figura 10 – Fotomicrografia de cortes histológicos da pele corada com Hematoxilina-Eosina dos grupos de animais: A - não ooforectomizados e tratados com água nos períodos de 45 e 60 dias (C45A e C60A); B - ooforectomizados e tratados com água nos períodos de 45 e 60 dias (E45A e E60A). As setas indicam os espaços existentes entre as fibras de colágeno na camada papilar; C - ooforectomizados e tratados com glicosamina sulfato (dinaflex®) ou glicosamina sulfato associada ao condroitim sulfato (condroflex®), nos períodos de 45 e 60 dias (E45G, E45C, E60G e E60C). Não foi observada mudança no padrão morfológico quando comparado aos grupos (experimental) tratados com água (E45A e E60A); D - não ooforectomizados e tratados com glicosamina sulfato (dinaflex®) ou glicosamina sulfato associada ao condroitim sulfato (condroflex®), no período de 60 dias (C60G e C60C), também indicou semelhança morfológica com a pele dos animais dos grupos (controle) C45A e C60A. Barra = 100µm



4.2 – Análise morfométrica

Para as análises morfométricas, a epiderme e a derme foram medidas em 10 diferentes locais em cada amostra para a obtenção dos valores médios (figura 11).

Figura 11 – As linhas amarelas representam os limites de cada medição. A epiderme e a derme de cada amostra foram medidas em 10 diferentes locais. A média das 10 diferentes medidas representou o valor da medida da epiderme ou derme da amostra. Barra = 100 μ m, Este valor representou a medida



A análise estatística foi realizada através do Teste de ANOVA, seguido do Teste de Bonferroni para análises múltiplas. Todas as decisões foram baseadas no nível de significância de $p \leq 0,05$.

4.2.1 - Efeito da ooforectomia bilateral nos períodos de 45 e 60 dias para os grupos tratadas com água

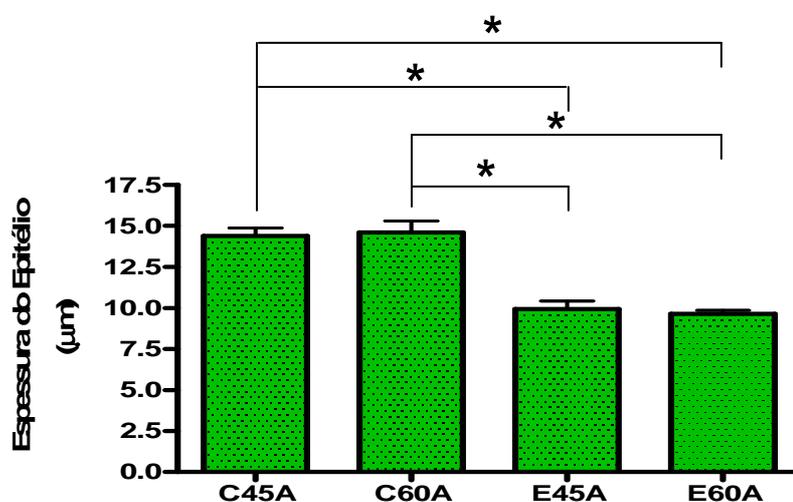
Epiderme

No presente estudo detectou-se que a espessura da epiderme nos grupos ooforectomizados (experimental) e tratados com água (E45A e E60A) foi estatisticamente inferior à espessura da epiderme dos grupos não ooforectomizados (controle) e tratados com água (C45A e C60A). A tabela 1 e a figura 12 mostram que os grupos C45A e C60A apresentam os maiores valores médios da epiderme e são estatisticamente significativos quando comparados aos valores médios dos grupos E45A e E60A.

Tabela 1 - Valores médios e desvios padrões da espessura da epiderme para o grupo de animais não ooforectomizados e tratados com água (C45A e C60A) e para o grupo de animais ooforectomizados e tratados com água (E45A e E60A)

Grupos (animais)	Espessura da Epiderme (μm)
C45A	14,381 \pm 0,483
C60A	14,600 \pm 0,693
E45A	9,944 \pm 0,470
E60A	9,633 \pm 0,221

Figura 12 - Gráfico das médias e desvios padrões da espessura da epiderme para os grupos C45A, C60A, E45A e E60A



(*p = 0,001)

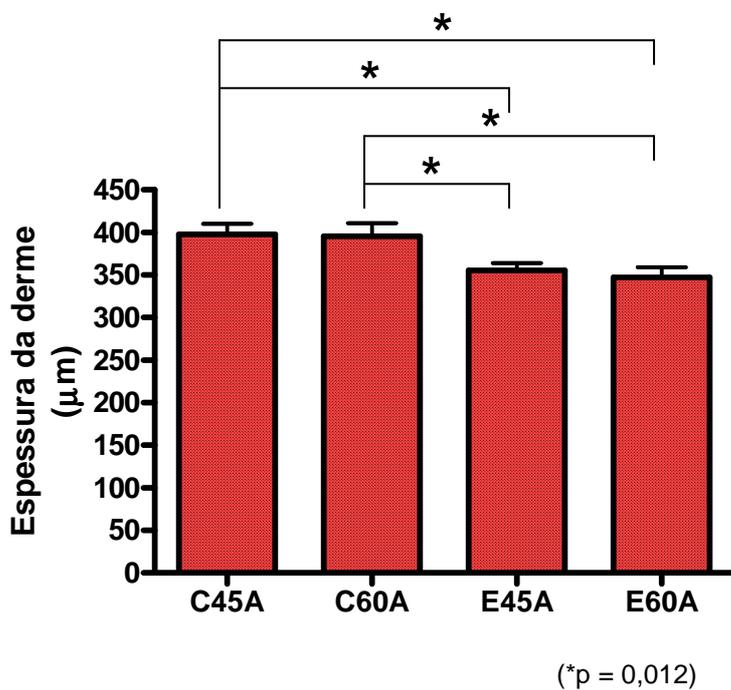
Derme

Com relação à espessura da derme, os grupos ooforectomizados (experimental) e tratados com água (E45A e E60A), também apresentaram espessura estatisticamente inferior à espessura da derme dos grupos não ooforectomizados (controle) e tratados com água (C45A e C60A). A tabela 2 e a figura 13 mostram que os grupos C45A e C60A apresentam os maiores valores médios da derme e são estatisticamente significativos quando comparados aos valores médios dos grupos E45A e E60A.

Tabela 2 - Valores médios e desvios padrões da espessura da derme para o grupo de animais não ooforectomizados e tratados com água (C45A e C60A) e para o grupo de animais ooforectomizados e tratados com água (E45A e E60A)

Grupos (animais)	Espessura da Derme (µm)
C45A	397,544 ± 12,649
C60A	395,311 ± 15,530
E45A	355,207 ± 8,736
E60A	346,911 ± 12,058

Figura 13 - Gráfico das médias e desvios padrões da espessura da derme para os grupos C45A, C60A, E45A e E60A



Os resultados analisados evidenciaram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos C45A e C60A, ao mesmo tempo em que também não houve diferenças entre os grupos E45A e E60A. Os resultados foram o mesmo para a epiderme e para a derme.

