

COMPOSITION CHANGES OF GLYCOSAMINOGLYCANS IN THE URETHRAL STRICTURE DISEASE

E. ALEXSANDRO DA SILVA, FRANCISCO J.B. SAMPAIO, M. CRISTINA DORNAS, VALDEMAR ORTIZ, LUIZ E.M. CARDOSO

Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro, RJ and Division of Urology, Federal University of São Paulo, SP, Brazil

ABSTRACT

Purpose: Glycosaminoglycans (GAGs) are components of the extracellular matrix and play key roles in the normal physiology and pathology of several tissues. Recently, we have described the composition of GAGs in the several segments of the normal male urethra. There is no data, however, on GAGs composition in the urethral stricture disease.

Material and Methods: Urethral stricture samples were obtained from 7 patients submitted to end-to-end anastomosis of bulbar urethroplasties. The patients mean age was 48.0 years (range 18 to 62 years). GAGs in defatted, dry tissue samples were extracted by papain digestion and cetylpyridinium chloride/ethanol precipitation. The concentration of total GAGs was assessed by a hexuronic acid assay and expressed as microgram hexuronic acid per milligram dry tissue, while the proportions of sulfated GAGs were determined by agarose gel electrophoresis. The concentration of hyaluronic acid was determined by ion-exchange chromatography. The control group consisted of 10 bulbar urethra samples obtained from fresh, macroscopically normal cadavers aged 16 to 38 years (mean 25.6 years).

Results: The mean value of total GAG concentration in stricture of the bulbar urethra was 1.097 ± 0.186 and was significantly lower than the control group ($p < 0.05$). While the most predominant GAG in the normal urethra was hyaluronic acid ($40.7\% \pm 5.0$), dermatan sulfate predominated in the urethral stricture ($39.5\% \pm 3.1$). There were no significant changes in the relative concentration of heparan sulfate and chondroitin sulfate between normal and strictured urethras. Hyaluronic acid relative concentration decreased 45.2% and dermatan sulfate increased 47.4%.

Conclusion: Dermatan sulfate is mostly associated with fibrillar collagen, and the increased concentration of this GAG in the urethral stricture disease, together with a decrease of total GAGs, imply excessive collagen accumulation. These alterations, including a decrease in hyaluronic acid content, may change the urethral compliance and would lead to functional changes.

Key words: urethra; stricture; glycosaminoglycans; proteoglycans; extracellular matrix
Braz J Urol, 27: 394-398, 2001

INTRODUÇÃO

A matriz extracelular desempenha um papel fundamental na fisiologia e na biomecânica dos tecidos. Nela existe uma atividade constante devido à degradação e síntese de seus componentes. A regulação do depósito de matriz extracelular é um evento importante em muitas condições, tanto normais

quanto patológicas (1). É fundamental para uma cicatrização normal, onde as moléculas da matriz necessitam ser rapidamente sintetizadas durante a formação do tecido de granulação, na reposição final por tecido conjuntivo e no remodelamento tardio (2). Portanto, um balanço adequado entre síntese e degradação é necessário para um funcionamento normal do tecido. Um balanço inadequado, tanto

quantitativo quanto qualitativo, pode produzir uma diminuição na complacência do tecido lesado, causando alterações funcionais e conseqüentemente problemas clínicos (1). A característica fundamental da estenose de uretra é a fibrose (ou espongiopfibrose) que pode obstruir seu lúmen causando sintomas urinários obstrutivos.

Glicosaminoglicanos (GAGs) são heteropolissacarídeos complexos que possuem quantidades diversas de grupamentos carboxila e sulfato, existindo em forma nativa como glicoconjugados denominados proteoglicanos (3). Proteoglicanos são componentes importantes da superfície celular e da matriz extracelular, podendo interagir especificamente com vários outros componentes matriciais, tais como colágeno, laminina, fibronectina e citocinas (4). Estas interações são responsáveis pela organização estrutural da matriz extracelular e regulação da interação célula-célula e célula-matriz. Com isso, os GAGs têm um papel fundamental no fenômeno de cicatrização (5).

