

DEVELOPMENTAL CHANGES OF GLYCOSAMINOGLYCANS IN THE HUMAN FETAL BLADDER WALL

LUIZ E.M. CARDOSO, CRISTIANA LINS, FRANCISCO J.B. SAMPAIO,
WALDEMAR SILVA COSTA

Unidade de Pesquisa Urogenital, Centro Biomédico, UERJ, Rio de Janeiro, RJ

ABSTRACT

Objectives: Glycosaminoglycans (GAGs) play key roles in the normal physiology and pathology of the bladder. There is little data, however, on GAG composition in the human fetal bladder wall. In the present study we aimed at establishing the composition of GAGs in the bladder wall of human fetuses at different gestational ages.

Methods: Bladder samples consisting of the dome and front wall were obtained from 4 fresh, macroscopically normal human fetuses aged 13 to 32 weeks postconception (WPC). GAGs in delipidated tissue samples were extracted by papain digestion and cetylpyridinium chloride/ethanol precipitation. The concentration of total GAG was assessed by a hexuronic acid assay and expressed as μg hexuronic acid per mg dry tissue, while the proportions of sulfated GAG species were determined by agarose gel electrophoresis.

Results: At 13 WPC bladder GAG concentration is about $2.2 \mu\text{g}/\text{mg}$. It then decreases slowly, and at 32 WPC the value is $1.8 \mu\text{g}/\text{mg}$. Proportions of sulfated GAGs from 13 to 21 WPC are stable, with 40% chondroitin sulfate, 50% dermatan sulfate, and 10% heparan sulfate. At 32 WPC, however, the proportions of chondroitin and dermatan sulfate are 48 and 42%, respectively.

Conclusion: Overall, the extracellular matrix of the vesical wall does not undergo dramatic compositional changes between the 13th and 32nd WPC. Still, the lower GAG concentration and the change in the proportions of GAG species at the 32nd WPC suggest that major developmental modifications in the vesical wall, which certainly bear on the mechanical properties of the bladder, occur by this period.

Key words: bladder, fetus, glycosaminoglycans, development

Braz J Urol, 26: 97-101, 2000

INTRODUÇÃO

Glicosaminoglicanos (GAGs) são heteropolissacarídeos complexos que possuem quantidades diversas de grupamentos carboxila e sulfato. Os GAGs portanto têm alta densidade de grupamentos aniônicos, e in vivo esses polissacarídeos existem sob a forma de glicoconjugados denominados proteoglicanos, cuja parte protéica contém quantidades variáveis de domínios de adesão. Os proteoglicanos têm, dessa forma, grande capacidade de interações específicas com o meio circundante, e suas funções fisiológicas são basicamente decorrentes dessa propriedade. Essas funções incluem principalmente: (1) retenção seletiva de íons e moléculas difusíveis; (2)

organização estrutural da matriz extracelular; (3) regulação da interação célula-matriz extracelular e célula-célula; (4) modulação do efeito de citocinas; e (5) regulação da atividade de proteases (1-3).

Os GAGs desempenham diferentes e importantes funções na fisiologia da bexiga. Em virtude de sua bem conhecida interação com o colágeno e outros componentes da matriz extracelular (4), pode-se inferir que os GAGs têm participação marcante nas propriedades de complacência da parede vesical, embora tal fato não tenha sido ainda apropriadamente investigado. Uma função que vem sendo bem estudada, e que tem implicações clínicas imediatas, é participação dos GAGs na permeabilidade do urotélio. Resultados de diversos trabalhos, utilizando tanto

métodos morfológicos como bioquímicos, têm mostrado que a camada de glicocálix sobre o urotélio é enriquecida em GAGs (5,6). Outros experimentos revelaram que essa camada não apenas impede a difusão de componentes da urina para dentro da parede da bexiga (7), mas também dificulta a aderência de bactérias ao urotélio (8,9). Baseados nessas propriedades, tem-se correlacionado alterações de GAG do urotélio com a cistite intersticial (10,11). É importante notar que essas alterações limitam-se, provavelmente, à composição de GAGs, pois não foram detectadas diferenças morfológicas em relação ao tecido normal (6).

