

IDENTIFICATION OF GLYCOSAMINOGLYCANS IN THE HUMAN MALE URETHRA

E. ALEXSANDRO DA SILVA, FRANCISCO J.B. SAMPAIO, LUIZ E.M. CARDOSO

Urogenital Research Unit, Biomedical Center, UERJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ABSTRACT

Purpose: Glycosaminoglycans (GAGs) are components of the extracellular matrix and play key roles in the normal physiology and pathology of several tissues. There is no data, however, on GAG composition in the human urethra. Here we aimed at establishing the composition of GAGs in the urethra of young men.

Material and Methods: Male urethra samples were obtained from 7 fresh, macroscopically normal cadavers aged 16 to 38 years (mean age: 26 years). The urethra was divided into segments (glanular, penile, bulbous and membranous), which were then analyzed separately. GAGs in delipidated, dry 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 mg hexuronic acid per mg dry tissue, while the proportions of sulfated GAGs were determined by agarose gel electrophoresis.

Results: Total GAG concentration was significantly heterogeneous ($p < 0.02$) along the male urethra, and the mean values for the glanular, penile, bulbous and membranous segments were 2.406 ± 0.5627 , 2.029 ± 0.6273 , 1.272 ± 0.5008 and 1.707 ± 0.3021 , respectively. The mean total GAG concentration is different ($p < 0.05$) between the bulbous and either the glanular or penile segments. The most predominant sulfated GAG in the male urethra is dermatan sulfate followed by chondroitin sulfate and heparan sulfate (HS). The HS relative concentration varied among urethral segments ($p < 0.01$) and was highest (13.8% of total sulfated GAGs) in the bulbous portion.

Conclusion: The concentration and composition of GAGs varies significantly along the human male urethra. This heterogeneity implies functional adaptations in the various segments and may affect the incidence and localization of urethral diseases.

Key words: urethra, male, glycosaminoglycans, proteoglycans, extracellular matrix

Braz J Urol, 26: 426-432, 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 fun-

ções 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 das citocinas; 5. regulação da atividade de proteases (1-3).

A uretra masculina humana, sobretudo os segmentos que estão envolvidos pelo corpo esponjoso, tem uma quantidade significativa de colágeno (4). Em virtude da bem conhecida interação dos GAGs com o colágeno e outros componentes da matriz extracelular (5), pode-se inferir que eles têm participação importante nas propriedades de complacência

uretral, embora tal fato não tenha sido ainda apropriadamente estudado. Em processos patológicos decorrentes de falha de reparação da funcionalidade completa do tecido lesado, isto provavelmente devido a um *turnover* inadequado do novo colágeno depositado na matriz, ocorre uma alteração da complacência uretral (6). A cicatrização é um fenômeno que envolve principalmente a matriz extracelular e uma série de moléculas (citocinas), algumas ainda não completamente elucidadas. A uretra, por ser alvo de diversas formas de traumatismos e enfermidades inflamatórias, é afetada por lesões decorrentes de um processo cicatricial inadequado. Por se tratar de um órgão de condução similar, mas não igual, a um tubo elástico, e sujeita a grandes variações de pressão intraluminal, a implicação clínica se faz evidente nas estenoses uretrais. As características da complacência resultantes do processo de cicatrização vão determinar a clínica do paciente e toda a repercussão urodinâmica proximal à estenose.

Outra aplicação importante da análise dos GAGs na uretra masculina, diz respeito às anomalias congênitas. Nestas situações, por inúmeros fatores, ocorre uma interação inadequada epitélio-mesênquima durante a embriogênese. Sabe-se que o ácido hialurônico, um GAG não-sulfatado, tem valores aumentados nos tecidos em desenvolvimento e pode ter influência na embriogênese e na cicatrização da uretra masculina (7).

Devido ao que foi comentado anteriormente, isso faz com que seja relevante o estudo da determinação das estruturas normais da matriz extracelular da uretra masculina humana, sendo os GAGs um componente que ainda não foi investigado. No presente trabalho determinamos a concentração e composição bioquímica de GAGs em uretras masculinas humanas de adultos jovens.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras foram extraídas de autópsias, após autorização do Comitê Local de Ética Médica, de 7 pacientes com idade variando entre 16 e 38 anos (idade média de 26 anos). Todos os pacientes morreram de causa violenta e não apresentavam sinais externos de enfermidade ou malformações congênitas.

