



GLICOSAMINOGLICANOS PRESENTES EM LÍQUIDOS PLEURAIIS: UM PARÂMETRO BIOQUÍMICO ADICIONAL NA DETERMINAÇÃO DAS CAUSAS DOS DERRAMES PLEURAIIS



Elizabeth M M Albuquerque¹; Ana K M Cruz¹; Vanessa O Santos¹; Fernanda H A P Fortes¹; João F Sousa Filho¹; Paulo R Albuquerque²; *Fernanda W Oliveira¹.

¹Departamento de Bioquímica, UFRN, Av. Sen. Salgado Filho, 3000, Lagoa Nova, Natal, RN, Brasil;

²Hospital Onofre Lopes, CCS, UFRN, Natal, RN, Brasil; elizabethmma@bol.com.br

Glycosaminoglycans Presents in Pleural Liquids: an Additional Biochemical Parameter in the Determination of Causes of Pleural Effusions.

Even though several biochemical, microbiological and cytological methods are used for pleural effusion diagnosis, they have limited efficiency. Thus we analysed the glycosaminoglycans (GAG) in pleural liquids (PL) and assess their potential in the discrimination of pleural effusions. Transudate pleural liquid (TPL) and exudate pleural liquid (EPL) originated from lung cancer (LC), tuberculosis (TB) and systemic lupus erythematosus (SLE) were collected. GAG were extracted and analysed. TPL and EPL was found hyaluronic acid (HA) with different electrophoretic mobilities, besides chondroitin sulfate (CS) and dermatan sulfate (DS) respectively. TPL possesses 7,5 mg/l of GAG, while EPL presented 1,5 mg/l. In LC, TB, SLE1 and SLE2 also were found HA, CS and DS in different proportions and varied electrophoretic migration profile. Type, concentration and structural differences showed by GAG in TPL, EPL and EPL from different pathologies might be used as one additional biochemical parameter to evaluate the cause of pleural effusions.

Introdução

Derrames pleurais são originados a partir do acúmulo de líquido na cavidade pleural, e podem ser classificados em transudato ou exsudato¹. Os transudatos são resultantes de patologias (como insuficiência cardíaca congestiva) que causam alterações durante a formação (aumento na pressão hidrostática) ou absorção (diminuição na pressão coloidosmótica) do líquido pleural². Por outro lado, um derrame exsudativo é resultante de inflamação ou uma outra doença da superfície pleural, como acontece em tuberculose, pneumonia, malignidade, pancreatite ou lúpus eritematoso sistêmico². Os derrames pleurais, por tanto, podem envolver uma certa variedade de doenças sistêmicas e pleuropulmonares³, o que dificulta o diagnóstico diferencial destes derrames. Um dos mais comuns problemas encontrado pelos pneumologistas tem sido a elucidação da causa dos derrames pleurais, tendo em vista que a patologia causadora pode ser grave e requerer tratamento precoce⁴. Muitos procedimentos tais como raio-X do tórax, biópsia, análise de parâmetros bioquímicos, microbiológicos e citológicos das efusões têm

sido utilizados para a resolução deste dilema diagnóstico³⁻⁴. Entretanto, em muitos casos tais parâmetros apresentam eficiência limitada⁵, contribuindo para uma elevada incidência de diagnósticos indeterminados⁴. Deste modo, o objetivo deste estudo foi verificar a presença de glicosaminoglicanos em líquidos pleurais e avaliar sua importância como parâmetro bioquímico útil à diferenciação entre derrames pleurais transudativos e exsudativos, assim como entre exsudatos originados a partir de diferentes patologias.

Experimento

Líquidos pleurais

Uma amostra de líquido pleural transudato (LpT) e cinco amostras de líquidos pleurais exsudatos (LpE) originados de câncer de pulmão (CP), tuberculose (TB) e lúpus eritematoso sistêmico (LES) foram coletadas por toracocentese e utilizadas em nossos experimentos.

Extração dos Glicosaminoglicanos

A extração dos glicosaminoglicanos das amostras de líquidos pleurais foi realizada com modificações de um método descrito para tecidos⁶. Deste modo, as diferentes amostras de líquidos pleurais foram submetidas a proteólise com maxatase (1mg/ml, a 60° C, “overnight”), seguida de tratamento com ácido tricloro acético (TCA) 8,2 % e etanol absoluto ou 95 % (a -20° C, “overnight”)⁷. Ao término dos procedimentos de extração, as amostras de glicosaminoglicanos (GAG) foram, então, dialisadas, liofilizadas e ressuspensas em água destilada.