Embora a identificação dos GAGs em tecidos em processo de cicatrização é conhecido desde décadas passadas (6), suas funções ainda não estão completamente elucidadas. Além disso, apenas recentemente foi descrita a composição de GAGs na uretra masculina normal (7) e não existem dados sobre a composição deste componente da matriz extracelular em processos patológicos envolvendo a uretra. No presente trabalho determinamos as alterações na concentração e composição bioquímica de GAGs em estenoses da uretra bulbar.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê local de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos. Amostras de estenose foram obtidas de 7 pacientes submetidos a uretroplastia término-terminal da uretra bulbar. A média de idade dos pacientes foi de 48 anos, variando entre 18 e 62 anos. A causa das estenoses foi traumática (n = 4) e infecciosa (n = 2), e em um caso não foi possível estabelecer a etiologia. O grupo controle consistiu de 10 amostras de uretra bulbar obtidas de cadáveres frescos e sem alterações

relacionadas ao trato urogenital. A idade média deste grupo foi de 25.6 anos, variando de 16 a 38 anos. Todas as amostras foram imediatamente fixadas em acetona e clivadas em fragmentos de aproximadamente 3 x 3 mm. Depois foram delipidadas por meio de duas trocas de clorofórmio: metanol (2:1, v/v), e secas a 60°C.

A extração de GAGs seguiu um protocolo previamente descrito (8). Resumidamente, cerca de 35 a 155 mg de tecido delipidado e seco foram incubados em papaína bicristalizada (Sigma, St. Louis, USA) em tampão acetato 100 mM, pH 5.0, contendo cisteína 5mM e EDTA 5 mM, por 24 horas a 60°C. Após centrifugação, cloreto de cetilpiridínio (CPC) foi adicionado ao sobrenadante para precipitar os GAGs. As amostras foram centrifugadas e o complexo CPC-GAG no pellet foi dissociado com NaCl 2M. Os GAGs foram por fim precipitados ao se adicionar 2 volumes de etanol absoluto às amostras, que foram então mantidas a 4°C por 24 horas. Após uma série de centrifugações e lavagens do pellet com etanol, obteve-se a preparação final de GAGs totais, a qual foi utilizada nas análises subseqüentes.

A quantificação dos GAGs totais foi feita por meio da dosagem de ácido hexurônico, utilizando o método do carbazol (9), no qual as amostras purificadas de GAGs são primeiramente tratadas com ácido sulfúrico a 100°C. A concentração de GAGs na uretra foi expressa em microgramas de ácido hexurônico por miligrama de tecido delipidado e seco.

A quantidade relativa dos GAGs sulfatados (condroitin sulfato, dermatan sulfato e heparan sulfato) foi determinada por eletroforese em gel de agarose a 0.5 % em tampão de 1,3-diaminopropano 50 mM, pH 9.0 (10). Após corrida a 80 V, o gel foi fixado em brometo de N-Cetil-N,N,N-trimetilamônio 0.1%, corado em azul de toluidina 0.1%, e a proporção dos GAGs foi determinada por densitometria das bandas seguida de integração dos picos usando o programa Scion Image (Scion Corporation, USA). A identificação das bandas na placa de agarose foi feita com base na comparação com a migração de padrões de GAGs comerciais (Sigma, USA).

GAGs totais foram fracionados por cromatografia de troca iônica em colunas de DEAE-Sephacel eluídas com um gradiente linear de 0.1 M

0.9M NaCl. Três picos foram obtidos, os quais já foram previamente identificados (8). O primeiro pico corresponde ao ácido hialurônico e foi usado para a determinação de sua concentração relativa.

A diferença dos dados obtidos entre os grupos foi analisada pelo teste para duas amostras de Wilcoxon. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0.05$. Os dados são apresentados como médias \pm um desvio padrão.

RESULTADOS

A concentração de GAGs totais no segmento bulbar estenosado foi de 1.097 ± 0.186 e foi significativamente ($p < 0.05$) menor que no grupo controle. O ácido hialurônico ($40.7\% \pm 5.0$) foi o GAG predominante na uretra bulbar normal, enquanto que o dermatan sulfato ($39.5\% \pm 3.1$) foi o GAG predominante na uretra estenosada (Table). Houve uma diminuição significativa ($p < 0.01$) de 45.2% da concentração de ácido hialurônico nas uretras com estenose. Também foi significativo ($p < 0.05$) o aumento de 47.4% na concentração de dermatan sulfato. Apesar do condroitin sulfato ter apresentado um pequeno aumento de 18.9% na sua concentração, este aumento não foi significativo ($p > 0.05$). A concentração de heparan sulfato manteve-se estável ($p > 0.10$).