A extração das amostras primeiramente consistiu na retirada em bloco da bexiga, próstata e pênis, sendo necessário a exérese de um pequeno fragmento de púbis, deixando intacta a pele do pênis para preservar o aspecto genital externo. Nenhum paciente tinha sido circuncisado previamente. O bloco foi congelado a -20°C e 24-48 horas depois foi descongelado para dissecação. O tempo aproximado decorrido entre a morte e o congelamento do bloco variou entre 4 e 10 horas. A dissecação da uretra consistiu na separação de todo corpo esponjoso, continuando com a uretra membranosa até o ápice prostático. Foram retiradas todas as fâscias aderentes de conjuntivo. As amostras de uretra foram divididas nos seguintes segmentos para análise: glandar - incluiu toda a glândula, limitada pelo sulco coronal; peniana - de 1.5 cm do sulco coronal até 1.5 cm distal do ângulo mediano de inserção uretral do músculo bulbo-esponjoso; bulbar - de 1.5 cm proximal do ângulo mediano de inserção do músculo bulbo-esponjoso até o início da uretra membranosa; membranosa - o segmento envolvido pelo diafragma urogenital, seccionado no ápice prostático. Em um caso não foi possível a extração da uretra membranosa por dificuldade técnica. Os segmentos de uretra foram lavados em soro fisiológico para eliminar o sangue do tecido esponjoso e secreções intraluminares das glândulas uretrais. As amostras foram então imediatamente fixadas em acetona e clivadas em fragmentos de aproximadamente 3x3 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 incubadas em papaína bi-cristalizada (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*, obteve-se a

preparação final de GAGs totais, a qual foi utilizada nas análises subsequentes.

A quantificação do total de GAGs foi feita por meio da dosagem de ácido hexurônico, utilizando o método do carbazol (9), no qual as amostras purificadas de GAG são primeiramente tratadas com ácido sulfúrico a 100°C. A concentração de GAG 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%, 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, St. Louis, USA).

Para avaliar a significância estatística dos dados obtidos foi usado o teste de Kruskal-Wallis para a análise de variância da concentração dos GAGs totais e dos sulfatados em toda a uretra. Também foi usado o método GT2 (modificação de Gabriel) para a comparação múltipla das médias da concentração de GAGs totais e dos sulfatados em função do segmento anatômico (11). Os dados são apresentados como médias \pm desvio padrão.

Tabela 1 – Comparação múltipla das médias da concentração de glicosaminoglicanos totais em diversas regiões da uretra masculina pelo método GT2 (modificação de Gabriel).

Região (*)	N	Média (**)	Intervalo de Comparação (***)	
			Limite Inferior	Limite Superior
Bulbar	7	1.272	0.896	1.647
Membranosa	6	1.707	1.301	2.112
Peniana	7	2.029	1.654	2.405
Glandar	7	2.406	2.030	2.781

(*) As regiões uretrais estão ordenadas por magnitude de média.

(**) Valores em microgramas de ácido hexurônico por miligrama de tecido seco e delipidado.

(***) Duas médias são significativamente diferentes ($p < 0.05$) se seus intervalos de comparação não se sobrepõem.

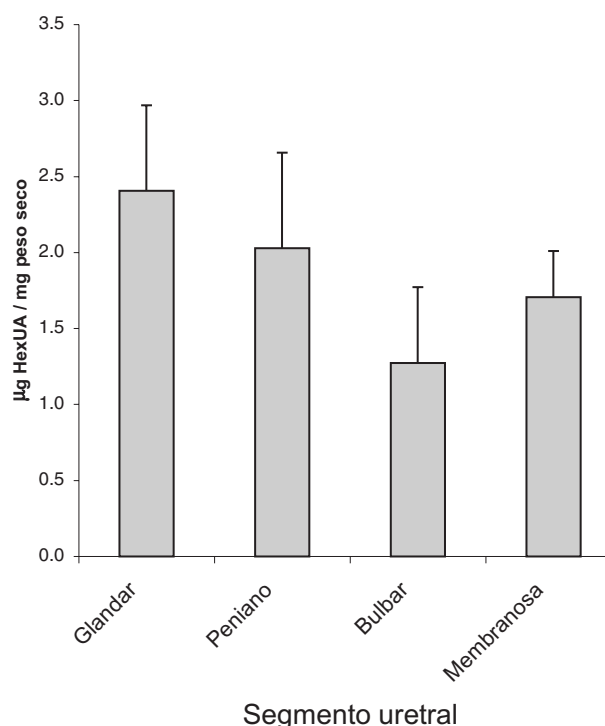


Figura 1 - Concentração de glicosaminoglicanos totais na uretra masculina humana de adultos jovens. A concentração de GAG na uretra foi expressa em microgramas de ácido hexurônico por miligrama de tecido delipidado e seco.