Tratamento com liases

Para verificação específica da presença de ácido hialurônico, condroitim sulfato e dermatam sulfato nas amostras de líquidos pleurais, os glicosaminoglicanos (GAG) extraídos foram incubados, respectivamente, com as enzimas: hialuronato liase (Sigma), extraída de *Streptomyces hyalurolyticus*⁸; condroitim AC liase (Sigma), extraída de *Arthrobacter aurescens*⁹⁻¹⁰; condroitim ABC liase (Sigma) extraída de *Proteus vulgaris*⁹.

Eletroforese em gel de agarose

A identificação dos glicosaminoglicanos, após o tratamento das amostras de GAG com as liases citadas, foi realizada através de microeletroforese em gel de agarose¹¹. As amostras de glicosaminoglicanos foram aplicadas em lâminas de gel de agarose (Bio Rad) 0,55%, utilizando o tampão 1,3-diaminopropano acetato (PDA) 0,05 M e pH 9,0. A eletroforese ocorreu sob uma diferença de potencial de 100 volts, em caixa refrigerada a 4°C. Na seqüência, o gel foi imerso em cetavlon (CTV) 0,1%, seco e corado com azul de toluidina 0,1% em ácido acético 1% e etanol 50%.

Dosagem de ácidos urônicos

Os conteúdos de ácido urônico e de glicosaminoglicanos das amostras extraídas dos líquidos pleurais foram estimados pela reação do carbazol¹². Para tal procedimento, utilizamos ácido D-glucurônico (ácido urônico padrão), ácido sulfúrico, carbazol 0,1% em etanol e água destilada. As leituras no espectrofotômetro foram realizadas a 525 nm.

Densitometria das lâminas de eletroforese

A proporção entre os diferentes glicosaminoglicanos que compõem cada uma das amostras extraídas dos líquidos pleurais foi determinada por densitometria das lâminas eletroforéticas a 525 nm, utilizando padrões de glicosaminoglicanos comparativamente.

Cromatografia descendente em papel

A cromatografia descendente em papel¹³ foi utilizada para a análise dos produtos de digestão das liases. Tal método foi realizado em papel Whatman n° 1 e solvente ácido isobutírico : 1,25N hidróxido de amônio (5:3). Para revelação, foi usado nitrato de prata.

Resultados e Discussões

A eletroforese dos glicosaminoglicanos extraídos dos líquidos pleurais transudato (LpT) e exsudato (LpE) mostrou a presença de dois compostos em cada um destes líquidos (figura 1). Em ambas as amostras, o componente de migração inferior e polidispersa aparentou ser ácido hialurônico, embora este composto tenha apresentado diferentes mobilidades eletroforéticas nestas amostras; o componente superior, por sua vez, teve migração intermediária entre condroitim sulfato e dermatam sulfato. Após incubação com hialuronidase, ficou comprovada a presença de ácido hialurônico (AH) tanto no LpT quanto no LpE, tendo em vista que o composto de migração inferior foi degradado pela referida enzima, não aparecendo na lâmina eletroforética. Por outro lado, a incubação com as liases chondroitinase AC e chondroitinase ABC revelou que o composto de migração superior é dermatam sulfato (DS) em LpT e condroitim sulfato (CS) em LpE; (figura 1).

O líquido pleural transudato possui concentração de glicosaminoglicanos igual a 7,5 mg/l, sendo 89,17% de AH e 10,83% de DS; (tabela I). No líquido pleural exsudato a concentração de glicosaminoglicanos observada foi 1,5 mg/l, sendo 86,84% de AH e 13,16% de CS; (tabela I). A cromatografia descendente em papel, por sua vez, mostrou que os produtos de degradação enzimática dos glicosaminoglicanos de LpT e LpE são semelhantes aos produtos de degradação dos glicosaminoglicanos padrões (figura 2). Entretanto, a presença de monossacarídeo na amostra de glicosaminoglicanos de LpE não

incubada com liase (controle) sugere maior catabolismo destes compostos em tal amostra (figura 2- B), sendo este aspecto uma importante diferença a ser considerada.

Nos líquidos pleurais exsudatos originados a partir de câncer de pulmão (CP), tuberculose (TB) e lúpus eritematoso sistêmico (LES1 e LES2), foram encontrados ácido hialurônico (AH), condroitim sulfato (CS) e dermatam sulfato (DS), os quais apresentaram variados padrões de migração eletroforética; (figura 3). As concentrações totais de glicosaminoglicanos são mostradas na tabela II, ficando evidente as diferentes proporções entre as amostras (CP, TB, LES1 e LES2).