4.2.2 - Efeito da ooforectomia bilateral nos períodos de 45 e 60 dias para os grupos tratados com glicosamina sulfato (dinaflex®) ou glicosamina sulfato associada ao condroitim sulfato (condroflex®)

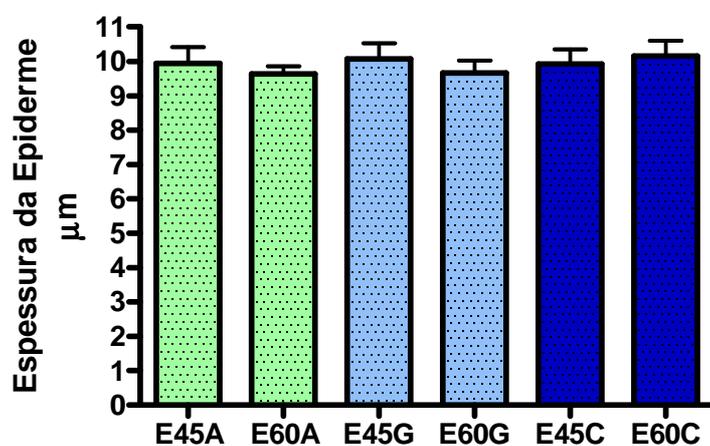
Epiderme

De forma semelhante aos grupos ooforectomizados e tratados com água (E45A e E60A), os grupos tratados com os açúcares também apresentaram espessura da epiderme inferior aos grupos não ooforectomizados e tratados com água (C45A e C60A), ou seja, não houve diferença estatisticamente significativa na espessura da epiderme quando comparamos entre si os grupos ooforectomizados e tratados conforme mostram a tabela 3 e a figura 14.

Tabela 3 - Valores médios e desvios padrões da espessura da epiderme para os grupos ooforectomizados e tratados por 45 e 60 dias

Grupos (animais)	Espessura da Epiderme (μm)
E45A	9,944 \pm 0,470
E60A	9,633 \pm 0,221
E45G	10,067 \pm 0,458
E60G	9,667 \pm 0,356
E45C	9,922 \pm 0,423
E60C	10,156 \pm 0,446

Figura 14 - Gráfico das médias e desvios padrões da espessura da epiderme para os grupos ooforectomizados e tratados por 45 e 60 dias



$p \leq 0,05$

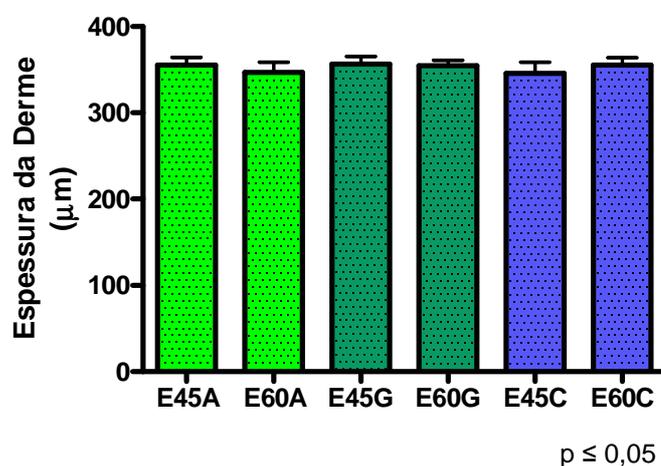
Derme

Na espessura da derme, detectou-se que os grupos tratados com glicosamina sulfato (E45G e E60G) ou glicosamina sulfato associada ao condroitim sulfato (E45C e E60C) se comportam de maneira semelhante ao descrito pela epiderme. De modo que, a espessura da derme nos grupos tratados com os açúcares (E45G, E60G, E45C e E60C) não apresentam diferenças estatisticamente significativa quando comparados aos grupos ooforectomizados e tratados com água (E45A e E60A) conforme mostram a tabela 4 e a figura 15.

Tabela 4 - Valores médios e desvios padrões da espessura da derme para os grupos tratados por 45 e 60 dias

Grupos (animais)	Espessura da Derme (μm)
E45A	355,207 \pm 8,736
E60A	346,911 \pm 12,058
E45G	356,478 \pm 8,972
E60G	354,550 \pm 10,819
E45C	345,677 \pm 12,984
E60C	355,256 \pm 8,608

Figura 15 - Gráfico das médias e desvios padrões da espessura da derme para os grupos tratados por 45 e 60 dias



4.2.3 - Efeito da glicosamina sulfato (dinaflex®) e da glicosamina sulfato associada ao condroitim sulfato (condroflex®) nos grupos não ooforectomizados no período de 60 dias

Nos grupos não ooforectomizados e tratados com glicosamina sulfato (C60G) ou com glicosamina sulfato associada ao condroitim sulfato (C60C), observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa na epiderme e na derme quando comparados aos grupos que também não foram ooforectomizados, porém tratados com água no período de 45 e 60 dias. A tabela 5 e a figura 16 mostram os valores médios da epiderme e os desvios padrões, a tabela 6 e a figura 17 mostram os valores médios da derme e os desvios padrões.

Tabela 5 - Valores médios e desvios padrões da espessura da epiderme para os grupos C45A, C60A, C60G e C60C

Grupos (animais)	Espessura da Epiderme (μm)
C45A	14,381 \pm 0,483
C60A	14,600 \pm 0,693
C60G	13,922 \pm 0,168
C60C	14,077 \pm 0,152

Figura 16 - Gráfico das médias e desvios padrões da espessura da epiderme para os grupos C45A, C60A, C60G e C60C

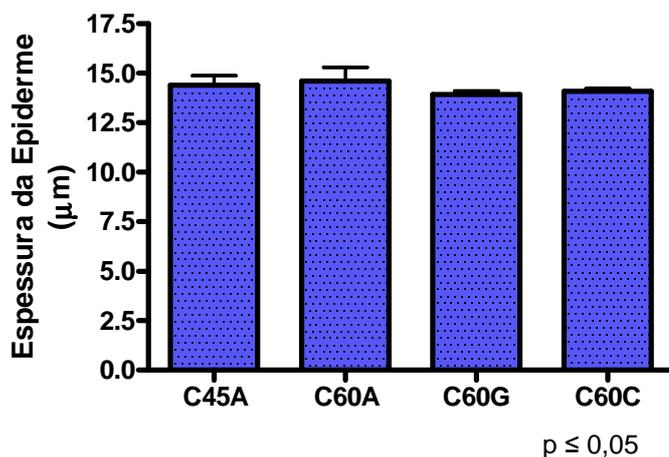
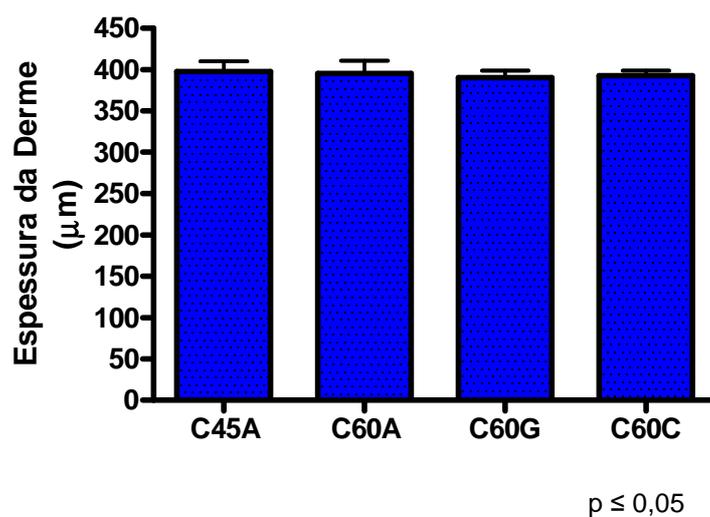