RESULTADOS

A concentração de GAGs totais variou significativamente ($p < 0.02$) entre as diversas regiões da uretra masculina humana (Figura-1). O valor médio do total de GAGs, expresso em microgramas de ácido hexurônico por miligrama de tecido seco, pre-

sente nos segmentos de uretra glandar, peniana, bulbar e membranosa foram 2.406 ± 0.5627 , 2.029 ± 0.6273 , 1.272 ± 0.5008 , e 1.707 ± 0.3021 , respectivamente.

O segmento bulbar da uretra humana apresentou a média da concentração de GAGs totais significativamente diferente ($p < 0.05$) das médias obtidas pelos segmentos glandar e peniano (Tabela-1). Entre os demais segmentos a diferença não foi estatisticamente significativa.

Os GAGs sulfatados que predominam na uretra masculina humana de adultos jovens, como evidenciados pela eletroforese em gel de agarose, são o dermatan sulfato (DS) e o condroitin sulfato (CS),

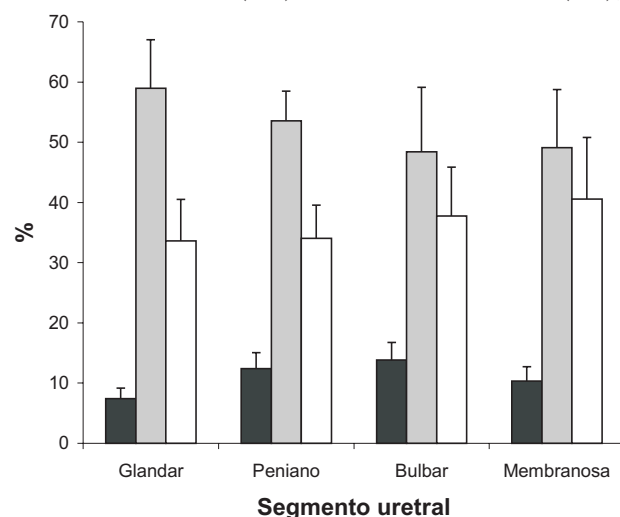


Figura 2 - Concentração relativa dos diferentes tipos de glicosaminoglicanos (GAGs) sulfatados presentes nos segmentos da uretra masculina humana.

Barra preta - heparan sulfato; barra cinza - dermatan sulfato; barra branca - condroitin sulfato.

havendo, além desses, uma concentração menor de heparan sulfato (HS) (Figura-2). A distribuição da concentração de DS e CS nos diversos segmentos da uretra é uniforme, o que não ocorre com o HS, que tem uma distribuição heterogênea ($p < 0.01$). A média da concentração relativa de HS em relação com o total de GAGs sulfatados nos segmentos das uretras analisadas são: glandar, $7.4\% \pm 1.7526$; peniana $12.4\% \pm 2.6848$; bulbar $13.8\% \pm 2.9265$; membranosa $10.3\% \pm 2.3904$.

O segmento glandar da uretra humana apresentou uma concentração relativa de HS significativamente diferente ($p < 0.05$) das médias obtidas para os segmentos peniano e bulbar (Tabela-2). Entre os demais segmentos a diferença não foi estatisticamente significativa.

DISCUSSÃO

A uretra masculina humana apresenta especializações estruturais e funcionais sem correspondentes entre os demais mamíferos (12). Isso faz com que não exista um animal ideal para estudos experimentais da uretra masculina comparável ao homem. Sendo assim, ainda que seja um material difícil de se obter, é extremamente importante que seja utilizado a uretra humana normal para se poder determinar sua estrutura molecular e assim comparar com suas patologias. Nós usamos para a extração e análise de GAGs 7 uretras masculinas humanas, frescas e normais, de indivíduos adultos jovens, consistindo portanto de uma amostra significativa e homogênea.