Existem poucos trabalhos sobre a composição de proteoglicanos e GAGs na bexiga de humanos, e estes utilizam apenas tecido de adultos (12,13). Embora alguns estudos tenham sido feitos sobre as alterações com o desenvolvimento do colágeno em humanos (14) e em animais (15,16), dados semelhantes sobre proteoglicanos e GAGs, os quais forneceriam informações funcionais importantes sobre esses componentes, são inexistentes. Essa questão foi abordada no presente trabalho, no qual se investigou a concentração e composição bioquímica de GAGs em bexigas provenientes de fetos humanos de diferentes idades gestacionais.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras consistiram da bexiga de 4 fetos masculinos com idade gestacional variando entre 13 e 32 semanas pós-concepção (SPC), segundo o método de medida do pé mais longo (17). Os fetos estavam macroscopicamente bem preservados e não apresentavam sinais externos de malformações congênitas. Após dissecação, a cúpula e a parede anterior da bexiga foram removidas e imediatamente fixadas em acetona. As amostras foram então delipidadas por meio de duas trocas de 24 horas cada em clorofórmio:metanol (2:1, v/v), e depois secas a 60°C. A parede vesical foi analisada por inteiro, sem se fazer distinção entre urotélio, lâmina própria, e camada muscular.

A extração de GAGs seguiu um protocolo previamente descrito (18). Resumidamente, cerca de 30 a 100mg de tecido delipidado e seco foram incu-

badadas com papaína bicristalizada (Sigma) em tampão acetato 100mM, 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, obteve-se a preparação final de GAGs totais, a qual foi utilizada nas análises subsequentes.

A quantificação de GAGs totais foi feita por meio da dosagem de ácido hexurônico, utilizando o método do carbazol (19), no qual as amostras purificadas de GAG são primeiramente tratadas com H_2SO_4 a 100°C. A concentração de GAG no tecido vesical foi expressa em microgramas de ácido hexurônico por miligrama de tecido delipidado e seco.

A quantidade relativa dos GAGs sulfatados (condroitim sulfato, dermatan sulfato, e heparan sulfato) foi determinada por eletroforese em gel de agarose a 0,5% em tampão 1,3-diaminopropano 50 mM, pH 9,0 (20). Após corrida a 80V, 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 Corp, Maryland, USA). A identificação das bandas na placa de agarose foi feita com base na comparação com a migração de padrões de GAG comerciais (Sigma) e na susceptibilidade à degradação por GAG-liases (18).

RESULTADOS

As amostras de bexiga fetal estudadas indicam que a concentração de GAG total nesse tecido diminui ligeiramente entre a 13ª e a 32ª SPC (Figura-1). Nesse período, a concentração de GAG, expressa como microgramas de ácido hexurônico por miligrama de tecido delipidado e seco, passa de 2.2 a 1.8 em valores médios.

Os GAGs sulfatados majoritários na parede da bexiga fetal, como mostrado pela eletroforese em