Tabela 6 - Valores médios e desvios padrões da espessura da derme para os grupos C45A, C60A, C60G e C60C

Grupos (animais)	Espessura da Derme (μm)
C45A	$397,544 \pm 12,649$
C60A	$395,311 \pm 15,530$
C60G	$390,244 \pm 8,650$
C60C	$392,531 \pm 6,323$

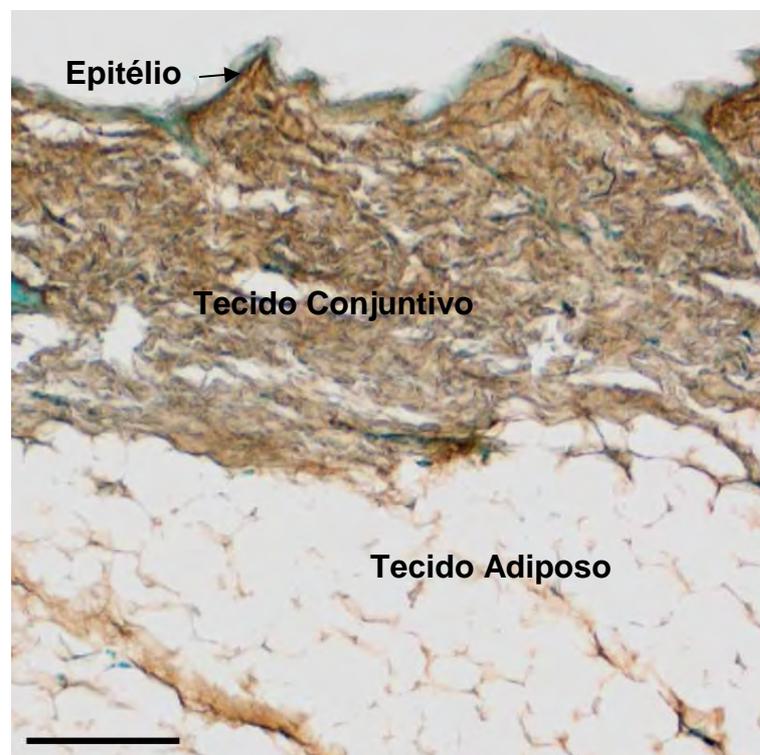
Figura 17 - Gráfico das médias e desvios padrões da espessura da derme para os grupos C45A, C60A, C60G e C60C



4.3 - Detecção histoquímica do ácido hialurônico

A detecção histoquímica do ácido hialurônico foi realizada com a utilização de sonda para ácido hialurônico possibilitando a análise das lâminas histológicas após serem contracoradas pelo corante Verde de Metila. Através deste método foi possível visualizar a presença do ácido hialurônico na epiderme e na derme do tecido conforme mostra a figura 18. A presença deste glicosaminoglicano foi observada em todos os grupos (controle, ooforectomizados, não ooforectomizados, tratados e não tratados com os açúcares).

Figura 18 - Fotomicrografia da detecção histoquímica do ácido hialurônico. As regiões coradas de marrom indicam a presença de ácido hialurônico no tecido epitelial e conjuntivo da amostra de pele. As regiões coradas pelo Verde de Metila indicam núcleos de células. Barra = 100 μ m



4.4 – Quantificação bioquímica do ácido hialurônico

Para a quantificação bioquímica do ácido hialurônico utilizou-se fragmentos da pele total, ou seja, a epiderme e a derme conjuntamente.

4.4.1 - Efeito da ooforectomia bilateral na concentração de ácido hialurônico nos períodos de 45 e 60 dias

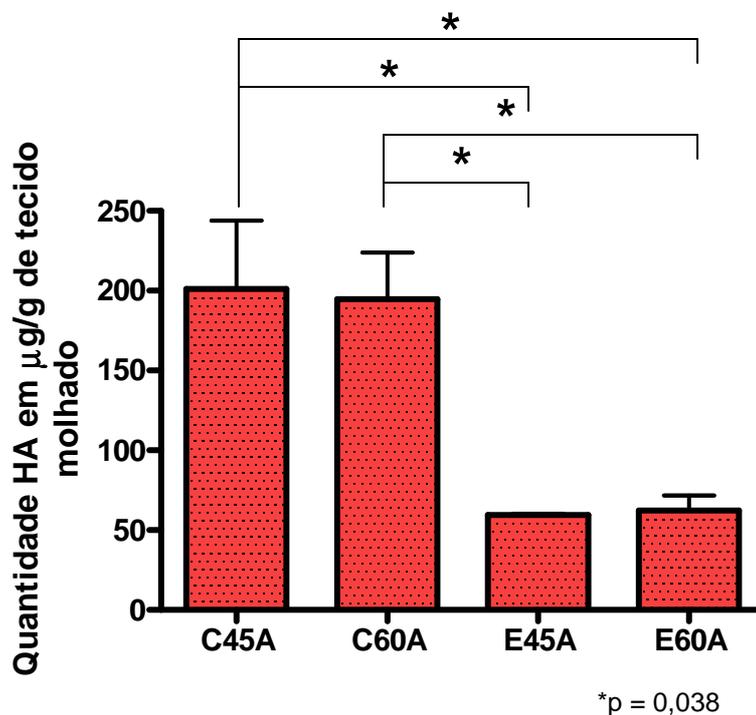
Os grupos ooforectomizados e tratados com água (E45A e E60A) apresentaram valores médios da concentração de ácido hialurônico estatisticamente inferiores àqueles apresentados pelos grupos não ooforectomizados e tratados com água (C45A e C60A). A tabela 7 e a figura 19 mostram estes resultados.

Tabela 7 - Valores médios e desvios padrões da concentração de ácido hialurônico em $\mu\text{g/g}$ de tecido molhado das amostras de pele dos grupos C45A, C60A, E45A e E60A

Grupos (animais)	Concentração do HA ($\mu\text{g/g}$ de tecido molhado)
C45A	201,145 \pm 42,675
C60A	194,598 \pm 29,313
E45A	59,554 \pm 0,725
E60A	62,191 \pm 9,414

Nota-se que a ooforectomia bilateral levou a uma diminuição estatisticamente significativa da concentração de ácido hialurônico, tanto no período de 45 dias quanto no período de 60 dias quando comparados a concentração de ácido hialurônico da pele de animais não ooforectomizados.