Tabela 2 – Comparação múltipla das médias para o conteúdo relativo de heparan sulfato em diversas regiões da uretra masculina pelo método GT2 (modificação de Gabriel).

Região (*)	N	Média (**)	Intervalo de Comparação (***)	
			Limite Inferior	Limite Superior
Glandar	7	7.401	5.498	9.305
Membranosa	6	10.337	8.281	12.393
Peniana	7	12.389	10.485	14.292
Bulbar	7	13.830	11.927	15.733

(*) As regiões uretrais estão ordenadas por magnitude de média.

(**) Valores percentuais com relação ao total de glicosaminoglicanos sulfatados.

(***) Duas médias são significativamente diferentes ($p < 0.05$) se seus intervalos de comparação não se sobrepõem sulfato é significativamente ($p < 0.01$) heterogênea.

A uretra masculina humana é composta estruturalmente de um epitélio, que varia de acordo com o segmento uretral, apoiado em uma membrana basal. Abaixo da membrana basal existe um tecido conjuntivo contendo sinusóides vasculares (exceto a uretra membranosa) e células de músculo liso. Este tecido conjuntivo inclui também fibroblastos, e uma grande quantidade de matriz extracelular que contém, além de colágeno e fibras elásticas, proteoglicanos. Toda a uretra está revestida por uma camada adventícia. Além disso, a uretra masculina humana apresenta glândulas mucosas distribuídas principalmente no segmento bulbar e glandar, estando ausentes na membranosa (13). Essa peculiar estrutura da uretra esponjosa, com os sinusóides revestidos por células endoteliais, sugere que ela tenha uma origem vascular (4). Ainda existem outras diferenças estruturais entre os diversos segmentos da uretra masculina humana. A uretra glandar apresenta uma continuidade do epitélio escamoso queratinizado que cobre toda a glândula, além de conter uma grande quantidade de tecido esponjoso. A uretra peniana proporcionalmente contém menos tecido esponjoso e mais urotélio. A uretra bulbar, que tem uma grande capacidade de distensão da sua luz, possui pequenas artérias que se abrem numa grande quantidade de tecido esponjoso, pouco epitélio, e uma adventícia de espessura variável. A uretra membranosa consiste fundamentalmente de epitélio transicional e uma espessa camada de fibras musculares lisas envoltas por uma adventícia que se comunica com as fâscias da musculatura do diafragma urogenital. Essas diferenças estruturais também se acompanham de alteração bioquímica da matriz extracelular. Como evidenciado pelo nosso estudo, o segmento glandar é o que apresenta a maior quantidade de GAGs totais presentes na uretra masculina humana. Essa quantidade diminui progressivamente em direção ao segmento bulbar, que possui aproximadamente duas vezes menos GAGs totais que a glândula. Todas essas diferenças estruturais e na composição de GAG sugerem que, se as características físico-químicas de um tecido são dependentes em parte da sua matriz extracelular, os diversos segmentos da uretra masculina humana não devem ter complacências uniformes nem reagir de

igual forma às lesões. Ainda não se sabe, por exemplo, porquê da balanite xerótica obliterante, uma enfermidade que afeta o tecido conjuntivo, tem maior incidência na glândula e cursa com estenose da uretra glandar e progride para a uretra peniana, afetando raramente a uretra bulbar.

Decorina e biglican são pequenos proteoglicanos ricos em DS, enquanto o versican, um proteoglicano de cadeia longa, apresenta grande quantidade de CS (3). Estes dois GAGs, que têm uma distribuição predominantemente intersticial, são os mais comumente encontrados na uretra masculina normal de indivíduos adultos jovens, como evidenciado por nosso estudo. Decorina e biglican são importantes na estabilização das fibras de colágeno (5). A imunomarcagem dos colágenos tipo I e III tanto em uretras normais como com estenose sugerem que a lâmina própria dos sinusóides vasculares são componentes importantes para manutenção da complacência uretral (4).