DISCUSSÃO

Os tratamentos atuais da estenose da uretra masculina proporcionam resultados variáveis e às

vezes frustrantes para o cirurgião, fazendo com que a morbidade para o paciente seja alta. Apesar de existirem alguns estudos sobre a estrutura da estenose da uretra (11-14), sabe-se pouco sobre as alterações moleculares que ocorrem na matriz extracelular. Em relação aos GAGs, apenas recentemente foi descrito a sua composição no tecido esponjoso normal (7). Como nossos resultados prévios mostraram que a concentração e a composição de GAGs varia nos diversos segmentos da uretra esponjosa, no presente trabalho nós decidimos estudar as alterações que ocorrem na estenose apenas do segmento bulbar, pois além de permitir uma comparação mais precisa também é o lugar de maior incidência de estenoses, incluindo as de origem idiopáticas.

A cicatrização é um fenômeno que envolve principalmente a matriz extracelular e uma série de moléculas (citocinas), algumas ainda não completamente elucidadas. O heparan sulfato, um GAG de membrana basal, tem uma distribuição irregular na uretra, chamando a atenção sua alta concentração na uretra bulbar (7). A heterogeneidade nas cadeias de GAGs associados a diferentes tipos de proteoglicanos pode providenciar lugares para a interação de fatores de crescimento com componentes da matriz extracelular. De fato, domínios estruturais específicos no heparan sulfato vascular têm demonstrado atividade antiproliferativa para músculo liso (15). As estenoses da uretra masculina, sobretudo as que comprometem o segmento bulbar, se caracterizam por um denso tecido rico em colágeno, pouco vascularizado, e com ausência de músculo liso uretral. Tudo isso está de acordo com as funções de proteoglicanos de heparan sulfato envolvidos em processos de cicatrização e fibrose (16,17).

Table - Relative concentration of glycosaminoglycans (GAGs) in normal and strictured bulbar urethras. Values are expressed as percentage of total GAGs.

	Normal	Stricture	
Hyaluronic acid	40.7 ± 5.0	22.3 ± 4.8	$p < 0.01$
Heparan sulfate	7.2 ± 2.9	8.0 ± 3.1	$p > 0.10$
Dermatan sulfate	26.8 ± 5.2	39.5 ± 3.1	$p < 0.05$
Chondroitin sulfate	25.0 ± 2.8	29.7 ± 4.0	$p > 0.05$

Em virtude da bem conhecida interação dos GAGs com o colágeno e outros componentes da matriz extracelular (18), pode-se inferir que eles têm participação importante nas propriedades de complacência uretral, embora tal fato não tenha sido ainda apropriadamente estudado. Em processos fibróticos ocorre uma diminuição da complacência do tecido (1), que é a principal característica da estenose da uretra. As características da complacência resultantes do processo de cicatrização vão determinar a clínica do paciente e toda a repercussão urodinâmica proximal à estenose (19). Decorina e biglican são pequenos proteoglicanos ricos em dermatan sulfato, enquanto o versican, um proteoglicano de cadeia longa, apresenta grande quantidade de condroitin sulfato (4). Estes dois GAGs, que têm uma distribuição predominantemente intersticial, são os mais comumente encontrados na estenose da uretra bulbar, como evidenciado por nosso estudo. Além disso, a grande diminuição na concentração de ácido hialurônico bem como a de GAGs totais nas amostras com estenose, também podem estar implicadas com a perda da complacência uretral. Logicamente que outros componentes da matriz extracelular, que não foram analisados no presente estudo, também podem estar implicados na característica final da estenose (13,14).

Maiores concentrações de ácido hialurônico são encontradas no início do processo de cicatrização, sendo substituído progressivamente por GAGs sulfatados (5,20). Portanto, as maiores concentrações de GAGs sulfatados e menores de ácido hialurônico na uretra estenosada sugerem que as estenoses analisadas em nosso estudo se encontravam em uma fase mais avançada do processo de cicatrização.