Figura 19 - Gráfico das médias e desvios padrões da concentração de ácido hialurônico na pele para os grupos C45A, C60A, E45A e E60A



4.4.2 - Efeito da ooforectomia bilateral na concentração de ácido hialurônico após 45 e 60 dias de administração de glicosamina sulfato (dinaflex®) ou glicosamina sulfato associada ao condroitim sulfato (condroflex®)

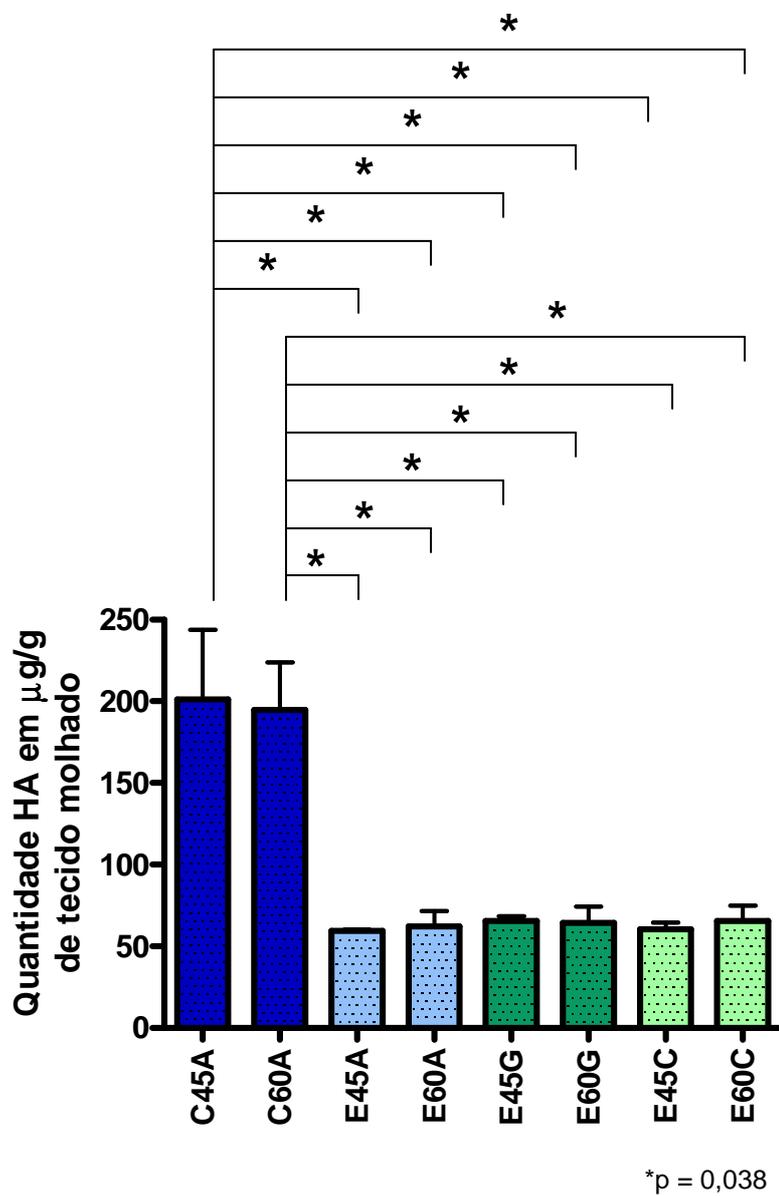
O efeito da diminuição da concentração de ácido hialurônico após a ooforectomia não foi alterado com a administração de glicosamina sulfato ou glicosamina sulfato associada ao condroitim sulfato, quer seja por 45 ou 60 dias. De forma semelhante aos grupos ooforectomizados e tratados com água (E45A e E60A), os grupos ooforectomizados e tratados com glicosamina sulfato (E45G e E60G) ou glicosamina sulfato associada ao condroitim sulfato (E45C e E60C) apresentaram valores médios da concentração de ácido hialurônico estatisticamente inferiores quando comparados aos grupos não ooforectomizados e tratados com água (C45A e C60A). A tabela 8 e a figura 20 mostram que os grupos C45A e C60A apresentam os maiores valores médios

da concentração de ácido hialurônico no tecido analisado, estatisticamente significativo, quando comparados aos valores médios dos grupos E45A, E60A, E45G, E60G, E45C e E60C. Entre os grupos ooforectomizados, não houve diferença estatisticamente significativa.

Tabela 8 - Valores médios e desvios padrões da concentração de Ácido hialurônico em $\mu\text{g/g}$ de tecido molhado das amostras de pele dos grupos C45A, C60A, E45A, E60A, E45G, E60G, E45C, E60C

Grupos (animais)	Concentração do HA ($\mu\text{g/g}$ de tecido molhado)
C45A	201,146 \pm 42,675
C60A	194,598 \pm 29,313
E45A	59,554 \pm 0,725
E60A	62,191 \pm 9,414
E45G	65,553 \pm 2,920
E60G	64,323 \pm 5,968
E45C	60,521 \pm 3,959
E60C	65,536 \pm 9,357

Figura 20 - Gráfico das médias e desvios padrões da concentração de ácido hialurônico na pele para os grupos C45A, C60A, E45A, E60A, E45G, E60G, E45C, E60C



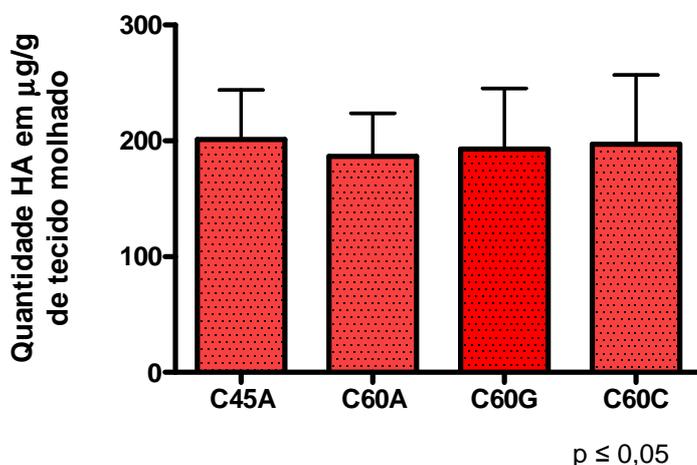
4.4.3 - Efeito da glicosamina sulfato (dinaflex®) e da glicosamina sulfato associada ao condroitim sulfato (condroflex®) nos grupos não ooforectomizados no período de 60 dias

Nos grupos não ooforectomizados, porém tratados com glicosamina sulfato (C60G) ou glicosamina sulfato associada ao condroitim sulfato (C60C), observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa da concentração de ácido hialurônico quando comparados aos grupos que também não foram ooforectomizados, porém tratados com água nos períodos de 45 e 60 dias conforme mostram a tabela 9 e a figura 21.