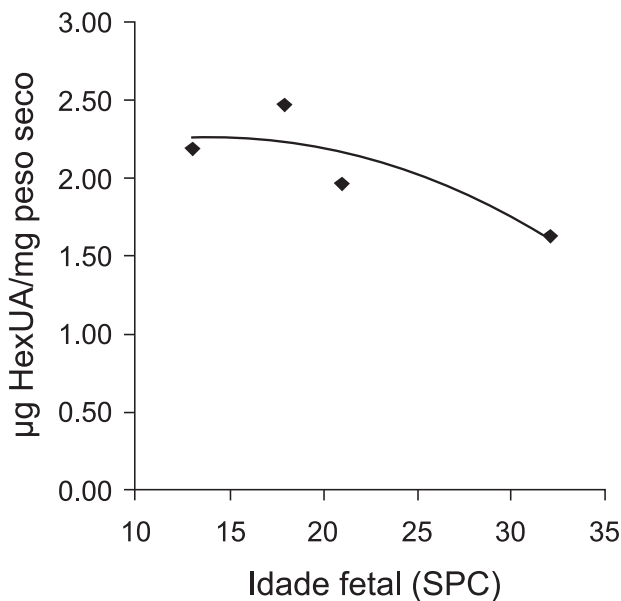


Figura 1 – Concentração de glicosaminoglicanos totais na parede vesical de fetos humanos. As amostras consistiram da cúpula e parte anterior da bexiga, e incluem toda a extensão da parede. A concentração foi determinada pelo método do carbazol e é expressa em microgramas de ácido hexurônico (HexUA) por miligrama de tecido delipidado e seco. A idade gestacional foi calculada pelo método do pé mais longo e é dada em semanas pós-concepção (SPC).

gel de agarose, são o dermatan sulfato e o condroitin sulfato, havendo, além disso, em torno de 10% de heparan sulfato (Figura-2). O conteúdo relativo desse último GAG sofre poucas alterações entre a 13^a e a 32^a SPC. De maneira similar, as proporções dos outros GAGs se mantêm estáveis nas amostras de 13 e 21 SPC, nas quais se observa uma predominância do dermatan sulfato (49-51%) quando comparado ao condroitin sulfato (40-41%). Na amostra de 32 SPC, no entanto, essa relação se inverte, e o conteúdo relativo do condroitin sulfato (48%) passa a ser maior que o do dermatan sulfato (42%).

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que, de uma maneira geral, a composição de GAGs na parede vesical não sofre grandes alterações no período estudado, que se situa entre a 13^a e a 32^a SPC. Nesse mesmo período, estruturas de tecido conjuntivo associadas ao testículo, por exemplo, apre-

sentam modificações muito mais marcantes (observações não publicadas). Por outro lado, nossos resultados indicam que as modificações mais acentuadas na composição de GAGs ocorre mais para o final do período analisado, em torno da 32^a SPC. Nessa idade gestacional, a concentração de GAGs é menor do que em idades mais iniciais, e há uma inversão nas proporções do dermatan e condroitin sulfato. Esses 2 GAGs estão associados principalmente aos proteoglicanos decorina/biglican e versican, respectivamente, os quais têm distribuição predominantemente intersticial (3).

A imunomarcagem de elastina e de colágenos tipo I e III em bexigas normais e não complacentes sugere que a lâmina própria é um componente fundamental para essa propriedade mecânica (21). Como decorina/biglican e versican ocorrem tipicamente na lâmina própria de epitélios, as modificações em concentração e composição de GAGs em fases mais tar-