Tabela I – Quantificação dos GAG nos líquidos pleurais transudato e exsudato

Amostra	Concentração de GAG (µg/ml)	AH (%)	CS (%)	DS (%)
LpT	7,5	89,17	0	10,83
LpE	1,5	86,84	13,16	0

Figura 1 – Eletroforese dos glicosaminoglicanos isolados dos líquidos pleurais transudato e exsudato. A- LpT. B- LpE. M- mistura de

glicosaminoglicanos padrões (CS- condroitim sulfato, DS- dermatam sulfato, HS- heparam sulfato). AH- ácido hialurônico padrão. ABC- chondroitinase ABC. AC- chondroitinase AC. hya- hialuronidase.

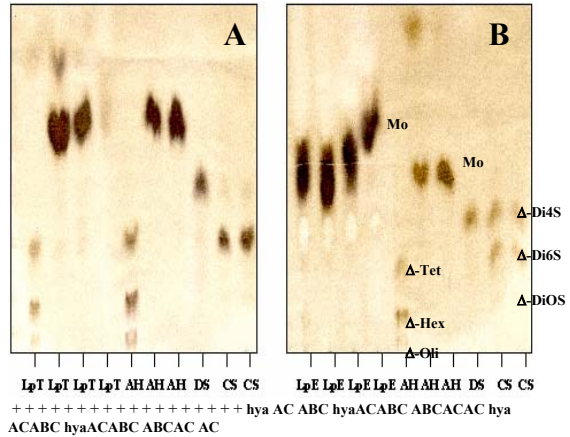


Figura 2 – Cromatografia descendente em papel dos produtos de digestão enzimática dos glicosaminoglicanos isolados dos líquidos pleurais transudato e exsudato. A- LpT. B- LpE. CS- condroitim sulfato, DS- dermatam sulfato, AH- ácido hialurônico padrão. ABC- chondroitinase ABC. AC- chondroitinase AC. hya- hialuronidase. ΔDi-4S- Δ4, 5-dissacarídeo insaturado 4-sulfato; ΔDi-6S- Δ4, 5-dissacarídeo insaturado 6-sulfato; ΔDi-OS- Δ4, 5-dissacarídeo insaturado; Δ-Hex- Δ-hexassacarídeo insaturado; Δ-Tet- Δ-tetrassacarídeo; Δ-Oli- Δ- oligossacarídeo insaturado; Mo- monossacarídeo.

Tabela II – Concentração de GAG nos exsudatos originados por diferentes patologias

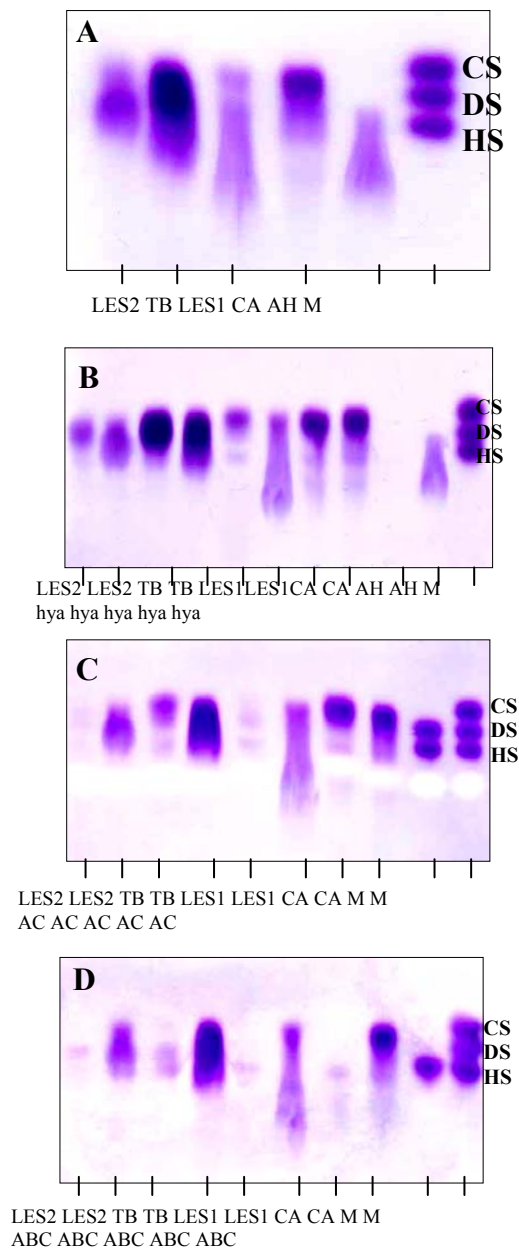
Amostra	Concentração de GAG (µg/ml)
CP	8,34
TB	32,19
LES1	8,88
LES2	24,54

Tendo em vista que a maioria das publicações sobre o assunto recorrem apenas à presença do

ácido hialurônico em derrames pleurais exsudativos, citando este glicosaminoglicano como um marcador bioquímico de mesotelioma pleural¹⁴⁻¹⁸, a presença de outros glicosaminoglicanos, tanto em transudatos como em exsudatos, consiste em uma novidade interessante; sendo estes dados importantes para diferenciar os vários tipos de derrames pleurais. Tais resultados foram possibilitados provavelmente devido à utilização de uma metodologia mais sensível e específica; a qual permitiu, também, detectar variações nos padrões de migração eletroforética entre GAG de diferentes amostras. Por outro lado, o estudo dos glicosaminoglicanos em líquidos pleurais de patologias como tuberculose, câncer de pulmão,

e lúpus eritematoso não tem sido relatado até então, podendo as diferenças observadas serem relevantes para a separação diagnóstica destas patologias.