Tabela 9 - Valores médios e desvios padrões da concentração de ácido hialurônico em $\mu\text{g/g}$ de tecido molhado das amostras de pele dos grupos C45A, C60A, C60G e C60C

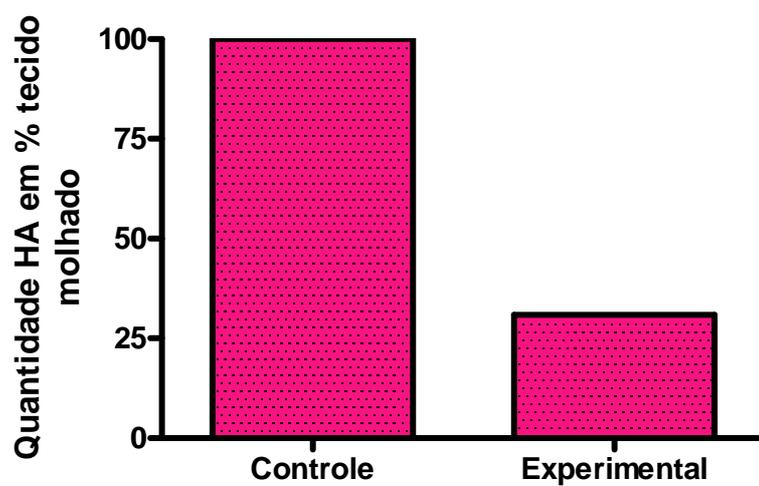
Grupos (animais)	Concentração do HA ($\mu\text{g/g}$ de tecido molhado)
C45A	201,145 \pm 42,675
C60A	186,598 \pm 37,313
C60G	192,960 \pm 52,417
C60C	197,129 \pm 59,761

Figura 21 - Gráfico das médias e desvios padrões da concentração de ácido hialurônico na pele para os grupos C45A, C60A, C60G e C60C



Os resultados demonstraram ainda que a concentração de ácido hialurônico foi em média 68% menor na ausência dos hormônios sexuais conforme mostra a figura 22.

Figura 22 - Quantidade relativa de ácido hialurônico dos grupos não ooforectomizados (controle) e ooforectomizados (experimental)



5. DISCUSSÃO

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano (Gartner, Janes, 2007). Sua qualidade piora com a idade devido aos efeitos do envelhecimento cronológico do organismo, fatores ambientais e de deficiência hormonal (Bologna et al., 1989; Brincat et al., 2005). O estrógeno é um hormônio que possui uma profunda influência sobre a pele (Circosta et al., 2006).

O estado de hipoestrogenismo na menopausa causa efeitos nas características físicas da pele, levando a uma diminuição do número de fibras de colágeno, perda de elasticidade, além de reduzir a quantidade de água e de glicosaminoglicanos presentes neste tecido (Raine-Finney et al., 2003; Brincat et al., 2005), contribuindo assim, para a desidratação da pele e o aparecimento de rugas (Andre, 2004).

Sabe-se também, que a osteoartrite pode ser causada pela diminuição na secreção de estrógeno após a menopausa (Hochberg, 2002). Estudos recentes demonstram a eficiência do tratamento com glicosamina sulfato ou glicosamina sulfato associada ao condroitim sulfato como sendo agentes que interferem na progressão da osteoartrite (Hungerford, Jones, 2003; Bruyere, Reginster 2007), porém, ainda não foi verificada a influência destes componentes na pele de mulheres na menopausa.

No presente estudo, realizamos a ooforectomia bilateral, em ratas (grupo experimental) com a intenção de promover nas mesmas a parada da produção de hormônios sexuais. Assim, através de exames colpocitológicos realizados durante quatro semanas consecutivas, verificou-se a parada de produção de hormônio. Segundo Ozyazgan et al., 2002, a ooforectomia em ratas é um modelo experimental muito utilizado para estudos associados ao envelhecimento causado nas mulheres durante a menopausa.

Após a supressão dos hormônios os animais ooforectomizados receberam por gavagem água ou glicosamina sulfato ou glicosamina sulfato associada ao condroitim sulfato por 45 e 60 dias.

Os resultados tanto morfológicos quanto morfométricos nos animais ooforectomizados tratados apenas com água estão de acordo com a literatura que evidencia uma diminuição da espessura da epiderme e da derme devido à ausência de hormônios sexuais (Oikarinen, 2000; Ozyazgan et al., 2002). A concentração de ácido hialurônico também diminui com a ooforectomia (Tabela 7 e Figura 19). Estas alterações são semelhantes tanto após 45 quanto 60 dias sem hormônio, indicando que a parada hormonal por 45 dias já é suficiente para produzir esses efeitos na pele desprovida dos hormônios sexuais. Os quinze dias a mais sem hormônio não produziram diferenças estatisticamente significativas na pele.

O ácido hialurônico é sintetizado por uma família de glicosiltransferases (HAS1, HAS2 e HAS3) associadas à membrana plasmática (Camenisch, McDonald, 2000). Seu efeito é mediado por receptores intracelulares específicos (Haapasaari et al., 1997; Oikarinen, 2000) presentes nos fibroblastos na derme e nos queratinócitos da epiderme (MacLean et al., 1990; Brincat et al., 2005). A presença do hormônio estrógeno aumenta consideravelmente a concentração de ácido hialurônico na pele (Uzuka et al., 1981; Thornton, 2002; Kanda, Watanabe, 2005) e também contribui para o aumento da atividade mitótica no tecido (Thornton, 2002; Verdier-Sévrain et al., 2006). A ausência do estrógeno sugere então que ocorra uma diminuição na proliferação dos fibroblastos (derme) e dos queratinócitos (epiderme) e, também uma diminuição de ácido hialurônico. Este fato sugere ainda que a diminuição da concentração de ácido hialurônico na pele possa estar ocorrendo pela diminuição do número de células.

A administração de glicosamina sulfato ou glicosamina sulfato associada ao condroitim sulfato após ooforectomia não alterou os resultados obtidos após a ooforectomia, isto é, não alterou a morfologia dos tecidos da pele, não aumentou a espessura dos tecidos da pele e a concentração de ácido hialurônico, tanto após 45 ou 60 dias de administração. Os dados aqui apresentados mostram que estes açúcares não alteram os efeitos observados na pele sobre efeito da ausência dos hormônios sexuais.

Na cartilagem, um tecido que também tem alterações após a parada dos hormônios sexuais, a literatura mostra que estes açúcares revertem clinicamente os efeitos desta ausência, melhorando os sintomas da osteoartrite. (Hungerford, Jones, 2003; Kobayashi et al., 2005; Bruyere, Reginster 2007). A glicosamina sulfato estimula os condrócitos aumentando a secreção de glicosaminoglicanos e proteoglicanos (Hungerford, Jones, 2003) e o condroitim sulfato inibe a degradação da cartilagem que é característica da osteoartrite (Bassleer et al., 1992; Hungerford, Jones, 2003).

A glicosamina sulfato é um amino açúcar presente em quase todos os tecidos humanos e é essencial na formação do ácido hialurônico (Bissett, 2006). Juntamente com seu derivado N-acetil-glucosamina é prontamente sintetizada pelo organismo a partir da glicose (Anderson et al., 2005). A administração da glicosamina sulfato em humanos geralmente é realizada por via oral e sua absorção no aparelho digestório é de 90% da dose administrada (Setnikar, Rovati, 2001; Anderson et al., 2005). O condroitim sulfato é um glicosaminoglicano que faz parte da composição da estrutura do proteoglicano Versican presente na pele (Carrino et al., 2000). A absorção do condroitim sulfato no aparelho digestório pela administração oral é acima de 70% (Lippiello et al., 2000). A utilização da glicosamina sulfato e do condroitim sulfato está no fato destes componentes serem essenciais para a síntese de glicosaminoglicanos e na montagem dos proteoglicanos (Lippiello et al., 2000; Morelli et al., 2003). Apesar da presença destes componentes no organismo, os resultados demonstraram que não ocorre aumento da concentração de ácido hialurônico na pele após a ooforectomia. Este fato sugere uma especificidade na ação destes açúcares para cada tecido.