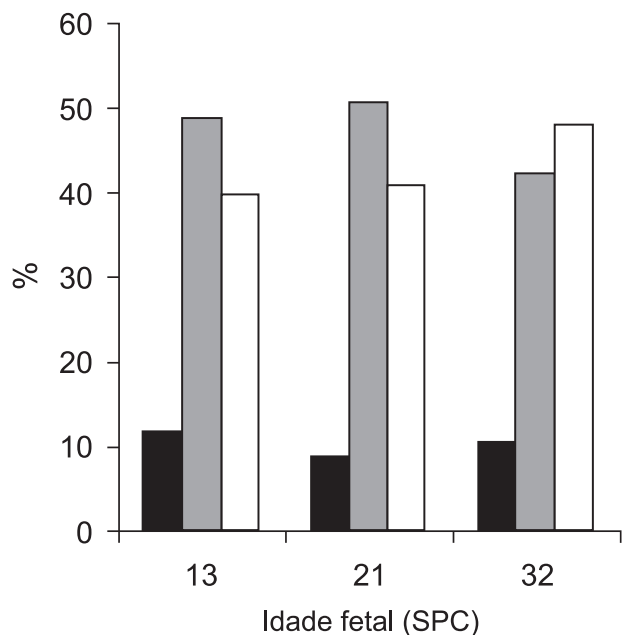


Figura 2 – Concentração relativa dos diferentes tipos de glicosaminoglicanos (GAG) sulfatados na parede vesical de fetos humanos. Após extração e purificação, os GAGs totais foram submetidos a eletroforese em gel de agarose, e as proporções do heparan sulfato (barras cinzas), dermatan sulfato (barras brancas), e condroitin sulfato (barras pretas), expressas como porcentagem do total de GAGs sulfatados, foram determinadas por densitometria das bandas. SPC, semanas pós-concepção.

dias do período fetal, como mostrado por nossos resultados, estão provavelmente relacionadas de maneira estreita com as propriedades de complacência da parede vesical.

Outros estudos utilizando a mesma técnica de imunohistoquímica revelaram que o sindecán-1, um proteoglicano de heparan sulfato, predomina no urotélio (22). Dessa forma, a ausência de variação na concentração relativa do heparan sulfato, no período fetal estudado, sugere que a camada de GAGs do urotélio está presente desde idades gestacionais iniciais.

Pesquisa financiada por CNPq e FAPERJ

REFERÊNCIAS

1. Wight TN, Hascall V: Proteoglycans. Structure and Function. In Hay ED (ed.): Cell Biology of Extracellular Matrix. 2nd ed. New York, Plenum Press, pp. 45-78, 1991.
2. Vogel KG: Glycosaminoglycans and Proteoglycans. In: Yurchenco PD (ed.): Extracellular Matrix Assembly and Structure. New York, Academic Press, pp. 243-279, 1994.
3. Iozzo R: Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Ann Rev Biochem*, 67: 609-652, 1998.
4. Scott, JE: Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. *Biochem J*, 252: 313-323, 1988.
5. Grist M, Chakraborty J: Identification of a mucin layer in the urinary bladder. *Urology*, 44: 26-33, 1993.
6. Nickel JC, Emerson L, Cornish J: The bladder mucus (glycosaminoglycan) layer in interstitial cystitis. *J Urol*, 149: 716-718, 1993.
7. Bodenstab W, Kaufman J, Parsons CL: Inactivation of antiadherence effect of bladder surface glycosaminoglycan by a complete urinary carcinogen (N-methyl-N-nitrosourea). *J Urol*, 129: 200-201, 1983.
8. Parsons CL, Stauffer C, Schmidt JD: Bladder surface glycosaminoglycans: an efficient mechanism of environmental adaptation. *Science*, 208: 605-607, 1980.
9. Ruggieri MR, Levin RM, Hanno PM, Witkowski BA, Gill HS, Steinhardt GF: Defective antiadherence activity of bladder extracts from patients with recurrent urinary tract infection. *J Urol*, 140: 157-160, 1988.
10. Hurst RE, Roy JB, Min KW, Veltri RW, Marley G, Patton K, Shackelford DL, Stein P, Parsons CL: A deficit of chondroitin sulfate proteoglycans on the bladder uroepithelium in interstitial cystitis. *Urology*, 48: 817-821, 1996.
11. Morales A, Emerson L, Nickel JC: Intravesical hyaluronic acid in the treatment of refractory interstitial cystitis. *Urology*, 49: 111-113, 1997.
12. Hurst RE, Zebrowski R: Identification of proteoglycans present at high density on bovine and human bladder luminal surface. *J Urol*, 152: 1641-1644, 1994.
13. De Klerk DP: The glycosaminoglycans of human bladder cancers of varying grade and stage. *J Urol*, 134: 978-981, 1985.
14. Kim KM, Kogan BA, Massad, CA, Huang Y-C: Collagen and elastin in the normal fetal bladder. *J Urol*, 146: 524-527, 1991.
15. Koo HP, Howard PS, Chang SL, Snyder HM, Duckett JW, Macarak EJ: Developmental expression of interstitial collagen genes in fetal bladders. *J Urol*, 158: 954-961, 1997.
16. Yao LY, Tekgul S, Kim KK, Li H, Mitchell ME, Carr MC: Developmental regulation of collagen differential expression in the rabbit bladder. *J Urol*, 156: 565-570, 1996.
17. Streeter GL: Weight, sitting height, head size, foot length and menstrual age of the human embryo. *Contr Embryol Carnegie Inst*, 11: 143-170, 1920.
18. 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.
19. Taylor KA, Buchanan-Smith JG: A colorimetric method for the quantitation of uronic acids and a specific assay for galacturonic acid. *Anal Biochem*, 201: 190-196, 1992.