Figura 3 – Eletroforese dos glicosaminoglicanos isolados dos exsudatos resultantes de câncer de pulmão, tuberculose e lúpus eritematoso sistêmico. A- glicosaminoglicanos (GAG) não incubados com liases. B- GAG tratados com hialuronidase. C- GAG tratados com chondroitinase AC. D- GAG tratados com chondroitinase ABC. M- mistura de glicosaminoglicanos padrões (CS- condroitim sulfato, DS- dermatam sulfato, HS- heparam sulfato). AH- ácido hialurônico padrão. CA- câncer de pulmão. LES1 e 2 – lúpus eritematoso sistêmico.



Conclusões

As diferenças detectadas neste trabalho, com relação ao tipo, estrutura e concentração dos glicosaminoglicanos nos líquidos pleurais transudativo e exsudativo, bem como nos diferentes exsudatos analisados, poderão ser usadas como um parâmetro a mais na elucidação diagnóstica dos derrames pleurais. O estabelecimento de um parâmetro adicional, neste caso, se faz importante diante da alta incidência de diagnósticos indeterminados das causas dos derrames pleurais.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à professora Dr^a Fernanda Wanderley de Oliveira, ao professor Dr. Paulo Roberto de Albuquerque e a todos que fazem parte do Laboratório de Glicobiologia Animal (Departamento de Bioquímica – UFRN)

Suporte financeiro- CNPq e CAPES

Referências Bibliográficas

1. R. W. Light, **Pleural Diseases**, Lea & Febiger, Philadelphia, 1982.
2. R. W. Light; M. I. Macgregor; P. C. Luchsinger; W. C. Ball. **Ann International Medical**. 1972, 77, 507-513.
3. S. Atagi; M. Ogawara; M. Kawahara; M. Sakatani; K. Furuse; E. Ueda; S. Yamamoto.

- Journal Japanese Clinical Oncology.** 1997, 5, 293-297.
4. D. D. Storey; D. E. Dines; D. T. Coles. **JAMA.** 1976, 236, 2183-2186.
 5. I. A. P. Prats; P. P. Alfonso; J. C. R. Vázquez; C. G. Nuño. **Rev. Cubana Med.** 1998, 37(2), 93-99.
 6. C. P. Dietrich; L. O. Sampaio; O. M. S. Toledo; C. M. F. Cassaro. **Biochemistry Biophysical Research Communication.** 1976, 75, 329-336.
 7. M. D. Nogueira, Tese de Mestrado, UNIFESP, 1998.
 8. T. Ohya; Y. Kaneko. **Biochimica Biophysical Acta.** 1970, 198(3): 607-609.
 9. T. Yagamata; H. Saito; O. Habuchi; S. Suzuki. **Journal Biological Chemistry.** 1968, 243, 1523-1535.
 10. K. Hiyama; S. Okada. **Journal Biological Chemistry.** 1975, 250, 1824-1828.
 11. C. P. Dietrich; S. M. C. Dietrich. **Anal Biochem.** 1976, 70, 645-647.
 12. Z. Dische. **Journal Biological Chemistry.** 1947, 167, 189.
 13. W. E. Trevelyan; D. P. Procter; J. S. Harrison. **Nature.** 1950, 166, 444-445.
 14. J. Roboz; J. Greaves; D. Silides; A. P. Chahinian; J. F. Holland. **Cancer Research.** 1985, 45, 1850-1854.
 15. A. Boersma; P. Degand; G. Biserte. **Bull. Eur. Physiopathol. Respir.** 1980, 16, 41-45.
 16. C. Friman; P. E. Hellstrom; M. Juvani; H. Riska. **Clinical Chimica Acta.** 1977, 76, 357-361.
 17. R. V. Iozzo; J. A. Goldes; W. Chen; T. N. Wight. **Cancer.** 1981, 48, 89-97.
 18. N. A. M. Cobben; M. Drent; M. P. V. Dieijen-visser; P. G. H. Mulder; E. F. M. Wouters; R. F. Henderson. **Clinical Biochemistry.** 1999, 32, 653-656.