Os grupos não ooforectomizados C60G e C60C, submetidos ao tratamento oral de glicosamina sulfato ou glicosamina sulfato associada ao condroitim sulfato, por 60 dias de administração, não apresentaram alterações em sua estrutura morfológica, assim como também não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na espessura da epiderme e da derme quando comparados aos grupos não ooforectomizados, porém tratados com água C45A e C60A. A quantificação bioquímica do ácido hialurônico

demonstrou que também não houve aumento da concentração de ácido hialurônico após o tratamento com os açúcares durante 60 dias de administração (Tabela 9 e Figura 21), sugerindo que mesmo com a presença dos hormônios sexuais e após administração destes açúcares, não ocorre alteração morfológica, morfométrica e na quantificação bioquímica do ácido hialurônico nas amostras de pele.

Para detecção do ácido hialurônico na epiderme e na derme, foi utilizada uma sonda biotinilada específica para o ácido hialurônico. A marcação da sonda foi evidenciada em todos os grupos (controle, ooforectomizados, não ooforectomizados, tratados e não tratados com os medicamentos) tanto na epiderme quanto na derme (Figura 18). A literatura mostra que na pele humana, grandes concentrações de ácido hialurônico estão presentes na derme, entretanto, na epiderme há também grandes concentrações de ácido hialurônico (Tammi et al., 1989; Tammi et al., 2005).

Ainda neste estudo, foi possível observar que na ausência do hormônio estrógeno ocorre uma diminuição de aproximadamente 68% da concentração de ácido hialurônico na pele, isto é, quando comparado os grupos de ratas não ooforectomizadas com os grupos de ratas ooforectomizadas, nota-se uma queda acentuada da concentração de ácido hialurônico. Este resultado é bem relatado na literatura, onde vários estudos mostram que a presença do hormônio estrógeno está diretamente ligada à concentração de ácido hialurônico produzido na pele (Uzuka et al., 1981; Thornton, 2002; Kanda, Watanabe, 2005).

6. CONCLUSÕES

1. A diminuição da espessura da epiderme e da derme nos animais ooforectomizados não é alterada após a administração de glicosamina sulfato ou glicosamina sulfato associada ao condroitim sulfato por 45 ou 60 dias;
2. A concentração do ácido hialurônico na pele dos animais ooforectomizados não é alterada após a administração de glicosamina sulfato ou glicosamina sulfato associada ao condroitim sulfato por 45 ou 60 dias;
3. Não há alteração da concentração de ácido hialurônico entre os tempos 45 e 60 dias sem hormônio;
4. A administração terapêutica da glicosamina sulfato ou glicosamina sulfato associada ao condroitim sulfato deve levar em consideração as peculiaridades de cada tecido.

7. ANEXOS

ANEXO 1

Dinaflex®: Glicosamina sulfato [bula de remédio]. Responsável técnico Dra. Maria Rita Maniezi. Pindamonhangaba - SP: Zodiac Produtos Farmacêuticos.

ANEXO 2

Condroflex®: Glicosamina sulfato em associação ao Condroitim sulfato [bula de remédio]. Responsável técnico Dra. Maria Rita Maniezi. Pindamonhangaba - SP: Zodiac Produtos Farmacêuticos.

8. REFERÊNCIAS

-
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 3° ed. Artes Médicas. Porto Alegre. 2006. p. 978-983.
- Aghazadeh-Habashi A, Sattari S, Pasutto F, Jamali F. Single dose pharmacokinetics and bioavailability of glucosamine in the rat. *J Pharm Pharm Sci.* 2002 May-Aug;5(2):181-4.
- Anderson JW, Nicolosi RJ, Borzelleca JF. Glucosamine effects in humans: a review of effects on glucose metabolism, side effects, safety considerations and efficacy. *Food Chem Toxicol.* 2005 Feb;43(2):187-201.
- Andre P. Hyaluronic acid and its use as a "rejuvenation" agent in cosmetic dermatology. *Semin Cutan Med Surg.* 2004 Dec;23(4):218-22.
- Ascher B, Cerceau M, Baspeyras M, Rossi B. Soft tissue filling with hyaluronic acid. *Ann Chir Plast Esthet.* 2004 Oct;49(5):465-85.
- Bassleer C, Henrotin Y, Franchimont P. In-vitro evaluation of drugs proposed as chondroprotective agents. *Int J Tissue React.* 1992;14(5):231-41.
- Baumann L. Skin ageing and its treatment. *J Pathol.* 2007 Jan;211(2):241-51.
- Bernfield M, Götte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:729-77.
- Bissett DL. Glucosamine: an ingredient with skin and other benefits. *J Cosmet Dermatol.* 2006 Dec;5(4):309-15.
- Bologna JL, Braverman IM, Rousseau ME, Sarrel PM. Skin changes in menopause. *Maturitas.* 1989 Dec;11(4):295-304.
- Brincat MP, Baron YM, Galea R. Estrogens and the skin. *Climacteric.* 2005 Jun;8(2):110-23. Review.

Bruyere O, Reginster JY. Glucosamine and chondroitin sulfate as therapeutic agents for knee and hip osteoarthritis. *Drugs Aging*. 2007;24(7):573-80.

Callaghan TM, Wilhelm KP. A review of ageing and an examination of clinical methods in the assessment of ageing skin. Part I: Cellular and molecular perspectives of skin ageing. *Int J Cosmet Sci*. 2008 Oct;30(5):313-22.

Camenisch TD, McDonald JA. Hyaluronan: is bigger better? *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000 Oct;23(4):431-3.

Carrino DA, Sorrell JM, Caplan AI. Age-related changes in the proteoglycans of human skin. *Arch Biochem Biophys*. 2000 Jan 1;373(1):91-101.

Carrino DA, Onnerfjord P, Sandy JD, Cs-Szabo G, Scott PG, Sorrell JM, Heinegård D, Caplan AI. Age-related changes in the proteoglycans of human skin. Specific cleavage of decorin to yield a major catabolic fragment in adult skin. *J Biol Chem*. 2003 May 9;278(19):17566-72.

Circosta C, De Pasquale R, Palumbo DR, Samperi S, Occhiuto F. Effects of isoflavones from red clover (*Trifolium pratense*) on skin changes induced by ovariectomy in rats. *Phytother Res*. 2006 Dec;20(12):1096-9.

Csoka AB, Frost GI, Stern R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol*. 2001 Dec;20(8):499-508.

Daley WP, Peters SB, Larsen M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J Cell Sci*. 2008 Feb 1;121(Pt 3):255-64.

Day AJ, Sheehan JK. Hyaluronan: polysaccharide chaos to protein organisation. *Curr Opin Struct Biol*. 2001 Oct;11(5):617-22.

Evanko SP, Wight TN. Intracellular localization of hyaluronan in proliferating cells. *J Histochem Cytochem*. 1999 Oct;47(10):1331-42.

Evanko S, Wight TN. Intracellular hyaluronan. 2001. Glycoforum, (<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA20/HA20E.html>).

Fitzgerald KA, Bowie AG, Skeffington BS, O'Neill LA. Ras, protein kinase C zeta, and I kappa B kinases 1 and 2 are downstream effectors of CD44 during the activation of NF-kappa B by hyaluronic acid fragments in T-24 carcinoma cells. *J Immunol.* 2000 Feb 15;164(4):2053-63.