20. Dietrich CP, Dietrich SMS: Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in di-amine buffers. *Anal Biochem*, 70: 645-647, 1976.
21. Ewalt DH, Howard PS, Blyth B, Snyder HM, Duckett JW, Levin RM, Macarak EJ: Is lamina propria matrix responsible for normal bladder compliance? *J Urol* 148: 544-549, 1992.
22. Buckley MS, Washington S, Laurent C, Erickson DR, Bhavanandan VP: Characterization and immunohistochemical localization of the glycoconjugates of the rabbit bladder mucosa. *Arch Biochem Biophys*, 330: 163-173, 1996.

Received: January 10, 2000
Accepted: February 10, 2000

RESUMO

COMPOSIÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA PAREDE VESICAL EM FETOS HUMANOS

Objetivos: Os glicosaminoglicanos (GAGs) desempenham papel fundamental na fisiologia normal e patológica da bexiga. Existem poucos dados, entretanto, sobre a composição de GAGs na parede da bexiga fetal de humanos. O presente estudo teve por objetivo estabelecer a composição de GAGs na parede vesical de fetos humanos de diferentes idades gestacionais.

Métodos: As amostras consistiram da cúpula e parede anterior de bexigas de 4 fetos macroscopicamente normais e com idade entre 13 e 32 semanas pós-concepção (SPC). Os GAGs em amostras delipidadas de tecido foram extraídos por digestão com papaína e precipitação com cloreto de cetilpiridínio/etanol. A concentração de GAG total foi determinada pela dosagem de ácido hexurônico, e foi expressa como μg de ácido hexurônico por mg de tecido seco, enquanto que as proporções de GAGs sulfatados foram determinadas por eletroforese em gel de agarose.

Resultados: Com 13 SPC a concentração de GAG na bexiga é de $2.2 \mu\text{g}/\text{mg}$. Esse valor então decresce lentamente, e com 32 SPC é de $1,8 \mu\text{g}/\text{mg}$. As proporções dos GAGs da 13^a à 21^a SPC são estáveis, com 40% de condroitin sulfato, 50% de dermatan sulfato, e 10% de heparan sulfato. Com 32 SPC, entretanto, as proporções são 48 e 42%, respectivamente.

Conclusões: A matriz extracelular da parede vesical não sofre grandes mudanças de composição entre a 13^a e a 21^a SPC. No entanto, a concentração de GAG mais baixa, e a alteração nas proporções dos GAG na 32^a SPC sugerem que modificações importantes na parede vesical com o desenvolvimento, que certamente se relacionam com as propriedades mecânicas da bexiga, ocorrem nesse período.

Unitermos: bexiga, feto, glicosaminoglicanos, matriz extracelular
Braz J Urol, 26: 97-101, 2000

Correspondence adress:

Luiz E.M. Cardoso
 Unidade de Pesquisa Urogenital
 Caixa Postal No 46.503
 Rio de Janeiro, RJ, 20562-970
 Fax: (21) 587-6121