O HS, um GAG de membrana basal, tem uma distribuição irregular na uretra, chamando a atenção sua baixa concentração na glândula. A concentração maior de HS na uretra bulbar provavelmente se deve a grande quantidade de sinusóides vasculares, formando uma extensa superfície de membrana basal. 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 HS arterial têm demonstrado atividade antiproliferativa para músculo liso (14). 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, uma característica que pode estar relacionada com a estrutura molecular da matriz extracelular da uretra normal.

Sumarizando, a concentração e composição de GAGs apresenta variações significativas ao longo da uretra masculina humana. Tal heterogeneidade indica adaptações funcionais nos diversos segmentos desse tecido e pode estar relacionada com a incidência e localização de patologias uretrais.

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. Baskin LS, Constantinescu SC, Howard PS, McAninch JW, Ewalt DE, Duckett JW, Snyder HM, Macarak EJ: Biochemical characterization and quantification of the collagenous components of urethral stricture tissue. *J Urol*, 150: 642-647, 1993.
5. Scott JE: Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. *Biochem J*, 252: 313-323, 1988.
6. 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.
7. Mackool RJ, Gittes GK, Longaker MT: Scarless healing: the fetal wound. *Clin Plast Surg*, 25: 357-365, 1998.
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. Sokal RR, Rohlf FJ: *Biometry*. 3rd Ed. New York: WH Freeman, p. 887, 1995.
12. Hirsch EW: Comparative histology of the urethral mucosa and its relationship to gonococcal infections. *J Urol*, 17: 575-579, 1927.
13. Singh M, Blandy JP: The pathology of urethral stricture. *J Urol*, 115: 673-676, 1976.
14. Schmidt A, Yoshida K, Buddecke E: The antiproliferative activity of arterial heparan sulfate resides in domains enriched with 2-O sulfated uronic acid residues. *J Biol Chem*, 267: 19242-19247, 1992.

Received: July 10, 2000

Accepted: August 15, 2000

RESUMO

IDENTIFICAÇÃO DOS GLICOSAMINOGLICANOS PRESENTES
NA URETRA MASCULINA HUMANA

Objetivo: Os glicosaminoglicanos (GAGs) são componentes da matriz extracelular e desempenham um papel fundamental na fisiologia normal e patológica de vários tecidos. Entretanto, não existem dados na literatura sobre a composição de GAGs na uretra humana. O objetivo do presente estudo foi a identificação dos GAGs na uretra humana de adultos jovens.

Material and Métodos: As amostras de uretra masculina foram obtidas de 7 cadáveres frescos, macroscopicamente normais, com idade variando de 16 a 38 anos (idade média 26 anos). A uretra foi dividida em segmentos para análise: glandar, peniana, bulbar e membranosa. Os GAGs em amostras delipidadas de tecido seco foram extraídos por digestão em papaína e precipitação com cloreto de cetilpiridínio/etanol. A concentração de GAG total foi determinada pela dosagem de ácido hexurônico, e foi expressa como mg de ácido hexurônico por mg de tecido seco, enquanto que as proporções de GAGs sulfatados foram determinadas por eletroforese em gel de agarose.

Resultados: A concentração de GAG total foi significativamente heterogênea ($p < 0.02$) ao longo da uretra. A média de GAG total presente nos segmentos glandar, peniano, bulbar e membranosa foi 2.406 ± 0.5627 , 2.029 ± 0.6273 , 1.272 ± 0.5008 e 1.707 ± 0.3021 , respectivamente. A concentração média de GAG total é diferente ($p < 0.05$) entre o segmento bulbar e os peniano e glandar. O GAG sulfatado predominante na uretra masculina é o dermatan sulfato, seguido do condroitin sulfato, e o heparan sulfato (HS). A concentração relativa de HS variou nos diferentes segmentos da uretra masculina ($p < 0.01$), e foi mais alta (13.8% do total de GAGs sulfatados) no segmento bulbar.

Conclusão: A concentração e composição de GAG na uretra masculina humana varia significativamente. Esta heterogeneidade indica em adaptações funcionais nos diversos segmentos e pode estar relacionada com a incidência e localização de patologias uretrais.

Unitermos: uretra masculina, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, matriz extracelular
Braz J Urol. 26: 426-432, 2000

Correspondence address:

E. Alexandro da Silva
Unidade de Pesquisa Urogenital
Caixa Postal No 46.503
Rio de Janeiro, RJ, 20562-970
Fax: + + (55) (21) 587-6121