Frost GI, Csóka AB, Wong T, Stern R. Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Jul 9;236(1):10-5.

Gartner LP, Hiatt JL. *Tratado de Histologia.* 2º ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2003. p. 266-277.

Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003 Nov 28;55(12):1531-46.

Haapasaari KM, Raudaskoski T, Kallioinen M, Suvanto-Luukkonen E, Kauppila A, Läärä E, Risteli J, Oikarinen A. Systemic therapy with estrogen or estrogen with progestin has no effect on skin collagen in postmenopausal women. *Maturitas.* 1997 Jun;27(2):153-62.

Harada H, Takahashi M. CD44-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2. *J Biol Chem.* 2007 Feb 23;282(8):5597-607.

Hascall VC, Majors AK, De La Motte CA, Evanko SP, Wang A, Drazba JA, Strong SA, Wight TN. Intracellular hyaluronan: a new frontier for inflammation? *Biochim Biophys Acta.* 2004 Jul 6;1673(1-2):3-12.

Hochberg Ze'ev. Clinical physiology and pathology of the growth plate. *Best Pract Res Clin End Metabol.* 2002; 16: 399 - 419.

Huang L, Grammatikakis N, Yoneda M, Banerjee SD, Toole BP. Molecular characterization of a novel intracellular hyaluronan-binding protein. *J Biol Chem*. 2000 Sep 22;275(38):29829-39.

Hungerford DS, Jones LC. Glucosamine and chondroitin sulfate are effective in the management of osteoarthritis. *J Arthroplasty*. 2003 Apr;18(3 Suppl 1):5-9.

Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, Shinomura T, Hamaguchi M, Yoshida Y, Ohnuki Y, Miyauchi S, Spicer AP, McDonald JA, Kimata K. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem*. 1999 Aug 27;274(35):25085-92.

Jacobson A, Brinck J, Briskin MJ, Spicer AP, Heldin P. Expression of human hyaluronan synthases in response to external stimuli. *Biochem J*. 2000 May 15;348 Pt 1:29-35.

Järveläinen H, Sainio A, Koulu M, Wight TN, Penttinen R. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*. 2009 Jun;61(2):198-223.

Junqueira LC; Carneiro J. *Histologia Básica*. 10^o ed . Rio de Janeiro: Guanabara - Koogan; 2004. p. 68,92,185,169, e 364-369.

Kafantari H, Kounadi E, Fatouros M, Milonakis M, Tzaphlidou M. Structural alterations in rat skin and bone collagen fibrils induced by ovariectomy. *Bone*. 2000 Apr;26(4):349-53.

Takehi K, Kinoshita M, Yasueda S. Hyaluronic acid: separation and biological implications. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2003 Nov 25;797(1-2):347-55.

Kalache A, Veras RP, Ramos LR. The aging of the world population. A new challenge. *Rev Saude Publica*. 1987 Jun;21(3):200-10.

Kanda N, Watanabe S. Regulatory roles of sex hormones in cutaneous biology and immunology. *J Dermatol Sci*. 2005 Apr;38(1):1-7.

Kierszenbaum AL. *Histologia e Biologia Celular*. 1º ed. Elsevier. Rio de Janeiro. 2004. p.364-369.

Kleinman HK, Philp D, Hoffman MP. Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Curr Opin Biotechnol*. 2003 Oct;14(5):526-32.

Kobayashi T, Notoya K, Nakamura A, Akimoto K. Fursultiamine, a vitamin B1 derivative, enhances chondroprotective effects of glucosamine hydrochloride and chondroitin sulfate in rabbit experimental osteoarthritis. *Inflamm Res*. 2005 Jun;54(6):249-55.

Knudson CB, Knudson W. Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease. *FASEB J*. 1993 Oct;7(13):1233-41.

Laurent TC, Fraser JR. Hyaluronan. *FASEB J*. 1992 Apr;6(7):2397-2404.

Laurent TC, Laurent UB, Fraser JR. Functions of hyaluronan. *Ann Rheum Dis*. 1995 May;54(5):429-32.

Laurent TC, Laurent UB, Fraser JR. The structure and function of hyaluronan: An overview. *Immunol Cell Biol*. 1996 Apr;74(2):A1-7.

Laurent TC. "The Tree": Hyaluronan Research in the 20th Century. 2000. Glycoforum, (<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA23/HA23E.html>).

Lee JY, Spicer AP. Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr Opin Cell Biol*. 2000 Oct;12(5):581-6.

Lees VC, Fan TP, West DC. Angiogenesis in a delayed revascularization model is accelerated by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan. *Lab Invest*. 1995 Aug;73(2):259-66.

Lesley J, Hascall VC, Tammi M, Hyman R. Hyaluronan binding by cell surface CD44. *J Biol Chem*. 2000 Sep 1;275(35):26967-75.

Lippiello L, Woodward J, Karpman R, Hammad TA. In vivo chondroprotection and metabolic synergy of glucosamine and chondroitin sulfate. *Clin Orthop Relat Res*. 2000 Dec;(381):229-40.

MacLean AB, Nicol LA, Hodgins MB. Immunohistochemical localization of estrogen receptors in the vulva and vagina. *J Reprod Med*. 1990 Nov;35(11):1015-6

McDonald J, Hascall VC. Hyaluronan minireview series. *J Biol Chem*. 2002 Feb 15;277(7):4575-9. Epub 2001 Nov 20.

Morelli V, Naquin C, Weaver V. Alternative therapies for traditional disease states: osteoarthritis. *Am Fam Physician*. 2003 Jan 15;67(2):339-44.

Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet*. 2004 Jan;20(1):33-43.

Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluronan) a review. *Veterinarni Medicina*. 2008; 53 (8): 397-411.

Oikarinen A. Systemic estrogens have no conclusive beneficial effect on human skin connective tissue. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2000 Apr;79(4):250-4.

Oliferenko S, Kaverina I, Small JV, Huber LA. Hyaluronic acid (HA) binding to CD44 activates Rac1 and induces lamellipodia outgrowth. *J Cell Biol*. 2000 Mar 20;148(6):1159-64. Erratum in: *J Cell Biol* 2000 Apr 3;149.

Ozyazgan I, Liman N, Dursun N, Güneş I. The effects of ovariectomy on the mechanical properties of skin in rats. *Maturitas*. 2002 Sep 30;43(1):65-74.

Prost-Squarcioni C, Fraitag S, Heller M, Boehm N. Functional histology of dermis. *Ann Dermatol Venereol*. 2008 Jan;135(1 Pt 2):1S5-20.

Raine-Fenning NJ, Brincat MP, Muscat-Baron Y. Skin aging and menopause : implications for treatment. *Am J Clin Dermatol*. 2003;4(6):371-8.

Sakai S, Yasuda R, Sayo T, Ishikawa O, Inoue S. Hyaluronan exists in the normal stratum corneum. *J Invest Dermatol*. 2000 Jun;114(6):1184-7.

Sayo T, Sugiyama Y, Takahashi Y, Ozawa N, Sakai S, Ishikawa O, Tamura M, Inoue S. Hyaluronan synthase 3 regulates hyaluronan synthesis in cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2002 Jan;118(1):43-8.