Desde que o controle farmacológico de cicatrizes indesejadas é teoricamente possível, é imperativo que sejam realizados estudos enfocando as alterações moleculares da matriz em resposta à lesão em vários tecidos. Assim, uma vez descrita essas alterações, pode-se conhecer melhor os eventos moleculares que ocorrem durante o processo de reparação especificamente em um determinado tecido, para poder intervir da forma mais apropriada.

Pesquisa financiada por CNPq e FAPERJ

REFERÊNCIAS

1. Peters CA, Freeman MR, Fernandez CA, Shepard J, Wiederschain DG, Moses MA: Dysregulated proteolytic balance as the basis of excess extracellular matrix in fibrotic disease. *Am J Physiol*, 272: 1960-1965, 1997.
2. Raghov R: The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. *FASEB J*, 8: 823-831, 1994.
3. Vogel KG: Glycosaminoglycans and Proteoglycans. In: Yurchenco PD (ed.), *Extracellular Matrix Assembly and Structure*. New York, Academic Press, pp. 243-279, 1994.
4. Iozzo R: Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Ann Rev Biochem*, 67: 609-652, 1998.
5. Oksala O, Salo T, Tammi R, Hakkinen L, Jalkanen M, Inki P, Larjava H: Expression of proteoglycans and hyaluronan during wound healing. *J Histochem Cytochem*, 43: 125-135, 1995.
6. Bentley JP: Rate of chondroitin sulfate formation in wound healing. *Ann Surg*, 165: 186-191, 1967.
7. Da Silva EA, Sampaio FJB, Cardoso LEM: Identification of glycosaminoglycans in the human male urethra. *Braz J Urol*, 26: 426-432, 2000.
8. Cardoso LEM, Erlich RB, Rudge MC, Peraçoli JC, Mourão PAS: A comparative analysis of the glycosaminoglycans from human umbilical arteries in normal subjects and in pathological conditions affecting pregnancy. *Lab Invest*, 67: 588-595, 1992.
9. Taylor KA, Buchanan-Smith JG: A colorimetric method for the quantification of uronic acids and a specific assay for galacturonic acid. *Anal Biochem*, 201: 190-196, 1992.
10. Dietrich CP, Dietrich SMS: Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal Biochem*, 70: 645-647, 1976.
11. Singh M, Scott TM: The ultrastructure of human male urethral stricture. *Br J Urol*, 47: 871-876, 1976.
12. Chambers RM, Baitera B: The anatomy of the urethral stricture. *Br J Urol*, 49: 545-551, 1977.

13. Baskin LS, Constantinescu SC, Howard PS, McAninch JW, Ewalt DE, Duckett JW, Snyder HM, Macarak EJ: Biochemical characterization and quantitation of the collagenous components of urethral stricture tissue. *J Urol*, 150: 642-647, 1993.
14. Morgia G, Saita A, Falsaperla M, Spampinato A, Motta M, Cordaro S: Immunohistochemical and molecular analysis in recurrent urethral stricture. *Urol Res*, 28: 319-322, 2000.
15. Schmidt A, Yoshida K, Buddecke E: The antiproliferative activity of arterial heparan sulfate residues in domains enriched with 2.0 sulfated uronic acid residues. *J Biol Chem*, 267: 19242-19247, 1992.
16. Woods A: Syndecans: transmembrane modulators of adhesion and matrix assembly. *J Clin Invest*, 107: 935-941, 2001.
17. Echtermeyer F, Streit M, Wilcox-Adelman S, Saoncella S, Denhez F, Detmar M, Goetinck PF: Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *J Clin Invest*, 107: R9-R14, 2001.
18. Scott JE: Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. *Biochem J*, 252: 313-323, 1988.
19. Baskin L, Howard PS, Macarak E: Effect of mechanical forces on extracellular matrix synthesis by bovine urethral fibroblasts in vitro. *J Urol*, 150: 637-641, 1993.
20. Burd DAR, Greco RM, Regauer S, Longaker MT, Siebert W, Garg HG: Hyaluronan and wound healing: a new perspective. *Br J Plast Surg*, 44: 579-584, 1991.

Received: June 20, 2001

Accepted: July 25, 2001

Correspondence address:

Dr. E. Aleksandro da Silva
Unidade de Pesquisa Urogenital
Av. 28 de Setembro, 87, fundos, FCM, térreo
20551-030, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
Fax: ++ (55) (21) 587 6121