Schmidt JB, Lindmaier A, Spona J. Hormone receptors in pubic skin of premenopausal and postmenopausal females. *Gynecol Obstet Invest*. 1990;30(2):97-100.

Setnikar I, Rovati LC. Absorption, distribution, metabolism and excretion of glucosamine sulfate. A review. *Arzneimittelforschung*. 2001 Sep;51(9):699-725.

Shah MG, Maibach HI. Estrogen and skin. An overview. *Am J Clin Dermatol*. 2001;2(3):143-50.

Spicer AP, Seldin MF, Olsen AS, Brown N, Wells DE, Doggett NA, Itano N, Kimata K, Inazawa J, McDonald JA. Chromosomal localization of the human and mouse hyaluronan synthase genes. *Genomics*. 1997 May 1;41(3):493-7

Spicer AP, McDonald JA. Eukaryotic Hyaluronan Synthases. 1998. *Glycoforum*, (<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA07/HA07E.html>).

Spicer AP, McDonald JA. Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family. *J Biol Chem.* 1998 Jan 23;273(4):1923-32.

Stern R. Update on the Mammalian Hyaluronidases. 2204. Glycoforum, (<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA15a/HA15aE.html>).

Straach KJ, Shelton JM, Richardson JA, Hascall VC, Mahendroo MS. Regulation of hyaluronan expression during cervical ripening. *Glycobiology.* 2005 Jan;15(1):55-65.

Tammi R, Ripellino JA, Margolis RU, Maibach HI, Tammi M: Hyaluronate accumulation in human epidermis treated with retinoic acid in skin organ culture. *J Invest Dermatol* 92:326–332, 1989.

Tammi R, Säämänen AM, Maibach HI, Tammi M. Degradation of newly synthesized high molecular mass hyaluronan in the epidermal and dermal compartments of human skin in organ culture. *J Invest Dermatol.* 1991 Jul;97(1):126-30.

Tammi MI, Day AJ, Turley EA. Hyaluronan and homeostasis: a balancing act. *J Biol Chem.* 2002 Feb 15;277(7):4575-9.

Tammi R, Pasonen-Seppänen S, Kolehmainen E, Tammi M. Hyaluronan synthase induction and hyaluronan accumulation in mouse epidermis following skin injury. *J Invest Dermatol.* 2005 May;124(5):898-905.

Taylor KR, Gallo RL. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J.* 2006 Jan;20(1):9-22.

Thornton MJ. The biological actions of estrogens on skin. *Exp Dermatol.* 2002 Dec;11(6):487-502.

Toole BP. Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins. *Curr Opin Cell Biol.* 1990 Oct;2(5):839-44.

Toole BP. Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2001 Apr;12(2):79-87.

Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer.* 2004 Jul;4(7):528-39.

Towheed TE, Anastassiades TP. Glucosamine and chondroitin for treating symptoms of osteoarthritis: evidence is widely touted but incomplete. *JAMA.* 2000 Mar 15;283(11):1483-4.

Turley E, Harrison R. RHAMM, a member of the hyaladherins. 1999. *Glycoforum*,
(<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA11/HA11E.html>).

Uldry M, Ibberson M, Hosokawa M, Thorens B. GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Lett.* 2002 Jul 31;524(1-3):199-203.

Uzuka M, Nakajima K, Ohta S, Mori Y. Induction of hyaluronic acid synthetase by estrogen in the mouse skin. *Biochim Biophys Acta.* 1981 Apr 3;673(4):387-93.

Van Blitterswijk WJ, Van de Nes JC, Wuisman PI. Glucosamine and chondroitin sulfate supplementation to treat symptomatic disc degeneration: biochemical rationale and case report. *BMC Complement Altern Med.* 2003 Jun 10;3:2.

Vangsness CT Jr, Spiker W, Erickson J. A review of evidence-based medicine for glucosamine and chondroitin sulfate use in knee osteoarthritis. *Arthroscopy.* 2009 Jan;25(1):86-94.

Verdier-Sévrain S, Bonté F, Gilchrest B. Biology of estrogens in skin: implications for skin aging. *Exp Dermatol.* 2006 Feb;15(2):83-94.

Verdier-Sévrain S. Effect of estrogens on skin aging and the potential role of selective estrogen receptor modulators. *Climacteric*. 2007 Aug;10(4):289-97.

Vynios DH, Karamanos NK, Tsiganos CP. Advances in analysis of glycosaminoglycans: its application for the assessment of physiological and pathological states of connective tissues. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002 Dec 5;781(1-2):21-38.

Weigel PH, Hascall VC, Tammi M. Hyaluronan synthases. *J Biol Chem*. 1997 May 30;272(22):13997-4000.

Zimmerman E, Geiger B, Addadi L. Initial stages of cell-matrix adhesion can be mediated and modulated by cell-surface hyaluronan. *Biophys J*. 2002 Apr;82(4):1848-57.

9.ABSTRACT

Several factors contribute to the skin changes that are associated with menopause, including chronologic aging of the organism and the withdrawal of steroid hormones. It is known that sexual hormone suppression leads to alterations in the skin extracellular matrix. Hyaluronic acid (HA) high molecular weight glycosaminoglycan and a major component of the extracellular matrix. In the skin, which contains 50% of the total body HA. Several biological functions have been assigned to HA, among them the stabilization of the extracellular matrix, water homeostasis, joint lubrication, proliferation cell and regulation of the cellular activities. Glucosamine sulfate (Glc) and chondroitin sulfate (CS), both components to the extracellular matrix, have been used for treatment of osteoarthritis. The Glucosamine sulfate is an amino monosaccharide that is present in all human tissues and is precursors for the biosynthesis of the glycosaminoglycan and proteoglycans. The chondroitin sulfate is a glycosaminoglycan formed for repeating disaccharide units containing galactosamine sulfate and glucuronic acid. However, the glucosamine sulfate and its association with chondroitin sulfate (Glc/CS) and their effects on the aged skin tissue are still unknown. This study was done to observe the profile of the hyaluronic acid in the skin after ovariectomy in rats treated and untreated with Glc or Glc/CS. Wistar rats (n = 50) were divided in two groups: not ovariectomized (control) and ovariectomized (experimental). The animals received by gavage either water (0,25ml) or 0,0214 mg/g of animal weight of Dinaflex® 1,5g (glucosamine sulfate) or Condoflex® 1,5g + 1,2g (glucosamine sulfate + chondroitin sulfate) during 45 and 60 days. Their skins were dissected and analyzed the following parameters: 1) thickness of dermis and epidermis; 2) histochemical localization of the hyaluronic acid; 3) biochemical quantification of the hyaluronic acid. Through this study we conclude that: 1) ovariectomized animals decreased the amount of hyaluronic acid in the skin; 2) ovariectomized animals and treated with water or Glc or Glc/CS for 45 and 60 days to administration they do not present alterations in the acid hyaluronic concentration: 3) the therapeutical administration of these composites must take in consideration the peculiarities of each tissue.

10.BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Michaelis Moderno Dicionário - Inglês / Português - Português / Inglês. Ed. Melhoramentos. São Paulo; 2002.

Rother ET, Braga MER. Como elaborar a sua tese: Estrutura e referências. 2ª ed. São Paulo; 2005.